

RGene: sensibilidade e robustez do método

Ana Paula Christoff, Paola Paz, Laís Yamanaka, Aline Sereia

BiomeHub

Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302, Sapiens Parque, Florianópolis, SC.

Email: suporte@biome-hub.com

<https://biome-hub.com>

Tópicos

- Painel RGene para detecção de 18 genes de resistência aos antimicrobianos.
- Carbapenemases, Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), Resistência à Vancomicina e Meticilina.
- Limite de detecção para 15 genes testados: 0,1pg/µl de DNA total (0,0001ng/µl ~20 cópias de DNA).
- Limite de detecção para 3 genes testados: 1,0 pg/µl de DNA total (0,001ng/µl ~200 cópias de DNA).
- Reações não sofrem influência de DNA interferente (*background*) de outras bactérias na amostra.
- Ensaios reprodutíveis e estáveis, com eficiência entre 90-100% e recuperação global de 99,38% dos resultados positivos.

Resumo

O **RGene (Resistance gene)** é um ensaio molecular de PCR em tempo real para detecção de genes de resistência aos antimicrobianos em bactérias. Neste relatório foram realizados os testes de limite de detecção - LoD (sensibilidade), eficiência de reação, repetibilidade e reprodutibilidade (robustez) para 18 genes de resistência aos antimicrobianos: *bla*_{CTX-M-1} group, *bla*_{CTX-M-2} group, *bla*_{CTX-M-8} group, *bla*_{CTX-M-9} group, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{GES-like}, *bla*_{KPC-like}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{VIM-like}, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{SPM-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-72-like}, *bla*_{OXA-143-like}, *vanA* e *mecA*. Os resultados demonstram que a sensibilidade de cada ensaio varia entre 0,1 e 1,0 pg/µl de DNA total de bactérias, que essa variação é dependente do alvo (gene) investigado e que isto representa uma detecção aproximada de até 20 cópias de DNA bacteriano. Observou-se que a eficiência obtida para os ensaios foi de 90-100% para a maioria dos genes, recuperando uma média de 99,38% dos resultados positivos esperados para os 2.268 ensaios RGene realizados.

Introdução

A resistência aos antimicrobianos envolve a capacidade dos microrganismos, principalmente bactérias, de se adaptar e sobreviver na presença de antimicrobianos. Diversas infecções podem ser causadas por estes microrganismos e a resistência aos antimicrobianos dificulta ou até impossibilita o seu tratamento. A resistência aos antimicrobianos é um grave problema de saúde pública que se relaciona às áreas de saúde humana, veterinária, além da cadeia produtiva de alimentos. A disseminação rápida dos mecanismos de resistência entre os microrganismos ocorre por pressão seletiva, principalmente pelo uso, muitas vezes não adequado, de antimicrobianos. As classes de antimicrobianos, bem como seus alvos e mecanismos de resistência encontram-se descritas na tabela abaixo.

Classe	Antimicrobiano	Alvo	Mecanismos de resistência
Beta-lactâmicos	Penicilinas (ampicilina), cefalosporinas (cefamicina), carbapenêmicos (meropenem), monobactâmicos (aztreonam)	Síntese de peptidoglicano	Hidrólise, bomba de efluxo, alteração alvo
Aminoglicosídeos	Gentamicina, estreptomicina, espectinomicina	Tradução	Fosforilação, acetilação, adenilação, bomba de efluxo, alteração do alvo
Glicopeptídeos	Vancomicina, teicoplanina	Síntese de peptidoglicano	Reprogramação da síntese de peptidoglicano
Tetraciclínas	Tigeciclina, minociclina	Tradução	Mono-oxigenação, bomba de efluxo, alteração do alvo
Macrolídeos	Eritromicina, azitromicina	Tradução	Hidrólise, glicosilação, fosforilação, bomba de efluxo, alteração do alvo
Lincosamidas	Clindamicina	Tradução	Adenilação, bomba de efluxo, alteração do alvo
Oxazolidinonas	Linezolida	Tradução	Bomba de efluxo, alteração do alvo
Fenicol	Cloranfenicol	Tradução	Acetilação, bomba de efluxo, alteração do alvo
Quinolonas	Ciprofloxacina	Replicação do DNA	Acetilação, bomba de efluxo, alteração do alvo
Pirimidinas	Trimetoprim	Metabolismo C ₁	Bomba de efluxo, alteração do alvo
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	Metabolismo C ₁	Bomba de efluxo, alteração do alvo
Rifamicinas	Rifampicina	Transcrição	ADP-ribosilação, bomba de efluxo, alteração do alvo
Lipopeptídeos	Daptomicina	Membrana celular	Alteração do alvo
Peptídeos catiônicos	Colistina	Membrana celular	Bomba de efluxo, alteração do alvo

Fonte: modificado de Davies; Davies, 2010.

A partir disso, a Neoprospecta desenvolveu o **RGene**, um teste para detecção da presença de 18 genes de resistência aos antimicrobianos mais frequentemente encontrados no Brasil. O painel contemplado no teste **RGene** compreende as quatro principais classes de antimicrobianos descritas abaixo:

ESBL

As β-lactamases de espectro estendido (ESBL), frequentemente encontradas em *Enterobacteriaceae*, são enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos. As ESBLs são codificadas por vários grupos gênicos, sendo os mais disseminados e diversos os genes tipo *blaTEM* (com 223 variantes), *blaSHV* (193 variantes) e *blaCTX-M* (171 variantes).

CARBAPENEMASES

As carbapenemases são β-lactamases capazes de hidrolisar antimicrobianos carbapenêmicos, como imipenem, meropenem e ertapenem. São exemplos de carbapenemases as metalo-β-lactamases (MBL), algumas oxacilinases, como OXA-23, e KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase). Até o momento já foram descritas diversas MBL, sendo as mais frequentes e disseminadas mundialmente as enzimas IMP (Imipenemase), VIM (Verona Integron-encoded Metalo-β-lactamase) e NDM (New Delhi Metalo-β-lactamase). No Brasil, além destas já descritas, ainda há o predomínio de enzimas do tipo SPM (São Paulo Metalo-β-lactamase). As

enzimas hidrolisantes de oxacilina ou oxacilinases (OXA) formam um grupo muito diverso de enzimas, com mais de 400 variantes descritas. Algumas variantes possuem um espectro de ação limitado a penicilinas e a primeira geração de cefalosporinas (OXA-2 e OXA-10), enquanto que outras possuem um espectro mais amplo, com atividade catalítica estendida aos carbapenêmicos (OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51 e OXA-58). Enzimas do tipo OXA-51 são intrínsecas à espécie *Acinetobacter baumannii* e sua expressão é condicionada a presença da sequência de inserção ISaba 1 imediatamente anterior ao gene. Nessas condições, a sequência de inserção acaba atuando como um promotor genético e o fenótipo de resistência é expresso.

VRE

Enterococci resistente à vancomicina (VRE), relacionada à presença de clusters gênicos de resistência à vancomicina (*VanA*, *VanB*, *VanD*, *VanM*) ou genes intrínsecos, como *VanC*.

MRSA

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA), relacionado à presença do gene *mecA*, parte de um cluster gênico (*SCCmec*) com capacidade para codificar outras proteínas que também conferem resistência aos antimicrobianos. Contudo, sabe-se hoje que o gene *mecA* está disseminado entre várias espécies relacionadas, não somente em *Staphylococcus aureus*.

Painéis gênicos disponíveis para o teste RGene desenvolvido pela Neoprospecta:

Carbapenemases (CARBA)	Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)	Resistência à Vancomicina em <i>Enterococcus spp.</i> (VRE)	Resistência a Meticilina em <i>Staphylococcus auresus</i> (MRSA)
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	<i>bla</i> _{CTX-M-1-like}	<i>Van A</i>	<i>MecA</i>
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{CTX-M-2-like}		
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	<i>bla</i> _{CTX-M-8-like}		
<i>bla</i> _{OXA-72-like}	<i>bla</i> _{CTX-M-9-like}		
<i>bla</i> _{OXA-143-like}	<i>bla</i> _{SHV-like}		
<i>bla</i> _{KPC-like}			
<i>bla</i> _{GES-like}			
<i>bla</i> _{NDM-like}			
<i>bla</i> _{IMP-like}			
<i>bla</i> _{VIM-like}			
<i>bla</i> _{SPM-like}			

Ensaios

Método: PCR em tempo real (ABI 7500 fast - Applied Biosystems) utilizando sondas de hidrólise para cada gene.

1) Limite de detecção (LoD) e eficiência das reações;

- Teste com DNA controle positivo diluído em escala de 10X para 7 pontos de concentração (de 1 ng/μl a 0,0000001 ng/μl).
- Três réplicas experimentais para cada diluição testada e para controle negativo de reação (CNR).

2) Repetibilidade;

- Teste com DNA controle positivo diluído em escala de 10X para 3 pontos de concentração (de 0,1 ng/μl a 0,001 ng/μl).
- DNA diluído em H₂O e em 2 pools de ambientes hospitalares contendo DNA de bactérias (Amb1 e Amb2=DNA interferente).
- Oito réplicas experimentais para cada ponto testado e para controle negativo de reação (CNR).
- Ensaios realizados por um único operador.

