



Rx Only

cobas® Cdiff Test

para utilização no sistema cobas® 4800

Para diagnóstico *in vitro*



cobas® 4800 System Sample Preparation Kit	240 Tests	P/N: 05235782190
	960 Tests	P/N: 05235804190
cobas® 4800 System Lysis Kit 1	240 Tests	P/N: 06768253190
	960 Tests	P/N: 06768270190
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit	240 Tests	P/N: 05235863190
	960 Tests	P/N: 05235871190
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1	20 Runs	P/N: 06768318190
cobas® 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit	80 Tests	P/N: 06768237190
cobas® 4800 Cdiff Controls and Cofactor Kit	10 Runs	P/N: 06768300190

ÍNDICE

Utilização	4
Resumo e explicação do teste / Princípio do procedimento	4
Fundamentos: Rastreio do <i>C. difficile</i>	4
Explicação do teste	5
Princípios do Procedimento	5
Preparação de amostras	5
Amplificação por PCR e detecção no TaqMan®	5
Amplificação selectiva	6
Materiais, reagentes e amostras	7
Materiais e reagentes fornecidos	7
Armazenamento e manuseamento de reagentes	12
Materiais adicionais necessários	13
Materiais opcionais	13
Equipamentos e software necessários mas não fornecidos	13
Precauções e requisitos de manuseamento	14
Advertências e precauções	14
Boas práticas laboratoriais	14
Contaminação	15
Integridade	15
Eliminação	15
Derrames e limpeza	15
Colheita, transporte e armazenamento de amostras	16
Colheita de amostras	16
Armazenamento e estabilidade das amostras durante o transporte	16
Procedimento de teste	16
Execução do teste	16
Fluxo de trabalho	16
Instruções de Utilização	17

Resultados.....	20
Controlo de qualidade e validade dos resultados.....	20
Controlo positivo	20
Controlo negativo.....	20
Controlo Interno	20
Interpretação dos resultados.....	21
Lista de alarmes de resultados	22
Limitações do procedimento	22
Avaliação do desempenho não clínico	24
Sensibilidade analítica.....	24
Detecção de genótipos do <i>C. difficile</i>	24
Precisão	26
Especificidade analítica.....	27
Interferência.....	29
Desempenho clínico com amostras clínicas	31
Informações adicionais.....	33
Características principais do ensaio.....	33
Símbolos	34
Apoio técnico	35
Fabricante e importador.....	35
Marcas comerciais e patentes	35
Direitos de autor	35
Bibliografia	36
Informações de revisão do documento	38

Utilização

O teste **cobas**® Cdiff no sistema **cobas**® 4800 é um teste automatizado, qualitativo, de diagnóstico *in vitro*, que utiliza reacção de polimerização em cadeia (PCR) em tempo real, para a detecção directa do gene toxina B (*tcdB*) do *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) toxigénico em amostras fecais sem forma (líquidas ou moles) obtidas de doentes dos quais se suspeita terem contraído a infecção por *C. difficile* (CDI). O teste **cobas**® Cdiff destina-se a ser utilizado como auxiliar no diagnóstico da CDI em seres humanos em conjunto com factores de risco clínico e epidemiológico.

Resumo e explicação do teste / Princípio do procedimento

Fundamentos: Rastreio do *C. difficile*

O *C. difficile* é um bacilo Gram positivo, anaeróbio, formador de esporos, que no final da década de 1970 foi identificado como um agente etiológico da colite pseudomembranosa associada aos antibióticos.^{1,2} É supostamente responsável por 15 a 20% dos casos de diarreia relacionados com antibióticos e quase todos os casos de colite pseudomembranosa associada aos antibióticos.³ Na última década, a incidência de infecção associada ao *C. difficile* (CDI) tem aumentado progressivamente e tornou-se agora num problema clínico significativo nos países desenvolvidos. Apesar das taxas de incidência terem variado entre 30 e 40 casos por 100.000 habitantes em hospitais de cuidados intensivos nos Estados Unidos, a incidência aumentou para mais de 80 por 100.000 habitantes em 2005.⁴ Já foram observados no passado surtos de CDI.⁵ O custo directo associado à CDI era de \$6.326 por caso nos EUA.⁶

Os aumentos na incidência têm sido parcialmente atribuídos ao surgimento de uma estirpe aparentemente hipervirulenta, classificada como ribotipo 027/pulsotipo 1 norteamericano (NAP1) e toxinotipo III. As estirpes toxigénicas do *C. difficile* produzem normalmente duas toxinas: toxina A (uma enterotoxina) e toxina B (uma citotoxina).⁷ Uma pequena percentagem das estirpes apenas produz toxina B.⁸

Recentemente tem sido observado um aumento de virulência com estirpes que produzem outra toxina, designada toxina binária e portadora de uma deleção no gene regulador negativo *tcdC*.^{9,10} Estas últimas estirpes foram consideradas mais virulentas *in vitro* e parecem causar mais morbidade e mortalidade nos seres humanos.^{11,12}

Após colonização com *C. difficile* toxigénico, os indivíduos poderão tornar-se portadores assintomáticos ou contrair uma doença no cólon. As características clínicas da CDI poderão variar entre diarreia moderada a colite pseudomembranosa que pode colocar a vida em risco, caracterizada por dores abdominais, diarreia abundante e sintomas sistémicos tais como febre, anorexia, náusea e indisposição.

O diagnóstico da CDI é geralmente estabelecido pela demonstração da presença das toxinas A e/ou B em amostras fecais. A demonstração do efeito citopático numa monocamada de células, pela acção da toxina B, é considerada por muitos como uma “norma de ouro”.^{13, 14} A demonstração do efeito citopático pode ser obtida por incubação directa de sobrenadante fecal na monocamada de células; alternativa-mente, isolados do *C. difficile* podem ser cultivados em caldo selectivo e o sobrenadante obtido é posteriormente incubado na monocamada celular (cultura toxigénica).¹⁵ Ambas as técnicas exigem um mínimo de 48 a 72 horas para um resultado final. São amplamente utilizados imunoensaios para a detecção das toxinas A e B, porque proporcionam resultados positivos em menos de 4 horas; contudo, a sensibilidade é significativamente menor quando comparado com culturas de tecidos.¹⁶ Comparado com critérios clínicos que suportam a CDI, foi observado que a PCR tinha valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos de respectivamente 93,3%, 97,4%, 75,5% e 99,4%,

com um tempo de resposta inferior a 4 horas.¹⁵ A PCR é considerada o teste ideal, único e rápido para a detecção de toxinas do *C. difficile*.¹⁷⁻²⁰ Apesar do drástico aumento da incidência e gravidade da CDI, o metronidazol ou a vancomicina continua a ser o tratamento médico preferido para episódios agudos e infecções recorrentes.²¹

As medidas de controlo da infecção incluem a utilização prudente de agentes antimicrobianos, a prevenção de infecção cruzada e a vigilância activa dos casos.²² Não é aconselhável a repetição de “testes de cura”, uma vez que as toxinas poderão estar presentes por longos períodos de tempo sem sintomas clínicos.

Assim, há uma grande necessidade de uma detecção rápida, automatizada e de alta sensibilidade do *C. difficile*. Os métodos moleculares oferecem a possibilidade de reduzir significativamente o tempo de detecção, permitindo assim a iniciação imediata de tratamento antimicrobiano e a implementação imediata de medidas de controlo da infecção.¹⁷⁻²⁰

Explicação do teste

O teste **cobas**® Cdiff contém dois processos principais: (1) preparação automatizada de amostras para extrair ácidos nucleicos de amostras fecais sem forma; (2) amplificação por PCR de sequências do ADN alvo usando iniciadores específicos do *C. difficile* e detecção em tempo real de sondas de detecção oligonucleotídicas específicas do *C. difficile* marcadas com corante fluorescente e clivadas. Antes da preparação automatizada de amostras, é adicionado a todas as amostras um Controlo Interno contendo uma sequência aleatória não relacionada de ADN, e é amplificado e detectado simultaneamente com cada amostra para monitorizar o processo inteiro.