3) Reprodutibilidade;

- Teste com DNA controle positivo diluído em escala de 10X para 3 pontos de concentração (de 0,1 ng/μl a 0,001 ng/μl).
- DNA diluído em H₂O e em 2 pools de ambientes hospitalares contendo DNA de bactérias (Amb1 e Amb2=DNA interferente).
- Três réplicas experimentais para cada ponto testado e para controle negativo de reação (CNR).
- Ensaios realizados por dois operadores adicionais.

Amostras de DNA utilizadas para os ensaios RGene

- Controles positivos para o painel RGene: foi obtido o DNA de bactérias controles positivos já caracterizadas e sabidamente positivas para os 18 genes de interesse incluídos no painel RGene.

- Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL): bla_{CTX-M-1} - bla_{CTX-M-2} - bla_{CTX-M-8} - bla_{CTX-M-9} - bla_{SHV}
- Carbapenemases (CARBA): bla_{OXA-23} - bla_{OXA-48} - bla_{OXA-51} - bla_{OXA-72} - bla_{OXA-143} - bla_{KPC} - bla_{GES} - bla_{NDM} - bla_{IMP} - bla_{VIM} - bla_{SPM}
- Resistência à Meticilina: mecA
- Resistência à Vancomicina: vanA

O DNA destes 18 controles positivos foi extraído com protocolo utilizando *beads* magnéticas (Neoprospecta) e individualmente quantificado, utilizando Picogreen (Invitrogen). Após a quantificação, estes DNA foram diluídos em **água**, de forma que as concentrações de cada DNA fossem iguais à: 1 ng/μl, 0,1 ng/μl, 0,01 ng/μl, 0,001 ng/μl, 0,0001 ng/μl, 0,00001 ng/μl e 0,000001 ng/μl. As diluições ocorreram de forma que todos os DNA dos 18 controles positivos ficassem em um pool único para cada uma das sete concentrações a serem testadas. Uma estimativa do número de cópias de DNA presente nas concentrações acima foi realizada utilizando-se o tamanho médio dos genomas das bactérias controle positivo. Assim, verificamos as correspondências de 206.000, 20.600, 2.060, 206, 20, 2 e 0,2 cópias de DNA para as respectivas concentrações em ng/μl acima.

- Pools de DNA de ambientes hospitalares contendo DNA bacteriano (Pools de DNA background).

Amostras coletadas de ambientes hospitalares com *swab* de algodão tiveram seu DNA total extraído com *beads* magnéticas (Neoprospecta) e sequenciado pela metodologia DMD bactéria. O resultado do sequenciamento DMD bactéria foi utilizado para escolha de amostras que contivessem quantidades de bactérias (*reads* do gene 16S rRNA) intermediárias ou altas. Desta forma, obtiveram-se dois pools de DNA background: *Pool Amb1*, input intermediário de DNA ambiental com média de 3 mil *reads* diversos do gene 16S rRNA, e *Pool Amb2*, input alto de DNA ambiental com média de 11 mil *reads* diversos do gene 16S rRNA. Estes pools contêm bactérias comumente encontradas em ambientes hospitalares que serviram como DNA background (interferente) para inoculação dos controles positivos e posterior avaliação da detecção pelo painel RGene. Nos pools **Amb1** e **Amb2** foram adicionalmente inoculadas três concentrações dos controles positivos RGene (0,1 ng/μl, 0,01 ng/μl e 0,001 ng/μl) para avaliação da detecção dos genes do painel RGene.

1) Sensibilidade: limite de detecção (LoD) e eficiência das reações

Réplicas técnicas			
	1	2	3
A	1 ng/µl		
B	0,1 ng/µl		
C	0,01 ng/µl		
D	0,001 ng/µl		
E	0,0001 ng/µl		
F	0,00001 ng/µl		
G	0,000001 ng/µl		
H	CNR		

Concentração em ng/µl do DNA controle positivo

Diluição ↓

10X 100X 1.000X 10.000X 100.000X 1.000.000X

Ensaios RGene:
- 18 genes *singleplex*

A sensibilidade analítica de um ensaio pode ser verificada conhecendo-se o limite de detecção do método (LoD). Este limite pode ser definido como a menor concentração de ácidos nucléicos (ou número de cópias) que sempre retorna um resultado positivo para todas as réplicas testadas, ou para a maior parte delas em um intervalo de confiança definido. No desenho ao lado verificamos o desenho experimental aqui realizado, e descrito abaixo.

Diluente para os DNA controles positivos RGene: água ultrapura.

Concentrações de DNA controle testadas: 1 ng/µl, 0,1 ng/µl, 0,01 ng/µl, 0,001 ng/µl, 0,0001 ng/µl, 0,00001 ng/µl, 0,000001 ng/µl.

Réplicas: triplicata técnica experimental para cada ponto de diluição.

Valor de Cq definido para ponto de corte (cutoff): 33 (Cq<=33: PRESENTE; Cq>33: AUSENTE).

Threshold utilizado para todos os genes: 0,05.

Resultados para o limite de detecção (LoD):

Para as análises foram considerados os resultados de seis concentrações testadas:

0,1 ng/µl, 0,01 ng/µl, 0,001 ng/µl, 0,0001 ng/µl, 0,00001 ng/µl, 0,000001 ng/µl.

Com equivalência ao número de cópias de DNA bacteriano:

20.600 cópias, 2.600 cópias, 206 cópias, 20 cópias, 2 cópias, 0,2 cópias.

Amplificação para as seis concentrações e genes do painel RGene.

Abaixo estão representados os valores positivos para a relação Esperado/Obtido, considerando as três replicatas experimentais.

	CTXM1	CTXM2	CTXM8	CTXM9	GES	IMP	KPC	NDM	OXA143	OXA23	OXA48	OXA51	OXA72	SHV	SPM	VIM	vanA	mecA	CNR
0,1 ng	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/0	
0,01 ng	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/0	
0,001 ng	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/0	
0,0001 ng	3/3	3/3	3/3	3/0	3/1	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/1	3/3	0/0	
0,00001 ng	3/1	3/1	3/3	3/0	3/0	3/0	3/3	3/0	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/0	3/0	3/0	3/0	0/0	
0,000001 ng	3/0	3/0	3/1	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/1	3/0	3/3	3/0	3/0	3/0	3/0	0/0	

Para as concentrações de 0,1 ng/µl a 0,001 ng/µl (20.600 a 206 cópias de DNA): todos os genes amplificaram como o esperado, recuperando 100% dos resultados positivos para todas as réplicas testadas.

Para a concentração de 0,0001 ng/µl (20 cópias de DNA): apenas três genes amplificaram diferente do esperado - nenhuma réplica amplificou para *bla*_{CTX-M-9} e apenas uma réplica amplificou para os genes *bla*_{GES} e *bla*_{VIM}, recuperando 87% dos resultados esperados.

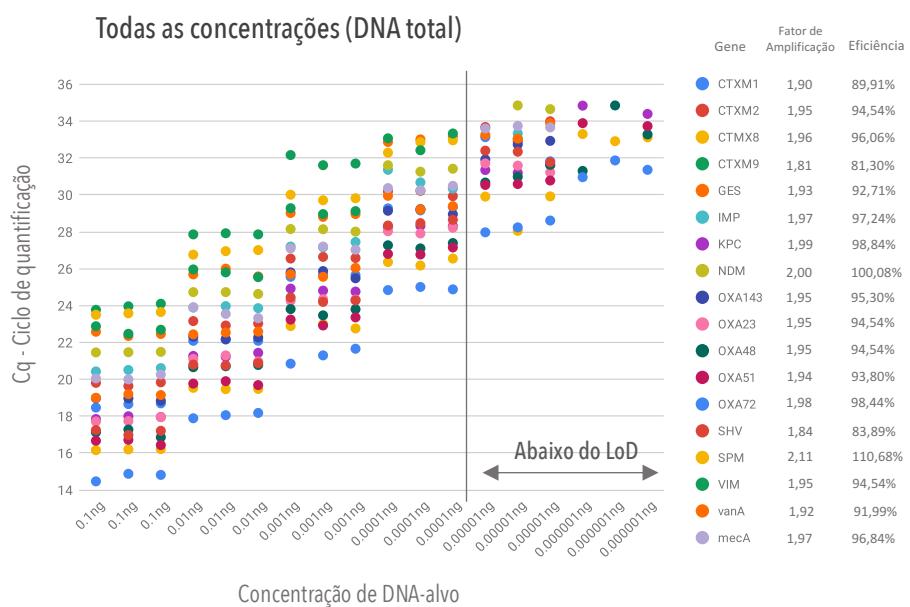
Para a concentração de 0,00001 ng/µl (2 cópias de DNA): mais de 50% dos genes amplificaram diferente do esperado. Logo, este valor foi determinado abaixo do LoD.

CNR = Controle Negativo de Reação. Todos foram negativos, conforme o esperado.

Avaliação das replicatas, fator de amplificação e eficiência da reação para cada gene testado.

Os dados considerados para o cálculo de eficiência foram dos quatro pontos de diluição: 0,1 ng/µl a 0,0001 ng/µl, para os quais 87% dos resultados obtidos foram positivos para a detecção esperada do DNA-alvo em todas as replicatas de ensaio (detecção de 206.000 a 20 cópias de DNA bacteriano). A partir do ponto de 0,00001 ng/µl o número de amostras positivas reduz para 48.1% em relação ao resultado esperado, considerando as três replicatas realizadas por gene e por diluição. Desta forma, os pontos a partir desta concentração não foram incluídos na análise e definidos como abaixo do limite de detecção do ensaio, estes dados podem ser visualizados na figura abaixo.

Para a realização das análises de amplificação e eficiência foi calculado o *slope* (intervalo) entre as médias dos pontos (replicata experimental) de cada concentração de DNA para cada gene de interesse e utilizado o [qPCR Efficiency Calculator](#) da Thermo Fisher. Os valores médios dos *slopes* entre as diluições seriadas de cada gene refletem sua eficiência de amplificação na reação (Ref: [Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time](#), Applied Biosystems; <https://www.gene-quantification.de/efficiency01.html>; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>; doi:10.1006/meth.2001.1262; PMID: 11328886; doi:10.3389/fmcb.2017.00108). De forma geral, o **fator de amplificação** deve ser próximo a 2, uma vez que na reação de PCR ideal acontece a duplicação de moléculas em cada ciclo da reação de PCR. Também, a **eficiência de amplificação** deve se aproximar de 100%, quando há uma reação ideal de PCR, duplicando as moléculas em cada ciclo da reação.



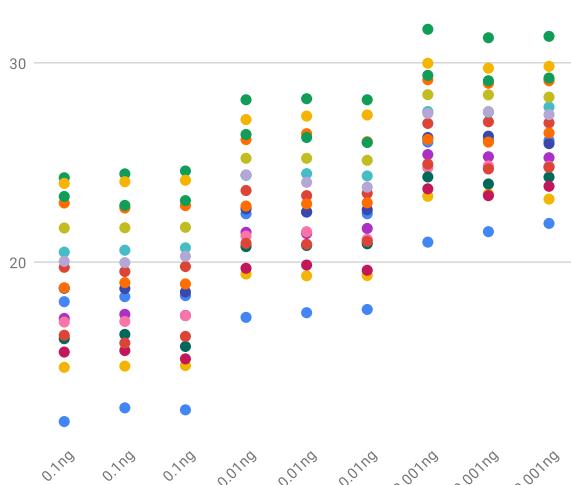
Considerando os pontos de concentração 0,1 ng/µl, 0,01 ng/µl, 0,001 ng/µl e 0,0001 ng/µl:

É possível observar na figura acima que para todos os genes analisados temos um fator de amplificação entre **1,81** e **2,11**, com eficiências de amplificação entre **81,30%** e **110,68%**.

- Apenas dois genes apresentaram fator de amplificação **abaixo de 1,90**: 1,81 para *bla_{CTX-M-9}* e 1,84 para *bla_{SHV}*. As eficiências para esses dois genes foram de 81,30% e 83,89%, respectivamente.
- Apenas um gene apresentou fator de amplificação **acima de 2,00**: 2,11 para *bla_{SPM}*, com eficiência de 110,68%.
- **Todos os demais genes se mantiveram entre 1,9 e 2,0, com eficiência de 90 a 100%.**

Considerando somente as três concentrações em que todos os genes foram detectados com 100% de positividade (diluições 0,1 ng/µl, 0,01 ng/µl e 0,001 ng/µl) temos os gráficos abaixo:

Concentrações positivas para todos os genes (DNA total)



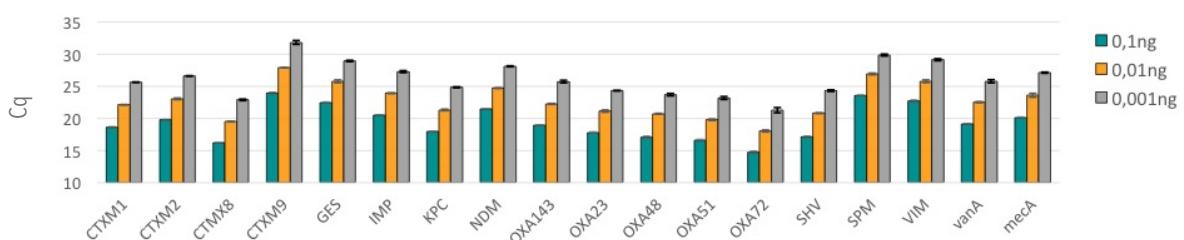
Limite de detecção obtido (LoD) para cada gene

	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
CTXM1	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
CTXM2	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
CTXM8	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
CTXM9	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
GES	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
IMP	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
KPC	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
NDM	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
OXA143	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
OXA23	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
OXA48	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
OXA51	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
OXA72	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
SHV	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
SPM	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
VIM	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
Van A	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl
mecA	0,1 ng/µl	0,01 ng/µl	0,001 ng/µl

Todos genes detectados para todas as concentrações

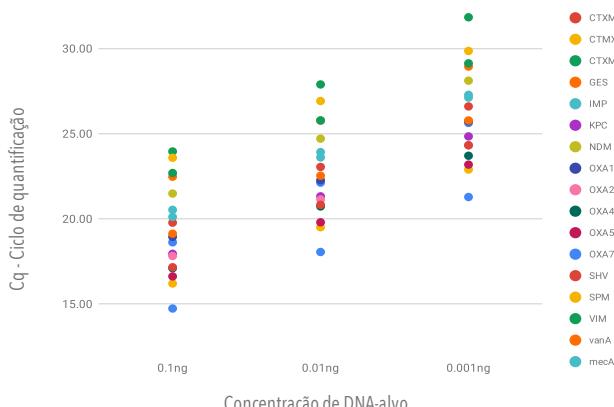
Avaliação individual dos resultados de amplificação para as três concentrações:

Médias de amplificação e desvios obtidos para as três concentrações: 0,1 ng/µl, 0,01 ng/µl e 0,001 ng/µl.



	0,1ng	CTXM1	CTXM2	CTXM8	CTXM9	GES	IMP	KPC	NDM	OXA143	OXA23	OXA48	OXA51	OXA72	SHV	SPM	VIM	vanA	mecA	CNR
Média Cq	18,61	19,76	16,19	23,94	22,46	20,52	17,94	21,47	18,93	17,80	17,09	16,61	14,72	17,15	23,58	22,68	19,12	20,10	0	
Desvio Replicatas	±0,12	±0,11	±0,03	±0,17	±0,12	±0,09	±0,08	±0,02	±0,08	±0,13	±0,21	±0,15	±0,22	±0,15	±0,08	±0,21	±0,10	±0,14	0	
Réplicas POSITIVAS	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/0	
	0,01ng	CTXM1	CTXM2	CTXM8	CTXM9	GES	IMP	KPC	NDM	OXA143	OXA23	OXA48	OXA51	OXA72	SHV	SPM	VIM	vanA	mecA	CNR
Média Cq	22,11	23,04	19,50	27,88	25,76	23,91	21,31	24,70	22,25	21,13	20,72	19,79	18,04	20,81	26,91	25,77	22,52	23,59	0	
Desvio Replicatas	±0,04	±0,12	±0,04	±0,03	±0,22	±0,06	±0,12	±0,06	±0,07	±0,17	±0,06	±0,11	±0,15	±0,06	±0,13	±0,21	±0,08	±0,30	0	
Réplicas POSITIVAS	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/0	
	0,001ng	CTXM1	CTXM2	CTXM8	CTXM9	GES	IMP	KPC	NDM	OXA143	OXA23	OXA48	OXA51	OXA72	SHV	SPM	VIM	vanA	mecA	CNR
Média Cq	25,62	26,59	22,88	31,82	28,93	27,27	24,83	28,10	25,72	24,31	23,69	23,17	21,27	24,31	29,85	29,12	25,77	27,11	0	
Desvio Replicatas	±0,05	±0,05	±0,12	±0,30	±0,11	±0,16	±0,08	±0,08	±0,21	±0,05	±0,19	±0,23	±0,41	±0,12	±0,15	±0,16	±0,25	±0,09	0	
Réplicas POSITIVAS	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/0	

Médias de amplificação para todos os genes nas três concentrações onde todos foram positivos:



	CTXM1	CTXM2	CTXM8	CTXM9	GES	IMP	KPC	NDM	OXA143	OXA23	OXA48	OXA51	OXA72	SHV	SPM	VIM	vanA	mecA	CNR
Réplicas POSITIVAS	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	0/0	

Conclusão da análise de sensibilidade: limite de detecção (LoD) e eficiências de amplificação:

- 100% dos genes detectados com LoD de 0,001 ng/μl (1 pg/μl). Detecção aproximada de até 206 cópias de DNA.
- 87% dos genes detectados com LoD de 0,0001ng/μl. Detecção aproximada de até 20 cópias de DNA.
- Eficiências de amplificação com média de 94,73% para os ensaios RGene.
- Fator de amplificação médio de 1,94 para os ensaios RGene.

2) Repetibilidade

Experimentos de repetibilidade para cada gene:

	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
Réplicas técnicas	A	CNR	0,1	0,01	0,001	A	BCO	0,1	0,01	0,001	A	BCO	0,1	0,01	0,001
	B	CNR	0,1	0,01	0,001	B	BCO	0,1	0,01	0,001	B	BCO	0,1	0,01	0,001
	C	CNR	0,1	0,01	0,001	C	BCO	0,1	0,01	0,001	C	BCO	0,1	0,01	0,001
	D	CNR	0,1	0,01	0,001	D	BCO	0,1	0,01	0,001	D	BCO	0,1	0,01	0,001
	E	CNR	0,1	0,01	0,001	E	BCO	0,1	0,01	0,001	E	BCO	0,1	0,01	0,001
	F	CNR	0,1	0,01	0,001	F	BCO	0,1	0,01	0,001	F	BCO	0,1	0,01	0,001
	G	CNR	0,1	0,01	0,001	G	BCO	0,1	0,01	0,001	G	BCO	0,1	0,01	0,001
	H	CNR	0,1	0,01	0,001	H	BCO	0,1	0,01	0,001	H	BCO	0,1	0,01	0,001
Concentração (ng/μl) de DNA controle															
Controles positivos diluídos em H ₂ O															
Réplicas técnicas															
Concentração (ng/μl) de DNA controle															
Controles positivos diluídos em Amb1															
Réplicas técnicas															
Concentração (ng/μl) de DNA controle															
Controles positivos diluídos em Amb2															

Diluentes utilizados para os DNA controle positivo RGene: água, Amb1 e Amb2.