Princípios do Procedimento

Preparação de amostras

A preparação de amostras para o teste **cobas**® Cdiff é automatizada com a utilização do equipamento **cobas**® x 480. Os organismos são lisados com agente caotrópico, proteinase K e reagentes SDS. Os ácidos nucleicos libertados, juntamente com o ADN do Controlo Interno adicionado, são ligados por partículas magnéticas de vidro. São lavados e depois eluídos num pequeno volume de tampão. O equipamento retira então uma alíquota do material eluído e prepara a reacção PCR com uma Mistura Principal activada.

Amplificação por PCR e detecção no TaqMan®

Os passos PCR de amplificação e detecção do sinal do alvo ocorrem no analisador **cobas**® z 480. O reagente de Mistura Principal contém pares de iniciadores e sondas para dois alvos: toxina B e Controlo Interno. Se estiverem presentes as sequências de ácido nucleico-alvo, a amplificação com os iniciadores correspondentes ocorrerá através de uma polimerase do ADN termoestável, gerando produtos da PCR (amplicon). Estes produtos são detectados por sondas TaqMan específicas contendo um corante fluorescente e um supressor. Geralmente o supressor suprime a fluorescência do corante. No entanto, se o produto da PCR estiver presente, a sonda hibridiza-se com o produto e é clivada pela actividade da nuclease 5' a 3' da polimerase. Esta reacção permite que seja emitida fluorescência do corante, e o sinal é registado em tempo real durante cada ciclo da PCR pelo analisador **cobas**® z 480. O sinal é interpretado pelo software do sistema **cobas**® 4800 e reportado como resultado final.

Amplificação selectiva

No teste **cobas**® Cdiff, a amplificação selectiva do ácido nucleico alvo da amostra é conseguida com a utilização de uma enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) e de trifosfato de desoxiuridina (dUTP). A enzima AmpErase reconhece e catalisa a destruição de cadeias de ADN que contêm desoxiuridina²³, mas não o ADN que contêm desoxitimidina. A desoxiuridina não se encontra no ADN natural, mas está sempre presente no amplicon, devido ao uso de trifosfato de desoxiuridina em vez de trifosfato de timidina como um dos dNTPs no reagente de Mistura Principal; por conseguinte, somente o amplicon contém desoxiuridina. A desoxiuridina torna o amplicon contaminante susceptível à destruição pela enzima AmpErase antes da amplificação do ADN alvo. A enzima AmpErase, que está incluída no reagente de Mistura Principal, catalisa a clivagem de ADN contendo desoxiuridina em resíduos de desoxiuridina, ao abrir a cadeia de desoxiribose na posição C1. Quando aquecida no primeiro passo de amplificação térmica, no pH alcalino da Mistura Principal, a cadeia de ADN do amplicon quebra-se na posição da desoxiuridina, tornando assim o ADN não amplificável. A enzima AmpErase é inactiva a temperaturas acima dos 55 °C, ou seja, durante os passos de amplificação térmica, pelo que não destrói o amplicon alvo. O teste **cobas**® Cdiff demonstrou inactivar pelo menos 1000 cópias de amplicon *C. difficile* contendo desoxiuridina, por PCR.

Materiais, reagentes e amostras

Materiais e reagentes fornecidos

Kit/Cassetes	Componentes e ingredientes reagentes	Quantidade por teste	Símbolo e Advertência de segurança
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Kit de Preparação de Amostras do sistema cobas® 4800) 240 testes (P/N: 05235782190)	MGP (Partículas Magnéticas de Vidro do sistema cobas® 4800) Partículas Magnéticas de Vidro 93% de isopropanol	10 × 4,5 ml	 PERIGO H225 Líquido e vapor facilmente inflamáveis. H319 Provoca irritação ocular grave. H336 Pode provocar sonolência ou vertigens. P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar. P233 Manter o recipiente bem fechado. P261 Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P280 Usar luvas de protecção/protecção ocular/protecção facial. P303 + P361 + P353 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche. P370 + P378 Em caso de incêndio: utilizar areia seca, pó químico ou espuma resistente ao álcool para a extinção.
	EB (Tampão de Eluição do sistema cobas® 4800) Tampão Tris 0,09% de azida sódica	10 × 18 ml	N/A

Kit/Cassetes	Componentes e ingredientes reagentes	Quantidade por teste	Símbolo e Advertência de segurança
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Kit de Preparação de Amostras do sistema cobas® 4800) 960 testes (P/N: 05235804190)	MGP (Partículas Magnéticas de Vidro do sistema cobas® 4800) Partículas Magnéticas de Vidro 93% de isopropanol	10 × 13,5 ml	 PERIGO H225 Líquido e vapor facilmente inflamáveis. H319 Provoca irritação ocular grave. H336 Pode provocar sonolência ou vertigens. P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar. P233 Manter o recipiente bem fechado. P261 Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P280 Usar luvas de protecção/protecção ocular/protecção facial. P303 + P361 + P353 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche. P370 + P378 Em caso de incêndio: utilizar areia seca, pó químico ou espuma resistente ao álcool para a extinção.
	EB (Tampão de Eluição do sistema cobas® 4800) Tampão Tris 0,09% de azida sódica	10 × 18 ml	N/A

Kit/Cassetes	Componentes e ingredientes reagentes	Quantidade por teste	Símbolo e Advertência de segurança
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 240 testes (P/N: 06768253190)	LYS-1 (Tampão de lise 1 do cobas® 4800 System) Citrato de sódio 5% de polidocanol 42,6% tiocianato de guanidina Ditiotretitol	10 × 10 ml	 PERIGO H302: Nocivo por ingestão. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. H411: Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos. EUH071: Corrosivo para as vias respiratórias. P273: Evitar a libertação para o ambiente. P280: Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial/proteção auditiva. P303 + P361 + P353: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água. P304 + P340 + P310: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P305 + P351 + P338 + P310: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P391: Recolher o produto derramado. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol
	PK (Protease K do cobas® 4800 System) Tampão Tris EDTA Cloreto de cálcio Acetato de cálcio < 2,0% de proteinase K Glicerina	10 × 0,9 ml	 PERIGO H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea. H334: Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. P261: Evitar respirar as névoas ou vapores. P280: Usar luvas de proteção. P284: Usar proteção respiratória. P304 + P340: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. P342 + P311: Em caso de sintomas respiratórios: contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. 39450-01-6 Proteinase, <i>Tritirachium album</i> serine
	SDS (Reagente SDS do cobas® 4800 System) Tampão Tris Dodecil sulfato de sódio 0,09% de azida de sódio	10 × 3 ml	N/A

Kit/Cassetes	Componentes e ingredientes reagentes	Quantidade por teste	Símbolo e Advertência de segurança
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 960 testes (P/N: 06768270190)	LYS-1 (Tampão de lise 1 do cobas® 4800 System) Citrato de sódio 5% de polidocanol 42,6% tiocianato de guanidina Ditiotretitol	10 × 36 ml	 PERIGO H302: Nocivo por ingestão. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. H411: Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos. EUH071: Corrosivo para as vias respiratórias. P273: Evitar a libertação para o ambiente. P280: Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial/proteção auditiva. P303 + P361 + P353: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água. P304 + P340 + P310: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P305 + P351 + P338 + P310: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P391: Recolher o produto derramado. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*, R*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol
	PK (Protease K do cobas® 4800 System) Tampão Tris EDTA Cloreto de cálcio Acetato de cálcio < 2,0% de proteinase K Glicerina	20 × 1,2 ml	 PERIGO H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea. H334: Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. P261: Evitar respirar as névoas ou vapores. P280: Usar luvas de proteção. P284: Usar proteção respiratória. P304 + P340: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. P342 + P311: Em caso de sintomas respiratórios: contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. 39450-01-6 Proteinase, <i>Tritirachium album</i> serine
	SDS (Reagente SDS do cobas® 4800 System) Tampão Tris Dodecil sulfato de sódio 0,09% de azida de sódio	10 × 9 ml	N/A