H₂O: apenas água ultrapura.

Amb1: amostra de ambiente hospitalar contendo DNA interferente de bactérias diversas em quantidades intermediárias.

Amb2: amostra de ambiente hospitalar contendo DNA interferente de bactérias diversas em quantidades altas.

Concentrações de DNA controle positivo RGene: 0,1 ng/μl, 0,01 ng/μl e 0,001 ng/μl.

Controles:

***BCO** = Branco da Reação (sem DNA controle positivo, apenas os *backgrounds* de DNA interferente Amb1 e Amb2).

***CNR** = Controle Negativo de Reação (sem DNA controle positivo, sem os *backgrounds* de DNA interferente Amb1 e Amb2, apenas H₂O ultrapura).

Rélicas: 08 replicatas experimentais para cada ponto.

Valor de Cq definido para cutoff: 33.

Threshold para todos os genes: 0,05.

Resultados Repetibilidade:

Os resultados estão apresentados abaixo em gráficos de distribuição dos valores das réplicas, por gene analisado, nos quais é possível observar os valores de Cq para cada uma das oito réplicas de cada concentração testada nos três diferentes *pools* de *background*. No primeiro quadro, ao lado do gráfico, observam-se detalhadamente os valores médios de Cq e desvios para os conjuntos de réplicas analisadas. Também se verifica o total de réplicas realizadas e o resultado final da quantidade de réplicas positivas em relação ao número esperado e o número obtido (ex. 72/72), refletindo em uma porcentagem de resultados positivos obtidos. No quadro menor, no canto direito superior, estão ilustrados os valores dos controles. Para os BCO não se tinha certeza da presença dos genes de resistência do painel RGene a serem testados (por isso nomeados como *Unknown* para o resultado esperado), uma vez que sobre o Amb1 e Amb2 conhecia-se apenas o perfil bacteriano sequenciado pelo gene 16S rRNA. Logo, o BCO foi utilizado justamente para conhecimento do perfil de genes de resistência previamente presentes nestes dois *pools*. Por fim, o gráfico abaixo do menor quadro ilustra os valores médios das réplicas de Cq de cada grupo (mesmas do gráfico 1 e quadro 1), juntamente com o desvio padrão para cada série de dados inserido nas barras de valores. No total, foram analisadas 72 réplicas para cada gene.

***bla*_{CTX-M-1} group**

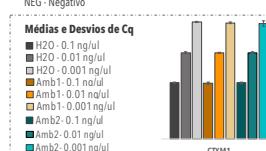
CTXM1 Distribuição gráfica dos valores das réplicas



CTXM1 Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	18,35	0,068
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	21,78	0,089
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	25,25	0,073
Amb1- 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	18,32	0,119
Amb1- 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	21,76	0,084
Amb1- 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	25,16	0,081
Amb2- 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	18,36	0,098
Amb2- 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	21,78	0,073
Amb2- 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	25,07	0,324
TOTAL POSITIVOS	72 / 72	100%	-	-

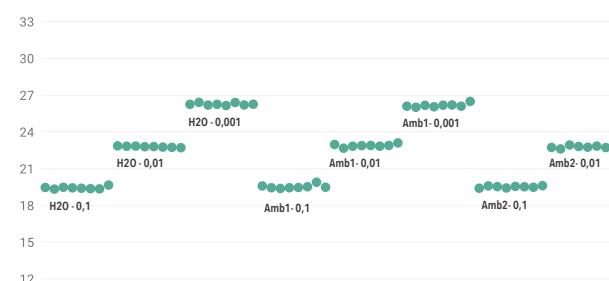
CTXM1 - Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
CNR	8 NEG	0	-
BCO Amb1	8 UN	0	-
BCO Amb2	8 UN	0	-

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição,
UN - Desconhecido (*Unknown*),
NEG - Negativo



***bla*_{CTX-M-2} group**

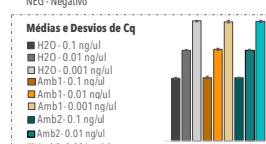
CTXM2 Distribuição gráfica dos valores das réplicas



CTXM2 Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	19,43	0,105
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	22,79	0,051
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	26,26	0,094
Amb1- 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	19,53	0,160
Amb1- 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	22,88	0,122
Amb1- 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	26,16	0,147
Amb2- 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	19,51	0,075
Amb2- 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	22,78	0,100
Amb2- 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	26,21	0,112
TOTAL POSITIVOS	72 / 72	100%	-	-

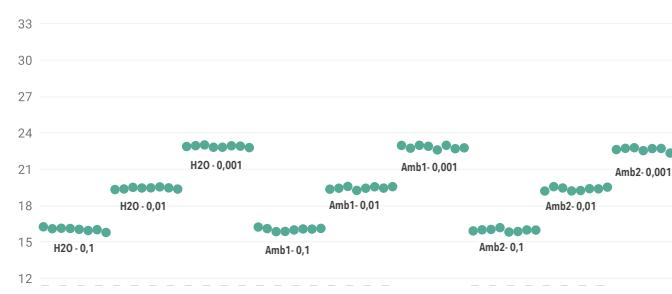
CTXM2 - Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
CNR	8 NEG	0	-
BCO Amb1	8 UN	0	-
BCO Amb2	8 UN	0	-

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição,
UN - Desconhecido (*Unknown*),
NEG - Negativo



bla_{CTX-M-8} group

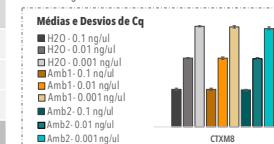
CTXM8 Distribuição gráfica dos valores das réplicas



CTXM8 Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	16,04	0,140
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	19,43	0,075
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	22,88	0,076
Amb1- 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	16,04	0,128
Amb1- 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	19,45	0,113
Amb1- 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	22,82	0,146
Amb2- 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	15,97	0,111
Amb2- 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	19,36	0,139
Amb2- 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	22,64	0,155
TOTAL POSITIVOS	72/ 72	100%	-	-

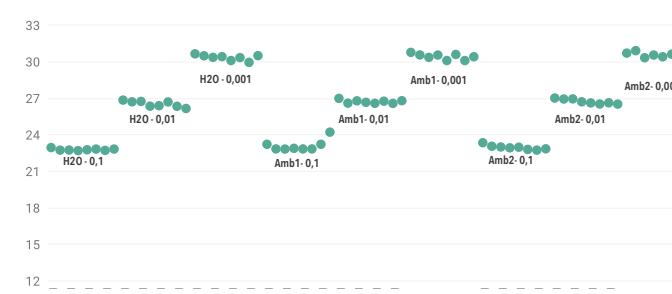
CTXM8 - Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
CNR	8 NEG	0	-
BCO Amb1	8 UN	0	-
BCO Amb2	8 UN	0	-

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição, UN - Desconhecido (unknown), NEG - Negativo



bla_{CTX-M-9} group

CTXM9 Distribuição gráfica dos valores das réplicas



CTXM9 Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	22,78	0,081
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	26,53	0,248
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	30,35	0,226
Amb1- 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	23,11	0,478
Amb1- 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	26,72	0,140
Amb1- 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	30,43	0,238
Amb2- 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	22,96	0,189
Amb2- 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	26,74	0,200
Amb2- 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	30,50	0,266
TOTAL POSITIVOS	72/ 72	100%	-	-

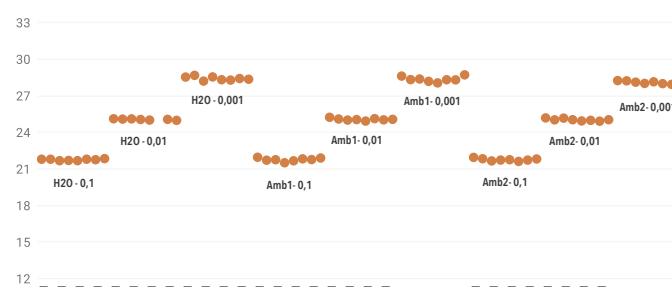
CTXM9 - Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
CNR	8 NEG	0	-
BCO Amb1	8 UN	0	-
BCO Amb2	8 UN	0	-

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição, UN - Desconhecido (unknown), NEG - Negativo



bla_{NDM-like}

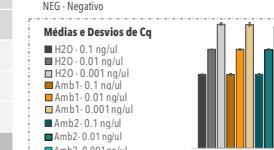
NDM Distribuição gráfica dos valores das réplicas



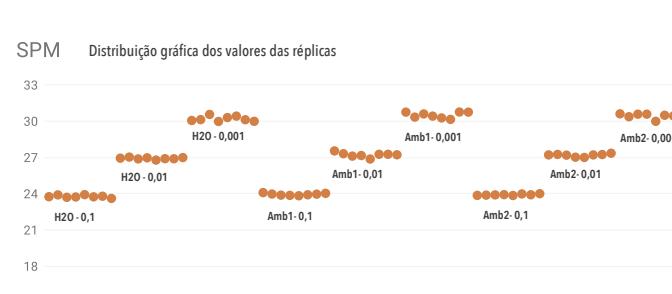
NDM Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	21,74	0,064
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 7	87,5%	25,05	0,048
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	28,41	0,157
Amb1- 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	21,76	0,139
Amb1- 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	25,06	0,091
Amb1- 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	28,36	0,214
Amb2- 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	21,75	0,105
Amb2- 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	25,03	0,097
Amb2- 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	28,10	0,116
TOTAL POSITIVOS	72/ 71	98,6%	-	-

NDM - Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
CNR	8 NEG	0	-
BCO Amb1	8 UN	0	-
BCO Amb2	8 UN	8	30,67

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição, UN - Desconhecido (unknown), NEG - Negativo



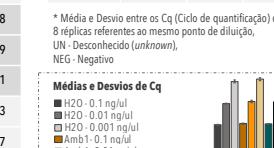
SPM Distribuição gráfica dos valores das réplicas



SPM Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	23,75	0,102
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	26,91	0,077
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	30,18	0,210
Amb1- 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	23,93	0,088
Amb1- 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	27,21	0,189
Amb1- 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	30,50	0,241
Amb2- 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	23,90	0,053
Amb2- 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	27,17	0,117
Amb2- 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	30,42	0,199
TOTAL POSITIVOS	72/ 72	100%	-	-

SPM - Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
CNR	8 NEG	0	-
BCO Amb1	8 UN	0	-
BCO Amb2	8 UN	0	-

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição, UN - Desconhecido (unknown), NEG - Negativo



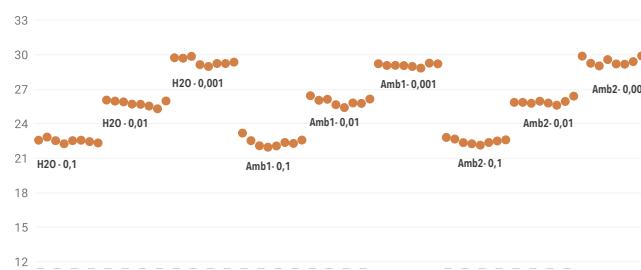
BiomeHub

<https://biome-hub.com>

FOR RESEARCH USE ONLY - 28 February 2019 PDI57_NT 017 v.1

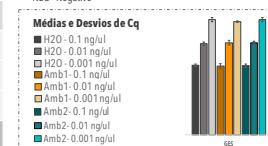
*bla*_{GES-like}

GES Distribuição gráfica dos valores das réplicas



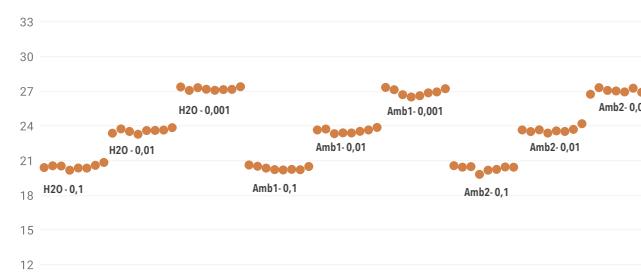
GES Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*	GES - Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	22,50	0,175	CNR	8 NEG	0	-
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	25,75	0,258	BCO Amb1	8 UN	0	-
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	29,39	0,319	BCO Amb2	8 UN	0	-
Amb1 - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	22,38	0,393				
Amb1 - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	25,92	0,325				
Amb1 - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	29,08	0,141				
Amb2 - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	22,45	0,223				
Amb2 - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	25,89	0,228				
Amb2 - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	29,41	0,327				
TOTAL POSITIVOS	72/ 72	100%	-	-				

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição;
UN - Desconhecido (unknown);
NEG - Negativo



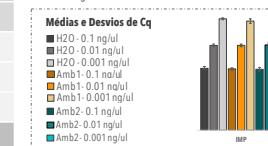
*bla*_{IMP-like}

IMP Distribuição gráfica dos valores das réplicas



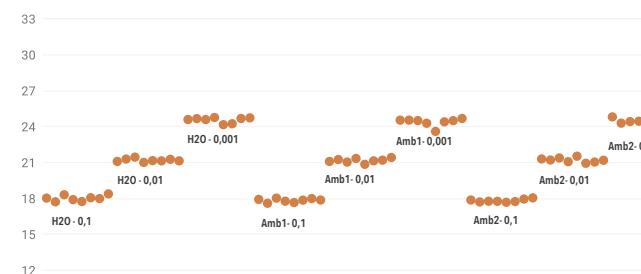
IMP Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*	IMP - Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	20,47	0,200	CNR	8 NEG	0	-
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	23,57	0,185	BCO Amb1	8 UN	1	20,11
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	27,21	0,127	BCO Amb2	8 UN	4	34,43
Amb1 - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	20,35	0,165				
Amb1 - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	23,57	0,188				
Amb1 - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	26,91	0,299				
Amb2 - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	20,32	0,242				
Amb2 - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	23,64	0,242				
Amb2 - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	27,10	0,277				
TOTAL POSITIVOS	72/ 72	100%	-	-				

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição;
UN - Desconhecido (unknown);
NEG - Negativo



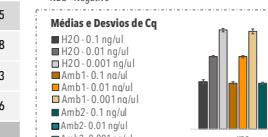
*bla*_{KPC-like}

KPC Distribuição gráfica dos valores das réplicas



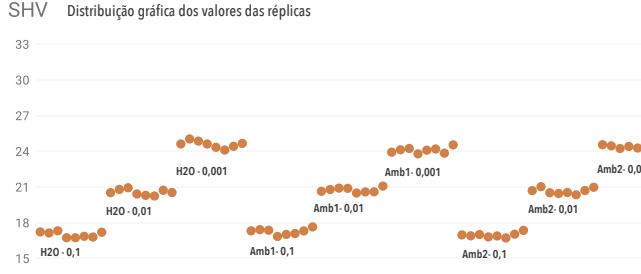
KPC Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*	KPC - Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	18,01	0,238	CNR	8 NEG	0	-
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	21,19	0,137	BCO Amb1	8 UN	0	-
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	24,55	0,226	BCO Amb2	8 UN	2	34,14
Amb1 - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	17,84	0,151				
Amb1 - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	21,17	0,179				
Amb1 - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	24,38	0,335				
Amb2 - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	17,81	0,128				
Amb2 - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	21,20	0,193				
Amb2 - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	24,56	0,176				
TOTAL POSITIVOS	72/ 72	100%	-	-				

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição;
UN - Desconhecido (unknown);
NEG - Negativo



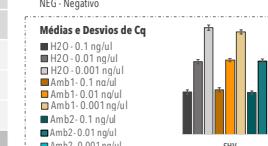
*bla*_{SHV-like}

SHV Distribuição gráfica dos valores das réplicas



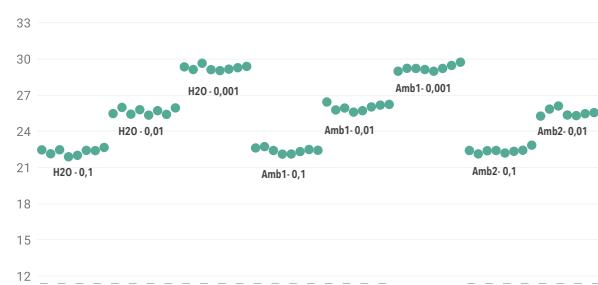
SHV Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*	SHV - Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	16,99	0,241	CNR	8 NEG	0	-
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	20,55	0,243	BCO Amb1	8 UN	0	-
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	24,57	0,294	BCO Amb2	8 UN	0	-
Amb1 - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	17,24	0,253				
Amb1 - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	20,74	0,199				
Amb1 - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	24,09	0,242				
Amb2 - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	16,95	0,191				
Amb2 - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	20,65	0,243				
Amb2 - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	24,42	0,127				
TOTAL POSITIVOS	72/ 72	100%	-	-				

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição;
UN - Desconhecido (unknown);
NEG - Negativo



blaVIM-like

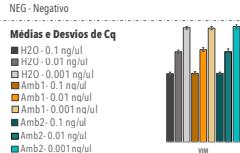
VIM Distribuição gráfica dos valores das réplicas



VIM Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	22,30	0,263
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	25,63	0,255
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	29,25	0,197
Amb1-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	22,40	0,218
Amb1-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	25,98	0,286
Amb1-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	29,24	0,250
Amb2-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	22,39	0,213
Amb2-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	25,66	0,423
Amb2-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	29,45	0,415
TOTAL POSITIVOS	72 / 72	100%	-	-

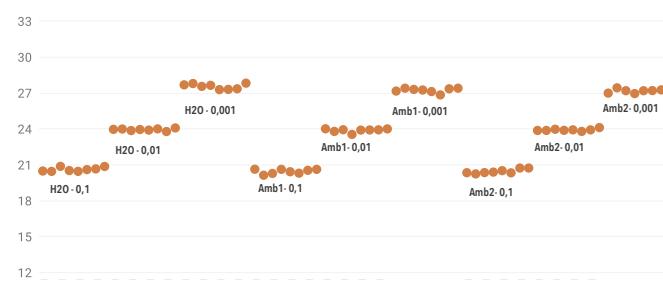
VIM - Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
CNR	8 NEG	0	-
BCO Amb1	8 UN	0	-
BCO Amb2	8 UN	0	-