Kit/Cassetes	Componentes e ingredientes reagentes	Quantidade por teste	Símbolo e Advertência de segurança
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Kit de Tampão de Lavagem do sistema cobas® 4800) 240 testes (P/N: 05235863190)	WB (Tampão de Lavagem do sistema cobas® 4800) Citrato de sódio desidratado 0,05% de N-Metilisotiazolona-HCl	10 × 55 ml	N/A
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Kit de Tampão de Lavagem do sistema cobas® 4800) 960 testes (P/N: 05235871190)	WB (Tampão de Lavagem do sistema cobas® 4800) Citrato de sódio desidratado 0,05% de N-Metilisotiazolona-HCl	10 × 200 ml	N/A
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 (Kit de Controlo Interno 1 do sistema cobas® 4800) 20 corridas (P/N: 06768318190)	IC-1 (IC-1 do cobas® 4800) Tampão Tris EDTA < 0,01% de ARN de Poli rA (sintético) 0,05% de azida sódica < 0,01% de ADN não infeccioso e sintético do Controlo Interno, encapsulado em proteína coberta de bacteriófago Lambda	20 × 0,5 ml	N/A
cobas® 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit (Kit de Amplificação/ Detecção cobas® 4800 Cdiff) 80 testes (P/N: 06768237190)	Cdiff MMX (Mistura Principal cobas® Cdiff) Tampão de tricina EDTA DMSO Acetato de potássio Hidróxido de potássio Tween 20 < 0,19% de dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0,01% de iniciadores do <i>C. difficile</i> e do Controlo Interno a jusante e a montante < 0,01% de sondas de <i>C. difficile</i> e de Controlo Interno de marcação fluorescente < 0,01% de aptâmero oligonucleotídico < 0,01% de polimerase do ADN Z05 (de origem microbiana) < 0,02% de enzima de AmpErase (uracil-N-glicosilase) (de origem microbiana) 0,09% de azida sódica	10 × 0,3 ml	N/A

Kit/Cassetes	Componentes e ingredientes reagentes	Quantidade por teste	Símbolo e Advertência de segurança
cobas® 4800 Cdiff Controls and Cofactor Kit (Kit de Controlos e Co-factor cobas® 4800 Cdiff) 10 Corridas (P/N: 06768300190)	Cdiff (+) C (Controlo Positivo cobas® Cdiff) Tampão Tris EDTA < 0,01% de ARN de Poli rA (sintético) 0,05% de azida sódica < 0,01% de ADN de plasmídeo não infeccioso (de origem microbiana) contendo sequência de <i>C. difficile</i>	10 × 0,5 ml	N/A
	(-) C (Controlo Negativo do sistema cobas® 4800) Tampão Tris EDTA 0,05% de azida sódica < 0,01% de ARN de Poli rA (sintético)	10 × 0,5 ml	N/A
	Cofactor-3 (Co-factor 3 do cobas® 4800) Acetato de manganês Acetato de magnésio Albumina sérica bovina de plasma bovino originado nos Estados Unidos 0,09% de azida sódica	10 × 1,7 ml	N/A

Armazenamento e manuseamento de reagentes

Reagente	Temperatura de armazenamento	Tempo de armazenamento
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Kit de Preparação de Amostras do sistema cobas® 4800)	2 a 8 °C	Estável até ao fim do prazo de validade indicado
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Kit de Lise 1 do sistema cobas® 4800)	2 a 8 °C	Estável até ao fim do prazo de validade indicado
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 (Kit de Controlo Interno 1 do sistema cobas® 4800)	2 a 8 °C	Estável até ao fim do prazo de validade indicado
cobas® 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit (Kit de Amplificação/Detecção cobas® 4800 Cdiff)	2 a 8 °C	Estável até ao fim do prazo de validade indicado
cobas® 4800 Cdiff Controls and Cofactor Kit (Kit de Controlos e Co-factor cobas® 4800 Cdiff)	2 a 8 °C	Estável até ao fim do prazo de validade indicado
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Kit de Tampão de Lavagem do sistema cobas® 4800)	15 a 25 °C	Estável até ao fim do prazo de validade indicado

Nota: Não congelar os reagentes.

A data de validade do reagente baseia-se no Tempo Universal Coordenado (UTC). A hora local do prazo de validade do reagente pode ser ajustada para mais ou menos 12 horas, consoante o fuso horário local em relação ao UTC.

Materiais adicionais necessários

Materiais	P/N
Pontas CORE, 1000 µl, rack de 96	04639642001
Reservatório de reagente de 50 ml	05232732001
Reservatório de reagente de 200 ml	05232759001
Placa de extracção (poços fundos) do sistema cobas ® 4800	05232716001
Placa AD (microplaca) de 0,3 ml e Película vedante do sistema cobas ® 4800	05232724001
Aplicador de película vedante	04900383001
Suporte de 24 posições	04639502001
Saco de desperdícios sólidos	05530873001 (pequeno) ou 04691989001 (grande)
Manga de Plástico Hamilton STAR	04639669001
cobas ® PCR Media and Swab Sample Kit	07051891190
cobas ® PCR Media Uni Swab Sample Kit	07958030190
Luvas descartáveis, sem pó	São aceitáveis quaisquer luvas descartáveis sem pó.
Misturador de agitação forte (tubo único)	É aceitável qualquer misturador de agitação forte.
Centrífuga equipada com um rotor de cestos oscilantes com um mínimo de 1500 RCF	É aceitável qualquer centrífuga apropriada.

Para mais informações relativamente a materiais vendidos em separado, contacte o representante local da Roche.

Materiais opcionais

Materiais	P/N
Tampas de selagem ou tampa de placa de poços fundos	Roche 04789288001 ou Hamilton 6474-01
Tampas, cor neutra (para tapar os tubos após execução de amostras)	Roche P/N 07958056190; para tapar os tubos de base redonda de 13 ml após execução de amostras

Para mais informações relativamente a materiais opcionais, contacte o representante local da Roche.

Equipamentos e software necessários mas não fornecidos

Equipamentos e software necessários, não fornecidos
Sistema cobas ® 4800 Equipamento cobas ® x 480 Analisador cobas ® z 480 Unidade de controlo
Software de AP cobas ® Cdiff do sistema cobas ® 4800, versão 1.0.1 ou superior
Software de Aplicação (Core) do sistema cobas ® 4800, versão 2.2.0 ou superior

Para mais informações relativamente a materiais vendidos em separado, contacte o representante local da Roche.

Precauções e requisitos de manuseamento

Advertências e precauções

À semelhança do que sucede com qualquer procedimento de teste, boas práticas laboratoriais são essenciais para um desempenho adequado deste ensaio. Em virtude da elevada sensibilidade analítica deste teste, deverão ser tomadas as devidas precauções para manter os reagentes, as amostras e as misturas de amplificação isentas de contaminação.

- Apenas para diagnóstico *in vitro*.
- Evitar a contaminação dos reagentes e amostras por micróbios e ADN.
- Estão disponíveis Folhas de Dados de Segurança (SDS, Safety Data Sheets) que podem ser solicitadas ao representante local da Roche.
- O reagente LYS-1 contém tiocianato de guanidina. Não permita o contacto directo entre o tiocianato de guanidina e o hipoclorito de sódio (lixívia) ou outros reagentes altamente reactivos tais como ácidos ou bases. Essas misturas podem libertar gases nocivos.
- O MGP contém isopropanol e é facilmente inflamável. Manter afastado de chamas e ambientes propícios à produção de faíscas.
- Evite a exposição de MGP a fontes de campos magnéticos.
- Os EB, Cdiff MMX, SDS, Cofactor-3, (-)C, Cdiff (+)C e IC-1 contêm azida sódica.
- Para outras advertências, precauções e procedimentos para reduzir o risco de contaminação no **cobas®** x 480 instrument ou no **cobas®** z 480 analyzer, consulte a Assistência ao utilizador do **cobas®** 4800 System. Se houver suspeita de contaminação, efetue a limpeza e a manutenção semanal, conforme descrito na Assistência ao utilizador do **cobas®** 4800 System.
- Informe as autoridades competentes locais e o fabricante sobre quaisquer incidentes graves que possam ocorrer ao utilizar este ensaio.