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição,
UN - Desconhecido (unknown),
NEG - Negativo



MecA

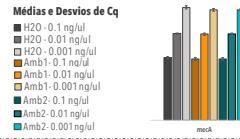
mecA Distribuição gráfica dos valores das réplicas



mecA Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	20,61	0,172
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	23,94	0,092
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	27,55	0,217
Amb1-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	20,44	0,189
Amb1-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	23,88	0,151
Amb1-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	27,23	0,187
Amb2-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	20,45	0,186
Amb2-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	23,91	0,094
Amb2-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	27,21	0,185
TOTAL POSITIVOS	72 / 72	100%	-	-

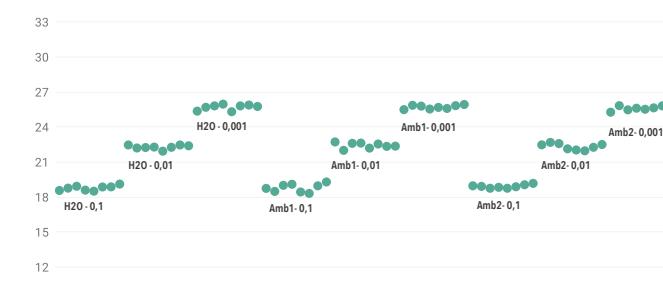
mecA - Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
CNR	8 NEG	0	-
BCO Amb1	8 UN	8	33,52
BCO Amb2	8 UN	8	33,27

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição,
UN - Desconhecido (unknown),
NEG - Negativo



blaOXA-143-like

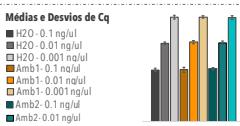
OXA 143 Distribuição gráfica dos valores das réplicas



OXA 143 Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	18,77	0,208
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	22,27	0,172
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	25,69	0,237
Amb1-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	18,79	0,352
Amb1-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	22,42	0,243
Amb1-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	25,71	0,162
Amb2-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	18,91	0,145
Amb2-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	22,32	0,268
Amb2-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	25,64	0,233
TOTAL POSITIVOS	72 / 72	100%	-	-

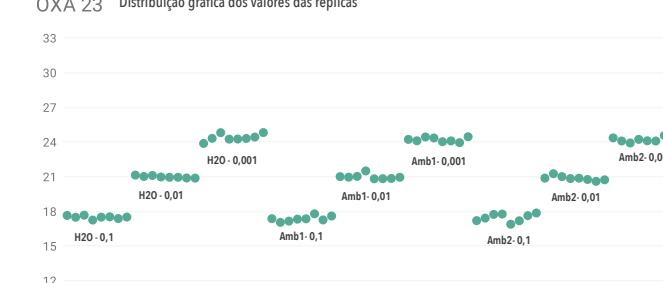
OXA 143 Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
CNR	8 NEG	0	-
BCO Amb1	8 UN	0	-
BCO Amb2	8 UN	0	-

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição,
UN - Desconhecido (unknown),
NEG - Negativo



blaOXA-23-like

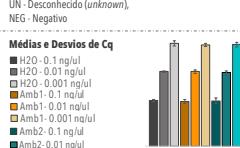
OXA 23 Distribuição gráfica dos valores das réplicas



OXA 23 Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	17,49	0,135
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	20,99	0,095
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	24,38	0,309
Amb1-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	17,37	0,235
Amb1-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	20,99	0,219
Amb1-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	24,21	0,191
Amb2-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	17,46	0,344
Amb2-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	20,86	0,199
Amb2-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	24,26	0,284
TOTAL POSITIVOS	72 / 72	100%	-	-

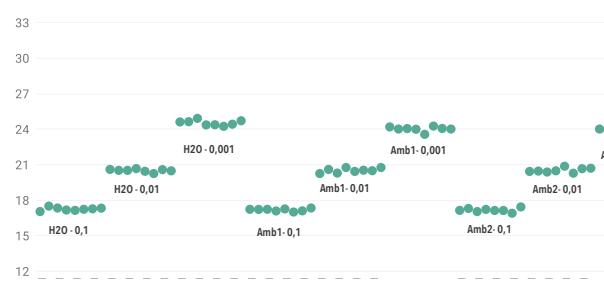
OXA 23 Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
CNR	8 NEG	0	-
BCO Amb1	8 UN	0	-
BCO Amb2	8 UN	0	-

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição,
UN - Desconhecido (unknown),
NEG - Negativo



blaOXA-48-like

OXA 48 Distribuição gráfica dos valores das réplicas



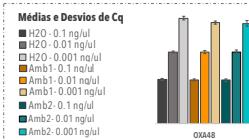
OXA 48 Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	17,25	0,141
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	20,50	0,126
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	24,53	0,221
Amb1-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	17,18	0,110
Amb1-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	20,51	0,191
Amb1-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	24,02	0,207
Amb2-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	17,16	0,160
Amb2-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	20,53	0,194
Amb2-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	23,91	0,347
TOTAL POSITIVOS	72/ 72	100%	-	-

OXA 48 Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
CNR	8 NEG	0	-
BCO Amb1	8 UN	0	-
BCO Amb2	8 UN	0	-

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição,

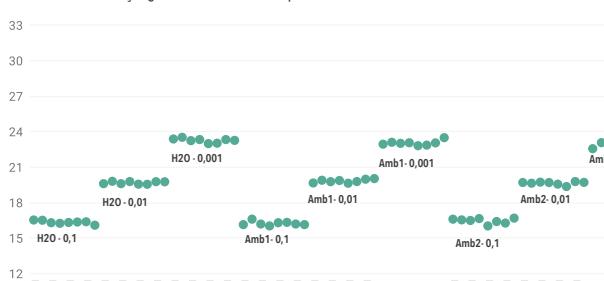
UN - Desconhecido (unknown),

NEG - Negativo



blaOXA-51-like

OXA 51 Distribuição gráfica dos valores das réplicas



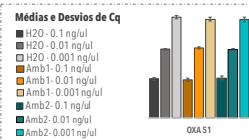
OXA 51 Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	16,34	0,141
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	19,67	0,108
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	23,25	0,178
Amb1-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	16,24	0,173
Amb1-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	19,83	0,140
Amb1-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	23,04	0,207
Amb2-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	16,45	0,220
Amb2-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	19,64	0,133
Amb2-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	23,01	0,280
TOTAL POSITIVOS	72/ 72	100%	-	-

OXA 51 Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
CNR	8 NEG	0	-
BCO Amb1	8 UN	2	34,47
BCO Amb2	8 UN	1	34,46

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição,

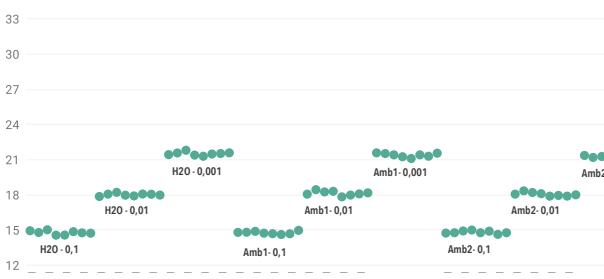
UN - Desconhecido (unknown),

NEG - Negativo



blaOXA-72-like

OXA 72 Distribuição gráfica dos valores das réplicas



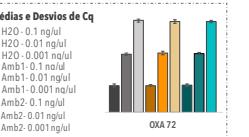
OXA 72 Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	14,77	0,162
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	18,01	0,108
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	21,50	0,152
Amb1-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	14,77	0,116
Amb1-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	18,14	0,192
Amb1-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	21,39	0,166
Amb2-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	14,81	0,118
Amb2-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	18,05	0,157
Amb2-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	21,36	0,128
TOTAL POSITIVOS	72/ 72	100%	-	-

OXA 72 Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
CNR	8 NEG	0	-
BCO Amb1	8 UN	0	-
BCO Amb2	8 UN	1	33,97

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição,

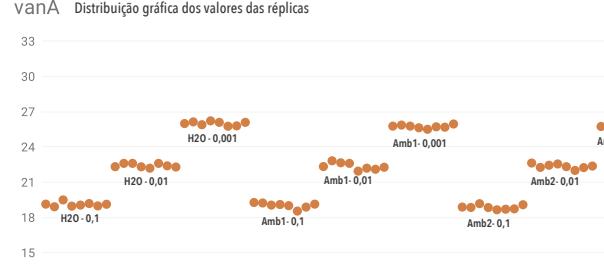
UN - Desconhecido (unknown),

NEG - Negativo



VanA

vanA Distribuição gráfica dos valores das réplicas



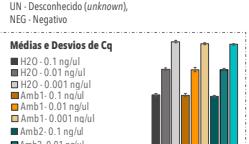
vanA Pools de Amostras	Esperado / Obtido	%	Média de Cq*	Desvio de Cq*
H2O - 0,1 ng/ul	8 / 8	100%	19,09	0,182
H2O - 0,01 ng/ul	8 / 8	100%	22,40	0,164
H2O - 0,001 ng/ul	8 / 8	100%	25,98	0,166
Amb1-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	19,02	0,231
Amb1-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	22,35	0,301
Amb1-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	25,72	0,138
Amb2-0,1 ng/ul	8 / 8	100%	18,85	0,182
Amb2-0,01 ng/ul	8 / 8	100%	22,34	0,196
Amb2-0,001 ng/ul	8 / 8	100%	25,64	0,093
TOTAL POSITIVOS	72/ 72	100%	-	-

vanA Controles	Esperado	Obtido	Média de Cq
CNR	8 NEG	0	-
BCO Amb1	8 UN	0	-
BCO Amb2	8 UN	0	-

* Média e Desvio entre os Cq (Ciclo de quantificação) das 8 réplicas referentes ao mesmo ponto de diluição,

UN - Desconhecido (unknown),

NEG - Negativo



Repetibilidade: comparação das médias e desvios das 72 réplicas para cada gene e suas variações testadas.

O gráfico abaixo demonstra o resultado somatório dos quadros individuais apresentados acima, por gene, com as médias e desvios obtidos para os valores de Cq das réplicas dos experimentos.



Observa-se que:

- Os resultados obtidos foram consistentes para todas as réplicas;
- Que os pools *background* não afetaram a detecção dos resultados, tão pouco influenciaram nos valores de Cq e desvios obtidos, bem como os diferentes pontos de diluições e o limite de detecção.
- Desvios acima de 0,3 foram encontrados apenas para os genes bla_{CTX-M-9} e bla_{SHV}.
- Os controles de reação (CNR), não apresentaram amplificação de DNA detectável (nenhum falso positivo).
- O total de resultados positivos recuperados foi de 99,93% para os 1.296 ensaios de repetibilidade.
- A taxa de falsos negativos foi de 0,07% para os 1.296 ensaios de repetibilidade.

3) Reproduzibilidade

Experimentos de reproduzibilidade para cada gene:

Operador 2:	Réplicas técnicas			Operador 3:	Réplicas técnicas		
	1	2	3		1	2	3
Concentração em ng/µl do DNA controle positivo	0,1	0,1	0,1	Diluído em H2O	0,1	0,1	0,1
	0,01	0,01	0,01		0,01	0,01	0,01
	0,001	0,001	0,001		0,001	0,001	0,001
	0,1	0,1	0,1		0,1	0,1	0,1
	0,01	0,01	0,01		0,01	0,01	0,01
	0,001	0,001	0,001		0,001	0,001	0,001
	0,1	0,1	0,1		0,1	0,1	0,1
	0,01	0,01	0,01		0,01	0,01	0,01
	0,001	0,001	0,001		0,001	0,001	0,001
CNR	CNR	CNR	CNR	Diluído em Amb1	0,1	0,1	0,1
					0,01	0,01	0,01
					0,001	0,001	0,001
					0,1	0,1	0,1
					0,01	0,01	0,01
					0,001	0,001	0,001
					CNR	CNR	CNR

Para os ensaios de reproduzibilidade foi realizado um desenho experimental similar ao do teste de repetibilidade. Adicionalmente, os ensaios com os mesmos genes e *pools* de amostras foram realizados por mais dois operadores diferentes, em diferentes dias, utilizando as amostras já descritas anteriormente, nas concentrações: **0,1 ng/µl, 0,01 ng/µl e 0,001 ng/µl**, diluídas nos três *pools* de *background* (H₂O, Amb1 e Amb2).

Operador 2:

27 réplicas para cada gene - 486 ensaios:

- 2,26 % de falsos negativos detectados.
- 97,74 % de resultados positivos detectados.

Operador 3:

27 réplicas para cada gene - 486 ensaios:

- 0,2 % de falsos negativo detectados.
- 99,8% de resultados positivos detectados.

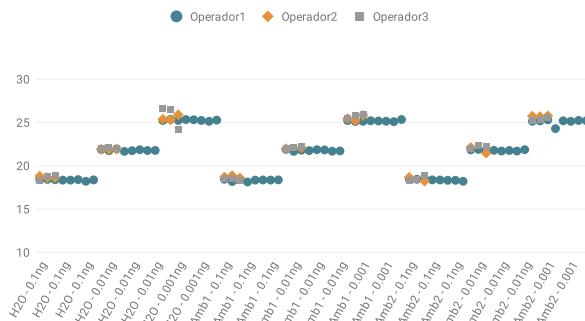
TOTAL : 972 ensaios realizados

- 1,23 % de falsos negativos detectados.
- 98,77% de resultados positivos detectados.
- 1 falso positivo detectado.

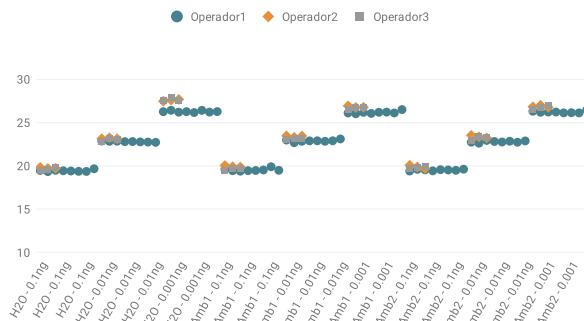
Comparação geral dos resultados de repetibilidade e reproduzibilidade (Robustez)

O perfil geral de repetibilidade e reproduzibilidade pode ser visualizado nas figuras abaixo, para cada um dos 18 genes testados. Nos gráficos estão calculadas as médias das replicatas experimentais para cada um dos três diferentes operadores, nas diferentes concentrações ($0,1\text{ ng}/\mu\text{l}$, $0,01\text{ ng}/\text{l}$ e $0,001\text{ ng}/\mu\text{l}$) e para os diferentes tipos de pools (H_2O , Amb1 e Amb2).