Nota: Para instruções específicas, consulte “Colheita, transporte e armazenamento de amostras”.

Boas práticas laboratoriais

- Não efectue pipetagem com a boca.
- Não comer, beber ou fumar em áreas de trabalho laboratorial.
- Lave muito bem as mãos depois de manusear amostras e reagentes do kit.
- Ao manusear quaisquer reagentes, usar sempre protecção para os olhos, bata de laboratório e luvas descartáveis. Evitar o contacto destes materiais com a pele, olhos ou membranas mucosas. Se ocorrer contacto, lavar imediatamente com água em abundância. Caso não seja efectuado tratamento, podem surgir queimaduras. Se ocorrer derrame, diluir com água antes de secar.
- Limpe e desinfecte cuidadosamente todas as superfícies de trabalho do laboratório com uma solução preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água desionizada ou destilada (diluir lixívia doméstica a 1:10). Em seguida esfregue a superfície com um pano com etanol a 70%.

Contaminação

- Para evitar contaminação, devem ser usadas luvas que devem ser trocadas entre o manuseamento de amostras e de reagentes do **cobas®** Cdiff. Evite contaminar as luvas quando manusear amostras e controlos. Use luvas de laboratório, bata de laboratório e protecção ocular quando manusear amostras e reagentes do kit.
- Evite a contaminação microbiana e por ribonuclease dos reagentes.
- Poderão ocorrer resultados falsos-positivos se o carryover de amostras não for impedido durante a manipulação das amostras.
- As amostras deverão ser manuseadas como se fossem infecciosas, utilizando procedimentos de laboratório seguros, tais como os descritos em *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*²⁴ e no Documento M29-A4 do CLSI.²⁵

Integridade

- Não utilizar kits fora dos prazos de validade.
- Não misturar reagentes.
- Não utilizar produtos descartáveis que tiverem ultrapassado o respectivo prazo de validade.
- Não utilizar reagentes ou tubos que estão visivelmente danificados ou mostra sinais de fuga.
- Todos os itens descartáveis são para uma única utilização. Não reutilizar.
- Todos os equipamentos devem ser mantidos adequadamente, de acordo com as instruções do fabricante.

Eliminação

- Os reagentes do sistema **cobas®** 4800 e os reagentes específicos do teste **cobas®** Cdiff contêm azida sódica (consultar “**Advertências e precauções**”). A azida sódica pode reagir com tubagens de chumbo e de cobre, produzindo azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar soluções contendo azida sódica nos lavatórios do laboratório, lave os canos com um grande volume de água fria para impedir a formação de azidas.
- Eliminar os reagentes não utilizados e os desperdícios em conformidade com as regulamentações nacionais e locais.

Nota: Para a eliminação de resíduos líquidos, consulte a Assistência ao utilizador do **cobas® 4800 System**.

Derrames e limpeza

- O reagente LYS-1 contém tiocianato de guanidina. Caso ocorra derramamento de líquido que contenha tiocianato de guanidina, limpar com detergente laboratorial adequado e água. Se o líquido derramado contiver agentes potencialmente infecciosos, limpar PRIMEIRO a área afectada com detergente laboratorial e água e em seguida com hipoclorito de sódio a 0,5%.
- Se o derramamento ocorrer no **cobas®** 4800 instrument, siga as instruções de limpeza apresentadas na Assistência ao utilizador do **cobas®** 4800 System.
- Não utilize solução de hipoclorito de sódio (lixívia) para a limpeza do **cobas®** x 480 instrument ou do **cobas®** z 480 analyzer. Limpe o **cobas®** x 480 instrument ou o **cobas®** z 480 analyzer de acordo com os procedimentos descritos na Assistência ao utilizador do **cobas®** 4800 System.

Colheita, transporte e armazenamento de amostras

Nota: Manusear todas as amostras tendo em conta a possibilidade de transmitirem agentes infecciosos.

Colheita de amostras

Efectue a colheita de amostras fecais sem forma para um recipiente esterilizado. As amostras deverão ser colhidas seguindo o procedimento descrito nos procedimentos operacionais standard da sua instituição.

Armazenamento e estabilidade das amostras durante o transporte

As amostras fecais sem forma mantêm-se estáveis entre 2 e 30 °C durante 2 dias, ou entre 2 e 8 °C durante 7 dias e a -20 °C durante 60 dias antes de serem testadas no sistema **cobas® 4800** (isto foi demonstrado testando amostras depois de armazenamentos consecutivos a 30 °C ± 1 °C durante 2 dias, seguido de armazenamento entre 2 e 8 °C durante 5 dias, seguido de armazenamento a -20 °C durante 60 dias).

As amostras fecais misturadas com o **cobas® PCR Media** mantêm-se estáveis entre 2 e 8 °C durante 60 dias ou a 30 °C durante 7 dias antes de serem testadas no sistema **cobas® 4800**.

O transporte de amostras de *C. difficile* deve obedecer às regulamentações nacionais, federais, estaduais e locais relativas ao transporte de agentes etiológicos.

Procedimento de teste

Execução do teste

Fluxo de trabalho

Figura 1: Fluxo de trabalho do **cobas® Cdiff**

1	Iniciar o sistema.
2	Executar a manutenção do equipamento.
3	Retirar as amostras e os reagentes do armazenamento.
4	Iniciar corrida: Carregar suportes com amostras.
5	Com LIS: confirmar ordem de trabalho Sem LIS: criar ordem de trabalho
6	Carregar consumíveis (placa de poços fundos, microplaca, racks de pontas) e reagentes
7	Iniciar corrida de preparação de amostras
8	Descarregar e selar microplaca
9	Retirar amostras, reagentes usados e placa de poços fundos.
10	Carregar microplaca no analisador
11	Examinar resultados
12	Com LIS: enviar resultados para o LIS
13	Descarregar analisador

Instruções de Utilização

Todos os reagentes excepto a Cdiff MMX e o Co-factor 3 devem estar à temperatura ambiente antes de serem carregados no equipamento **cobas**® x 480. Os reagentes Cdiff MMX e Co-factor 3 podem ser retirados directamente do armazenamento entre 2 e 8 °C, porque na altura que forem usados no processo a bordo do equipamento **cobas**® x 480, já estarão à temperatura ambiente.

Nota: Para instruções de operação detalhadas, consulte a Assistência ao utilizador do cobas® 4800 System.

Tamanho da corrida

O sistema **cobas**® 4800 foi concebido para fazer corridas mistas de testes **cobas**® MRSA/SA, **cobas**® Cdiff e **cobas**® HSV 1 e 2. O kit genérico de Preparação de Amostras do sistema **cobas**® 4800, o kit genérico de Lise 1 do sistema **cobas**® 4800 e o kit genérico de Tampão de Lavagem do sistema **cobas**® 4800 estão disponíveis em dois tamanhos de kit, cada um suficiente para 10 corridas de até 24 ou até 96 amostras, incluindo os controlos e amostras para todos os ensaios a executar. O kit de Amplificação/Deteção **cobas**® 4800 Cdiff é suficiente para testar até 80 amostras, incluindo os controlos e amostras Cdiff a executar. Podem ser utilizados vários frascos do reagente de Mistura Principal do **cobas**® 4800 Cdiff, conforme for apropriado numa corrida, desde que tenham o mesmo tamanho de kit. O kit genérico de Controlo Interno 1 do sistema **cobas**® 4800 e o kit de Controlos e Co-factor **cobas**® 4800 Cdiff estão disponíveis num único tamanho de kit, e podem suportar todas as configurações de corridas. Para cada corrida contendo amostras *C. difficile*, tem de ser utilizado um Controlo Positivo **cobas**® 4800 Cdiff e um Controlo Negativo do sistema **cobas**® 4800 (consultar “**Controlo de qualidade**”). Para uma única corrida de teste, o número máximo permitido de amostras é 94 amostras e 2 controlos.

Nota: Embora não tenha um uso ideal de reagentes, um reagente genérico para 96 testes pode ser utilizado para uma corrida contendo um total de 1 a 22 amostras. No entanto, não podem ser misturados tamanhos diferentes do kit de Tampão de Lavagem do sistema cobas® 4800, do kit de Preparação de Amostras do sistema cobas® 4800 e do kit de Lise 1 do sistema cobas® 4800. Por exemplo, se no início da corrida for registado um frasco de reagente de Tampão de Lavagem para 96 testes, devem ser usados também reagentes para 96 testes dos outros dois kits.

Fluxo de trabalho

O teste **cobas**® Cdiff é executado utilizando o fluxo de trabalho “Full workflow” (fluxo de trabalho Completo) no software **cobas**® 4800. Este fluxo de trabalho consiste na preparação de amostra no **cobas**® x 480 instrument, seguida de amplificação/deteção no **cobas**® z 480 analyzer. A corrida pode ser só de Cdiff, ou pode ser misturada com o teste **cobas**® MRSA/SA e/ou teste **cobas**® HSV 1 e 2. Para obter detalhes, consulte a Assistência ao utilizador do **cobas**® 4800 System.

Transferir amostra para tubo cobas® PCR Media

1. Utilize uma zaragatoa de poliéster para transferir a amostra fecal para o tubo **cobas**® PCR Media – ignore a segunda zaragatoa que vem embalada no pacote (se aplicável). Sem tocar na parede lateral do recipiente onde se encontra a amostra fecal, mergulhe a ponta da zaragatoa totalmente na amostra fecal até ao fim da secção cónica, e depois retire sem demora a zaragatoa inoculada e coloque-a no tubo **cobas**® PCR Media. Não teste a amostra se esta não tiver quantidade suficiente para submergir totalmente a ponta da zaragatoa.

2. Quebre a haste da zaragatoa pela marca a cinzento, fazendo pressão contra o lado do tubo. Tape o tubo e misture com agitação forte durante pelo menos 5 segundos. Destape o(s) tubo(s) e coloque-o(s) em rack(s) de amostras de 24 posições, para processamento. Elimine as tampas.

Nota: O teste cobas® Cdiff foi validado para ser utilizado com o cobas® PCR Media Kit, cobas® PCR Media Uni Swab Sample Kit e o cobas® PCR Media Dual Swab Sample Kit. Não utilize outros dispositivos ou outros tipos de meios.

Nota: Utilize apenas uma zaragatoa de poliéster para transferir matéria fecal. Excesso de matéria fecal transferida para o Meio cobas® PCR poderá causar coalhos e/ou resultados inválidos.

Nota: As amostras fecais devem ser transferidas para tubos de Meio cobas® PCR rotulados com um código de barras adequado, para processamento no equipamento cobas® x 480. Consulte a Assistência ao utilizador do cobas® 4800 System para os procedimentos de colocação apropriada de códigos de barras e para a lista de códigos de barras que são aceites pelo cobas® 4800 System.

Nota: Para evitar contaminação cruzada de suspensões de amostra fecal em cobas® PCR Media, deverão ser utilizadas novas tampas de cor diferente (neutra; consultar “Materiais opcionais”) para tapar os tubos de amostras em cobas® PCR Media após o processamento.

Nota: O cobas® PCR Media contém volume suficiente para analisar várias vezes a suspensão fecal no sistema cobas® 4800. O volume mínimo de suspensão fecal para executar uma corrida cobas® Cdiff é 3 ml num tubo cobas® PCR Media.

Execução de um teste cobas® Cdiff

Nota: Podem ser executadas corridas mistas entre o teste cobas® MRSA/SA e o teste cobas® Cdiff e/ou o teste cobas® HSV 1 e 2. Para mais informações, consulte a Assistência ao utilizador do cobas® 4800 System.

1. Efetue o arranque do sistema e os procedimentos de manutenção, seguindo as instruções da Assistência ao utilizador do **cobas® 4800 System**.
2. Reúna todos os reagentes e consumíveis necessários. Os reagentes devem estar à temperatura ambiente na altura em que a corrida é iniciada, à excepção dos reagentes **cobas® Cdiff MMX** e Cofactor-3.

Nota: Todos os reagentes e reservatórios de reagentes têm códigos de barras e foram concebidos para serem utilizados uma só vez. O software cobas® 4800 detecta a utilização dos reagentes e dos reservatórios de reagentes e rejeita os reagentes ou reservatórios de reagentes utilizados anteriormente.

3. Inicie uma nova corrida definindo a ordem de trabalho da corrida. Existem três maneiras de criar uma ordem de trabalho:
 - Utilizando o editor de amostras antes de carregar a rack de amostras no equipamento **cobas® x 480** (botão “Editor” à direita do menu principal). As ordens de trabalho podem ser guardadas, editadas e recarregadas, se necessário.
 - Seguindo o assistente do software para a nova corrida e carregando as amostras no equipamento **cobas® x 480** quando o sistema solicitar. Os códigos de barras das amostras serão automaticamente lidos e são registados os testes pretendidos para cada amostra.
 - Utilizando o sistema LIS da sua instituição.

Para mais detalhes, consulte a Assistência ao utilizador do **cobas®** 4800 System. Quando seleccionar os resultados pretendidos, marque “Cdiff”.

4. Carregue amostras e defina/selecione a ordem de trabalho ou utilize o LIS, conforme apropriado. A opção “Unload sample carriers after transferring to deep well plate” está seleccionada por predefinição. Isto permite ao operador obter as amostras restantes de suspensões fecais o mais rapidamente possível, depois de serem divididas em alíquotas para processamento pelo equipamento **cobas®** x 480. Os recipientes de suspensões fecais devem ser tapados com novas tampas (ver “**Materiais opcionais**”), caso seja necessário armazená-los.
5. Siga as indicações do assistente do software para carregar consumíveis. Não coloque ou retire pontas individuais de uma rack de pontas parcialmente usada, uma vez que o software regista o número de pontas que sobra. Se não houver pontas suficientes para executar a corrida, o software alerta o utilizador.
6. Carregue os reagentes de preparação de amostras nos reservatórios de reagentes com códigos de barras. Os reservatórios de reagentes estão disponíveis em dois tamanhos: 200 ml e 50 ml. Siga as indicações do assistente do software para seleccionar o tamanho correcto do reservatório de reagente. Os códigos de barras dos reservatórios de reagentes devem estar virados para a direita do suporte. Utilize o método “ler-ler-verter-colocar” para carregar os reagentes de preparação de amostras:
 - Faça a leitura do código de barras do frasco de reagente
 - Faça a leitura do código de barras do reservatório de reagente
 - Verta o reagente no reservatório
 - Coloque o reservatório de reagente cheio no suporte de reagentes na posição designada

Nota: O sistema cobas® 4800 dispõe de um relógio interno para monitorizar o intervalo de tempo que os reagentes estão a bordo do equipamento. Uma vez lido o WB, dispõe de 1 hora para concluir o processo de carregamento e clicar no botão “Start”. Aparece um temporizador de contagem decrescente no separador “Workplace”. O sistema não permite que a corrida se inicie se tiver expirado o tempo a bordo do equipamento.