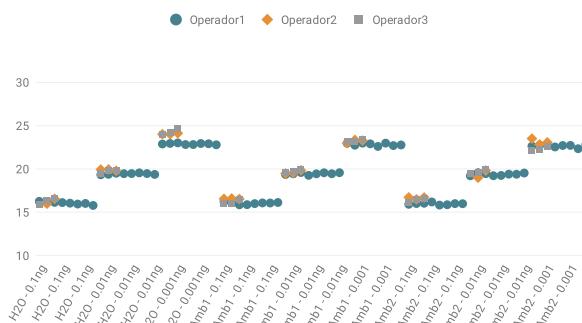
CTXM1



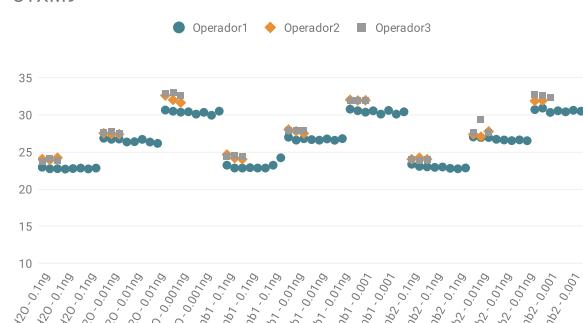
CTXM2



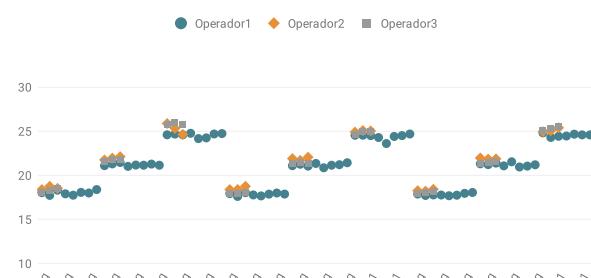
CTXM8



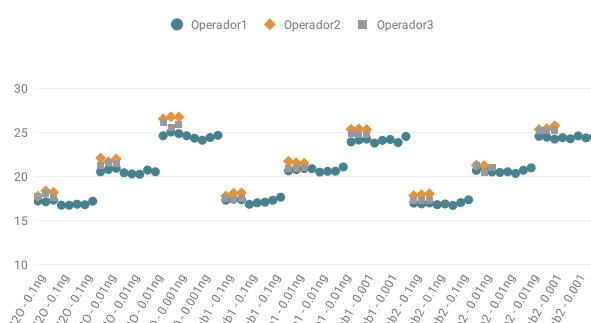
CTXM9



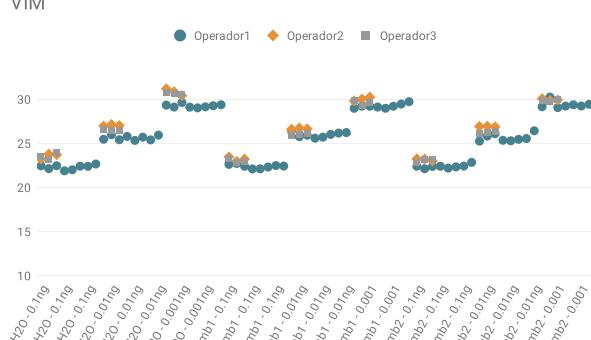
KPC



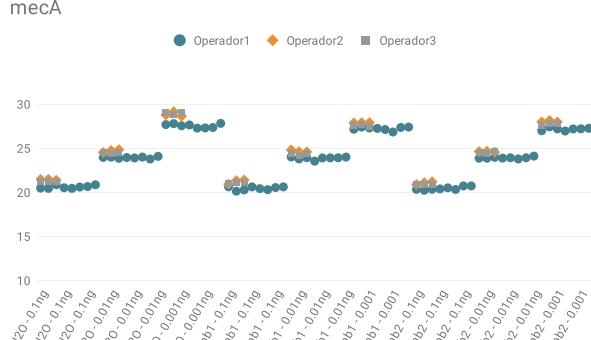
SHV



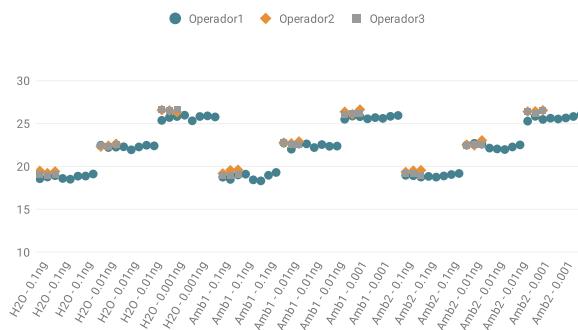
VIM



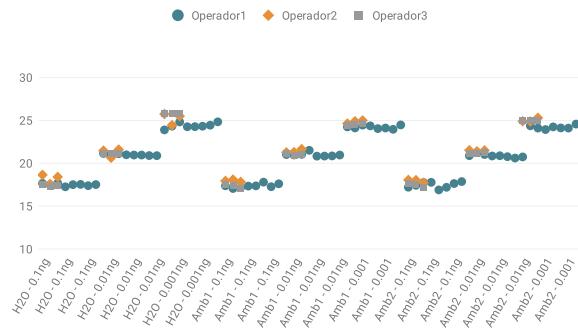
mecA



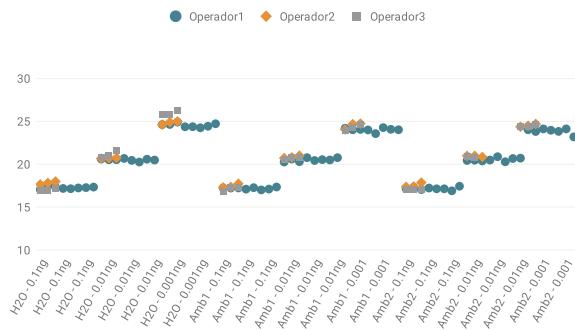
OXA143



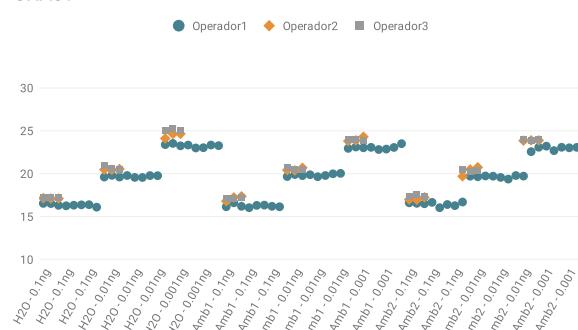
OXA23



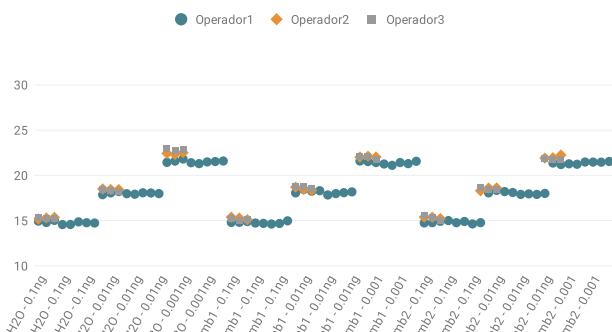
OXA48



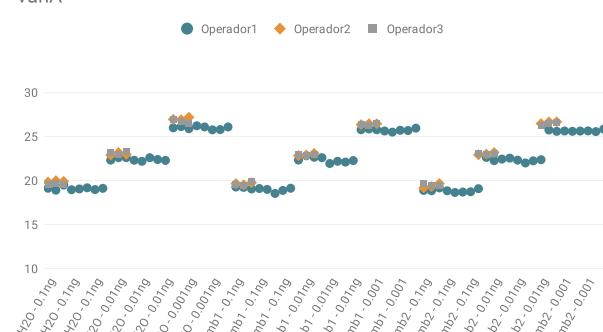
OXA51



OXA72



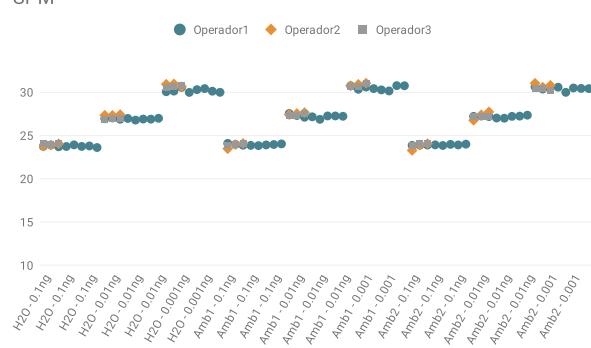
vanA



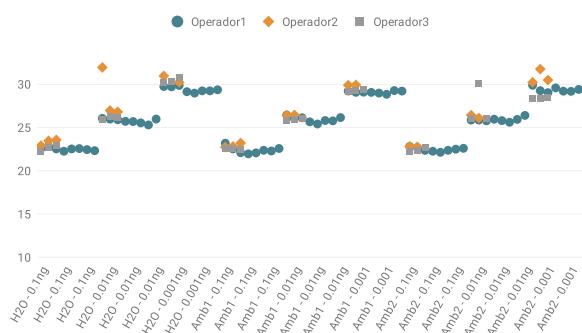
NDM



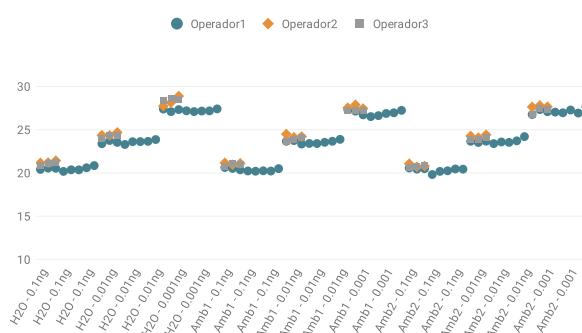
SPM



GES

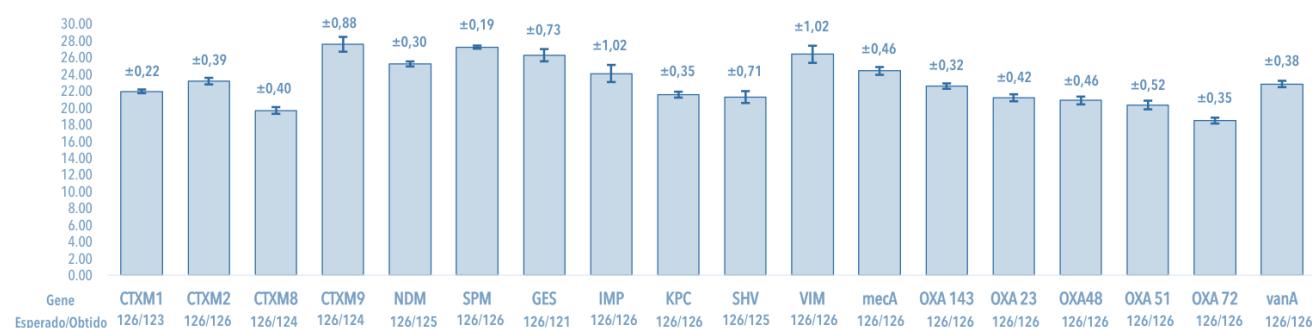


IMP



No total, foram realizadas 126 réplicas experimentais para cada um dos 18 genes testados, somando-se todas as variáveis dos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade (concentrações, pools de background e operadores).

Robustez dos ensaios: o gráfico abaixo ilustra as médias e desvios obtidos para cada gene testado e suas 126 réplicas de repetibilidade e reprodutibilidade.



Observa-se que os resultados foram consistentes para todas as réplicas, que os pools background, os diferentes operadores e diferentes dias de ensaio não afetaram a detecção dos resultados positivos, tão pouco influenciaram os valores de Cq obtidos, bem como as séries de diluições. Os desvios obtidos entre as réplicas são aceitáveis, uma vez que não influenciaram na obtenção dos resultados (ausente/presente). De forma geral temos:

- Verdadeiros positivos: 99.38%
- Falsos negativos: 0,61%
- Falsos positivos: 0,39%

Uma consideração a ser feita sobre os resultados relaciona-se à experiência dos operadores na realização destes ensaios. Operador 1: 9 anos de experiência, Operador 2: realizando o ensaio de forma autônoma pela primeira vez e Operador 3: 4 anos de experiência. Logo, os resultados obtidos demonstram uma boa robustez do método considerando operadores com diferentes experiências.

Resultado geral de repetibilidade e reprodutibilidade do ensaio RGene para os diferentes genes testados:

	CTXM1	CTXM2	CTXM8	CTXM9	NDM	SPM	GES	IMP	KPC	SHV	VIM	MECA	OXA143	OXA23	OXA48	OXA51	OXA72	VANA
*REIAIS POSITIVOS	97,6%	100%	98,4%	98,4%	99,2%	100%	96%	100%	99,2%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
**FALSOS POSITIVOS	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
*FALSOS NEGATIVOS	3	0	2	2	1	0	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	

*Total de ensaios RGene: 2.268 (126 por gene)

**Total de controles negativos testados: 256 (14 por gene)