Nota: Para garantir a precisão da transferência do MGP, agite vigorosamente o frasco de MGP imediatamente antes de o dispensar no reservatório de reagente.

7. Carregue os reagentes de amplificação/deteção (Cdiff MMX e Co-factor 3), o Proteinase K (PK) e os controlos [Cdiff (+) C, IC e (–) C] directamente no suporte de reagentes. De modo a evitar contaminação, é necessário trocar as luvas depois de manusear controlos positivos.

Nota: O assistente do software calcula o número e o tamanho ideal de reagente cobas® Cdiff MMX a utilizar. Isto será indicado na coluna “Kit size” do ecrã de carregamento de MMX e Co-factor. Para usar um tamanho diferente de reagente cobas® Cdiff MMX, clique no botão “Change kit size”.

8. Inicie a preparação de amostras clicando em “Start Run”.
9. Depois de concluída com êxito a corrida de preparação de amostras, ficam disponíveis os botões “Sample Preparation results” e “Unload”. Se desejar examinar os resultados, selecione o botão “Sample Preparation results” e depois selecione “Unload” para descarregar os suportes de placas. Alternativamente, selecione “Unload” para descarregar o suporte de placas sem examinar os resultados. Consulte a Assistência ao utilizador do **cobas®** 4800 System.
10. Siga as instruções da Assistência ao utilizador do **cobas®** 4800 System para selar a microplaca, transportar a placa para o **cobas®** z 480 analyzer e iniciar a corrida de amplificação e deteção.

Nota: O sistema cobas® 4800 dispõe de um relógio interno para monitorizar o intervalo de tempo após a adição da mistura principal às amostras preparadas. A amplificação e detecção deverão ser iniciadas o mais cedo possível, mas nunca depois de 90 minutos após o final da corrida no cobas® x 480 instrument. Aparece um temporizador de contagem decrescente no separador “Workplace”. O sistema cancela a corrida se tiver expirado o tempo a bordo do equipamento.

11. Quando a corrida de amplificação e detecção estiver concluída, descarregue a microplaca do **cobas® z 480 analyzer**.
12. Para conferir e aceitar resultados, siga as instruções da Assistência ao utilizador do **cobas® 4800 System**.

Resultados

Controlo de qualidade e validade dos resultados

Numa corrida é incluído sempre um conjunto de Controlos Negativo e Positivo do teste **cobas® Cdiff**. Em qualquer corrida, para apresentar os resultados do teste **cobas® Cdiff** dessa corrida, têm de ser obtidos resultados válidos para ambos os Controlos Positivo e Negativo do software **cobas® 4800**.

Controlo positivo

O Controlo Cdiff (+) contém ADN de plasmídeos não infecciosos do *C. difficile*. O Controlo Cdiff (+) monitoriza os passos de extracção, amplificação e detecção de uma determinada corrida do teste. O resultado do Controlo Cdiff (+) deve ser “Valid”. Se os resultados do Controlo Cdiff (+) forem, de forma consistente, “Invalid”, contacte o representante local da Roche, para obter assistência técnica.

Controlo negativo

O resultado do Controlo (–) deve ser “Valid”. Se os resultados do Controlo (–) forem, de forma consistente, “Invalid”, contacte o representante local da Roche, para obter assistência técnica.

Controlo Interno

O Controlo Interno é um recombinante bacteriófago lambda que contém alvos e sequências aleatórias de sondas e iniciadores específicos do controlo interno. O Controlo Interno é adicionado a todas as amostras e aos Controlos Positivo e Negativo durante a preparação de amostras no equipamento **cobas® x 480**. O Controlo Interno monitoriza os passos de extracção, amplificação e detecção de ácido nucleico de uma determinada amostra. O Controlo Interno também é necessário para a validação dos controlos da corrida.

Interpretação dos resultados

Nota: A validação de todos os ensaios e corridas é determinada pelo software cobas® 4800.

Nota: Uma corrida válida poderá incluir resultados de amostras válidos e inválidos.

Para uma corrida válida, os resultados de amostra são interpretados conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1 Interpretação de resultados do teste cobas® Cdiff

Teste cobas® Cdiff	Relatório e Interpretação de Resultados
POS Cdiff	Positivo para o Cdiff A amostra é positiva para a presença de ADN de <i>C. difficile</i> .
NEG Cdiff	Negativo para o Cdiff* Não foi detectado ADN do <i>C. difficile</i> , caso presente.
Invalid	Inválido O resultado é inválido. A amostra original deverá ser novamente testada para obter um resultado válido. Coloque uma nova tampa no tubo que contém a suspensão fecal que obteve um resultado inválido e misture com agitação forte durante pelo menos 5 segundos. Adicione 0,5 ml da suspensão fecal que foi sujeita a agitação forte a um novo tubo contendo cobas® PCR Media. Tape o tubo diluído e misture com agitação forte durante pelo menos 5 segundos. Destape e coloque o tubo diluído na rack de amostras de 24 posições para processamento.
Failed	Nenhum resultado para a amostra Para instruções sobre como analisar alarmes de corridas e as ações recomendadas, consulte a Assistência ao utilizador do cobas® 4800 System. Em raros casos, quando ocorre um erro de pipetagem (por ex., um coágulo ou outra obstrução), o tubo com a suspensão fecal original deverá ser fechado com uma nova tampa e colocado numa centrífuga. Acelere para 1800 RCF (ou 1800 × g) e depois pare. Certifique-se de que o frasco não é sacudido ou misturado depois da centrifugação. Destape o tubo e coloque-o na rack de amostras de 24 posições, para processamento.

*Um resultado negativo não exclui a presença de ADN de *C. difficile*, porque os resultados dependem de uma colheita de amostra adequada, da ausência de inibidores e de ADN suficiente para poder ser detectado.

Poderão ser obtidos resultados inválidos se as amostras contiverem matéria fecal em excesso ou substâncias inibidoras que impeçam a extracção do ácido nucleico alvo e/ou a sua amplificação e detecção. Para as substâncias interferentes conhecidas, consulte a secção “**Limitações do procedimento**”.

Nota: O volume mínimo de suspensão fecal necessária para o teste **cobas®** Cdiff é 3 ml.

Lista de alarmes de resultados

A tabela que se segue apresenta uma lista dos alarmes que são relevantes para a interpretação de resultados.

Tabela 2 Lista de alarmes do teste cobas® Cdiff

Teste cobas® Cdiff	Teste cobas® Cdiff	Relatório e interpretação de resultados
R20	O controlo positivo é inválido.	Um controlo externo é inválido. 1. Repita a corrida inteira com novos reagentes. 2. Se o problema persistir, contacte a assistência da Roche.
R21	O controlo negativo é inválido.	Um controlo externo é inválido. 1. Repita a corrida inteira com novos reagentes. 2. Se o problema persistir, contacte a assistência da Roche.
X3	Erro: Foi detetado um coágulo. A amostra não foi processada.	Certifique-se de que as amostras foram manuseadas de acordo com a descrição do fluxo de trabalho. 1. Verifique a amostra quanto a coágulos. 2. Execute novamente a amostra.
X4	Erro: ocorreu um erro de pipetagem. A amostra não foi processada.	O motivo mais provável deverá ser um volume de amostra insuficiente ou um erro mecânico durante a pipetagem. 1. Assegure-se de que há volume de amostra suficiente. 2. Verifique se a placa de ejeção de pontas está colocada corretamente. 3. Execute novamente a amostra.

Limitações do procedimento

1. O teste cobas® Cdiff só foi validado para ser utilizado com amostras fecais sem forma que tenham sido transferidas para o cobas® PCR Media de acordo com este documento de instruções de utilização.
2. A obtenção de resultados fiáveis está dependente da colheita, transporte, armazenamento e processamento adequados das amostras. Siga os procedimentos deste documento de instruções de utilização (também designado como um folheto informativo) e a Assistência ao utilizador do cobas® 4800 System.
3. A detecção de ADN do *C. difficile* depende do número de organismos presentes na amostra e poderá ser afectada pelos métodos de colheita/processamento das amostras, o histórico de hospitalizações, o regime de tratamento antibiótico e as estirpes de *C. difficile*.
4. Devido à interferência de várias substâncias, poderão ocorrer resultados falsos-negativos ou inválidos. O Controlo Interno está incluído no teste cobas® Cdiff para ajudar a identificar as amostras que contêm substâncias passíveis de interferir com o isolamento do ácido nucleico e a amplificação por PCR. As substâncias interferentes conhecidas incluem, mas podem não se limitar, às seguintes:
 - As amostras que contêm mais do que 25% (peso/volume) de mucina podem gerar resultados falsos-negativos.
5. Um resultado positivo é indicativo da presença de ADN do *C. difficile*, mas não necessariamente de organismos viáveis. Por conseguinte, um resultado positivo não significa necessariamente a falha do tratamento de erradicação.

6. Mutações ou polimorfismos em regiões de ligação do iniciador ou da sonda poderão afectar a detecção de variantes novas ou desconhecidas, originando um resultado falso-negativo com o teste **cobas®** Cdiff.
7. O valor previsto de um ensaio depende da prevalência da doença numa determinada população.
8. A adição de enzima AmpErase à Mistura Principal **cobas®** 4800 Cdiff permite a amplificação selectiva do ADN alvo; no entanto, para evitar a contaminação dos reagentes e das misturas de amplificação, é necessário observar boas práticas laboratoriais e cumprir cuidadosamente os procedimentos especificados neste documento de instruções de utilização.
9. A utilização deste produto deve estar limitada a pessoal com formação em técnicas de PCR e na utilização do sistema **cobas®** 4800.
10. Apenas o equipamento **cobas®** x 480 e o analisador **cobas®** z 480 foram validados para utilização com este produto. Nenhum outro equipamento de preparação de amostras ou Sistema de PCR pode ser utilizado com este produto.
11. Devido a diferenças básicas entre tecnologias, recomenda-se que, antes de mudar de uma tecnologia para outra, os utilizadores realizem estudos de correlação de métodos nos seus laboratórios, para identificar as diferenças tecnológicas e verificar o novo procedimento. Não se prevê uma concordância de cem por cento entre os resultados, devido às diferenças anteriormente referidas entre tecnologias.
12. A contaminação cruzada pode causar resultados falsos-positivos. O sistema **cobas®** 4800 é um equipamento de PCR automático em tempo real concebido para minimizar o risco de contaminação cruzada durante o processamento de amostras, extracção, amplificação e detecção do ácido nucleico. Para desafiar a robustez do sistema, foi executado um estudo tipo "xadrez" simulado, não-clínico num painel de amostras artificiais alternadas altamente positivas e negativas para avaliar uma taxa de contaminação cruzada teórica do sistema. As amostras altamente positivas apresentavam valores Ct antes do observado em 95% dos doentes infectados na população de utilização pretendida. A taxa de contaminação cruzada determinada neste estudo tipo "xadrez" foi de 0,24% (1/423). As taxas de contaminação cruzada em cenários clínicos dependem da proporção de amostras altamente positivas e da prevalência da doença. Espera-se que as taxas de contaminação cruzada clínicas de rotina sejam muito mais baixas do que foi observado neste estudo e devem ser avaliadas nas definições do utilizador.

Avaliação do desempenho não clínico

Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica (Limite de Detecção ou LOD) do teste **cobas**® Cdiff foi determinada por análise quantificada de culturas do *C. difficile* diluídas a vários níveis de concentração, numa suspensão de fundo fecal negativo em **cobas**® PCR Media. Todos os níveis foram testados utilizando o teste **cobas**® Cdiff com três lotes diferentes de reagentes do teste **cobas**® Cdiff. Em cada nível, foram testadas pelo menos 21 réplicas por lote de reagente. O LOD para este teste é definido como a concentração do alvo que pode ser detectada como positiva em $\geq 95\%$ das réplicas testadas, com base nos resultados gerados pelo lote de reagente de pior desempenho.

A Tabela 3 apresenta as 7 estirpes do *C. difficile* testadas no estudo de sensibilidade analítica.

Tabela 3 Limite de Detecção (LOD) do teste **cobas**® Cdiff

ID da estirpe	Toxinotipo	Tipo de REA*	Tipo de PFG†	Ribotipo	Fenótipo	LOD (CFU/zaragatoa)	
						por taxa de positivos	por análise Probit
ATCC 43255 (VPI 10463)	0	N/A	N/A	087	A+B+CDT-	113	90
ATCC BAA-1382 (630)	0	R 23	N/A	012	A+B+CDT-	81	83
CDC 204118	III	BI 8	NAP1	027	A+B+CDT+	54	42
R12087 (CD196)	III	BI	NAP1	027	A+B+CDT+	54	54
2748-06	V	N/A	N/A	078	N/A	54	45
ATCC 43598 (VPI 1470)	VIII	N/A	N/A	017	A-B+	225	130
F15	XII	N/A	N/A	N/A	N/A	54	59

*Análise de restrição com endonucleases; †Gel de campo pulsado

Detecção de genótipos do *C. difficile*

Foi verificado o limite de detecção do teste **cobas**® Cdiff em 28 estirpes toxigénicas representando toxinotipos adicionais, testando 40 réplicas por nível, a vários níveis. Foram preparadas diluições e amostras de teste de uma maneira semelhante à descrita atrás no estudo do Limite de Detecção (LOD). A Tabela 4 apresenta o nível mais baixo em que se observou uma taxa de positividade de pelo menos 95%.

Todas as 28 estirpes toxigénicas (Tabela 4) foram detectadas como positivas em $\geq 95\%$ das réplicas testadas a concentrações que variavam entre 77,9 CFU/zaragatoa e 460 CFU/zaragatoa.

Tabela 4 Resumo dos resultados da verificação toxigénica do *C. difficile*

Estirpe	Toxinotipo	Ribotipo	Conc. (CFU/zaragatoa)	Taxa de positivos
EX 623	I	102	77,9	95,0%
AC 008	II	103	77,9	95,0%
SE 844	IIIa	080	234	100,0%
55767	IV	023	77,9	100,0%
SE 881	V	045	234	100,0%
51377	VI	N/A	234	100,0%
57267	VII	063	77,9	97,5%
51680	IX	019	77,9	100,0%
8864	X	036	77,9	97,5%
R 9367	XIII	070	77,9	97,5%
R 10870	XIV	111	234	100,0%
R 9385	XV	122	234	100,0%
SUC36	XVI	078	234	100,0%
J9965	XVII	N/A	460	97,5%
K095	XVIII	014	234	95,0%
TR13	XIX	N/A	234	97,5%
TR14	XX	N/A	77,9	100,0%
CH6223	XXI	N/A	234	100,0%
CD07-468	XXII	N/A	234	100,0%
8785	XXIII	N/A	234	95,0%
597B	XXIV	131	234	97,5%
7325	XXV	027	234	100,0%
7459	XXVI	N/A	234	95,0%
KK2443-2006	XXVII	N/A	234	100,0%
CD08-070	XXVIII	126	234	97,5%
CD07-140	XXIX	056	234	97,5%
ES 130	XXX	N/A	234	100,0%
WA 151	XXXI	N/A	460	100,0%

Precisão

Foi realizado um estudo de precisão interno utilizando um painel composto por culturas de *C. difficile* diluídas numa suspensão fecal negativa em **cobas®** PCR Media, para níveis de concentração abaixo do Limite de Detecção (LOD), perto do LOD e acima do LOD do teste **cobas®** Cdiff. Também foi testado um nível negativo composto apenas da suspensão fecal em **cobas®** PCR Media. O estudo utilizou 3 lotes de reagentes exclusivos do teste **cobas®** Cdiff e 3 equipamentos, para um total de 36 corridas num período de tempo de 12 dias. A Tabela 5 apresenta uma descrição dos painéis de precisão e o resumo do estudo. A análise dos componentes de variação (Tabela 6) sugeriu que grande parte da variabilidade dos valores Ct alvo se deve a factores dentro da corrida (aleatórios) e lote para lote (60,0% e 25,3%, respectivamente) para um nível de concentração a nível ou próximo do LOD. Para um nível de concentração superior ao LOD, grande parte da variabilidade do valor se deve a factores dentro da corrida (aleatórios) e de instrumento para instrumento (72,5% e 24,7%, respectivamente). Os resultados (Tabela 7) indicam que os valores Ct alvo apresentam um CV geral (%) de 1,5% para um nível de concentração no LOD e 1,1% para um nível de concentração superior ao LOD.

Tabela 5 Estudo de precisão interno com análise de taxa de positividade

Membro do Painel	N.º testados	N.º positivos	Taxa de positivos	LC de 95%	
				Inferior	Superior
Negativo	72	0	0,0%	0,0%	5,0%
< 1 x LOD	72	21	29,2%	19,0%	41,1%
~ 1 x LOD	72	72	100,0%	95,0%	100,0%
~ 3 x LOD	72	72	100,0%	95,0%	100,0%

LOD = Limite de detecção

Tabela 6 Análise dos componentes de variação dos membros do painel de precisão

Nível	Média	Componentes de variação / Percentagem de contribuição do total					Total
		Lote	Equipamento	Tamanho do kit	Dia	Aleatório	
~ 1 x LOD	38,5	0,0789	0,0189	0,0001	0,0270	0,1875	0,3123
		25,25%	6,04%	0,03%	8,65%	60,03%	100,00%
~ 3 x LOD	37,5	0,0047	0,0404	0,0000	0,0000	0,1188	0,1638
		2,84%	24,65%	0,00%	0,00%	72,51%	100,00%

LOD = Limite de detecção

Tabela 7 Análise dos desvios padrão e coeficientes de variação (%) dos membros do painel de precisão

Nível	Média	Componentes do DP/CV (%)					Total
		Lote	Equipamento	Tamanho do kit	Dia	Aleatório	
~ 1 x LOD	38,5	0,28	0,14	0,01	0,16	0,43	0,56
		0,73%	0,36%	0,03%	0,43%	1,12%	1,45%
~ 3 x LOD	37,5	0,07	0,20	0,00	0,00	0,34	0,40
		0,18%	0,54%	0,00%	0,00%	0,92%	1,08%

LOD = Limite de detecção

Especificidade analítica

Para avaliar a especificidade analítica do teste **cobas**® Cdiff, foram testados os seguintes painéis de organismos: 1) 103 bactérias, fungos e vírus que podem ser encontrados em amostras fecais e uma célula humana (Tabela 8); 2) 28 organismos do género *Clostridiaceae*, incluindo o *C. difficile* não toxigénico (* citomegalovírus (HHV5) foi adicionado a $2,0 \times 10^3$ PFU/ml, adenovírus humano tipo 40 adicionado a $2,2 \times 10^3$ PFU/ml e o rotavírus humano adicionado a $9,8 \times 10^3$ PFU/ml para testes – Tabela 9).

Todas as bactérias e células humanas foram adicionadas numa concentração de 1×10^6 Unidades*/ml e todos os vírus foram adicionados a 1×10^5 Unidades*/ml, excepto o citomegalovírus (HHV5), adenovírus tipo 40 e o rotavírus humano, que foram adicionados a uma concentração mais baixa devido a limitações de concentração de stock. Os testes foram executados com os organismos sozinhos ou com dois isolados do *C. difficile* presentes individualmente a 3 x o Limite de Detecção (LOD) do teste **cobas**® Cdiff. Os resultados indicaram que nenhum destes organismos interferia com a detecção dos alvos Cdiff pretendidos. Nenhum produziu resultados falsos-positivos quando não estavam presentes quaisquer dos alvos *C. difficile* pretendidos.

A especificidade analítica do *Clostridium botulinum* foi confirmada utilizando o programa BLAST em comparação com a base de dados de sequências de nucleóticos GenBank para imitar o passo de geração de amplicons da PCR.

* As bactérias foram quantificadas em unidades formadoras de colónias (CFU)/ml, as células humanas em células/ml e os vírus foram quantificados em unidades formadoras de placas (PFU)/ml, excepto os seguintes microorganismos. O *Chlamydia trachomatis* foi quantificado como corpo elementar (EB)/ml. Citomegalovírus, ecovírus humano e enterovírus humano foram quantificados como UI/ml.

Tabela 8 Microorganismos e células humanas

<i>Abiotrofia defectiva</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	<i>Anaerococcus tetradius</i>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13472	<i>Bacteroides caccae</i>
<i>Bacteroides merdae</i>	<i>Bacteroides stercoris</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Campylobacter coli</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida catenulata</i>	<i>Cedecea davisae</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar L2	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Citrobacter sedlakii</i>	<i>Collinsella aerofaciens</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Desulfovibrio piger</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>
<i>Eggerthella lenta</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Enterococcus cecorum</i>	<i>Enterococcus dispar</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i> vanA	<i>Enterococcus gallinarum</i> vanC
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Escherichia hermannii</i>
<i>Fusobacterium varium</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gemella morbillorum</i>
<i>Hafnia alvei</i>	Células humanas HCT-15	<i>Helicobacter fennelliae</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subespécie <i>pneumoniae</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Leminorella grimonii</i>	<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria innocua</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Mitsuokella multacida</i>	<i>Mobiluncus curtisii</i>
<i>Moellerella wisconsensis</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Proteus penneri</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
<i>Providencia stuartii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Ruminococcus bromii</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i> subespécie <i>choleraesuis</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (f.k.a. <i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>arizonae</i>)
<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Shigella boydii</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Trabulsiella guamensis</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Yersinia bercovieri</i>
<i>Yersinia rohdei</i>	Citomegalovírus (HHV5)*	Adenovírus humano tipo 40*
Coxsackievírus humano A10	Enterovírus humano 11	Enterovírus humano 71
Rotavírus humano*	Norovírus GI	-

*O citomegalovírus (HHV5) foi adicionado a $2,0 \times 10^3$ PFU/ml, o adenovírus humano tipo 40 a $2,2 \times 10^3$ PFU/ml e o rotavírus humano a $9,8 \times 10^3$ PFU/ml para os testes.

Tabela 9 Organismos do género *Clostridiaceae*, incluindo o *C. difficile* não toxigénico

<i>Clostridium beijerinckii</i>	<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Clostridium bolteae</i>
<i>Clostridium botulinum</i> *	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium chauvoei</i>
<i>Clostridioides difficile</i> Serogrupo B (não toxigénico)	<i>Clostridioides difficile</i> Serogrupo I (não toxigénico)	<i>Clostridium fallax</i>
<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Clostridium innocuum</i>
<i>Clostridium methylpentosum</i>	<i>Clostridium nexile</i>	<i>Clostridium novyi</i>
<i>Clostridium orbiscindens</i> (novo nome: <i>Flavonifractor plautii</i>)	<i>Clostridium paraputrificum</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Clostridium ramosum</i>	<i>Clostridium scindens</i>	<i>Clostridium septicum</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Clostridium sphenoides</i>	<i>Clostridium spiroforme</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Clostridium symbiosum</i>	<i>Clostridium tertium</i>
<i>Clostridium tetani</i>	-	-

*Basedo no programa BLAST.

Interferência

Foram testados 26 medicamentos frequentemente utilizados, assim como gordura fecal, sangue total e mucina, relativamente aos efeitos de uma possível interferência com o teste **cobas**® Cdiff. Todas as substâncias foram testadas a níveis acima do que seria razoavelmente esperado de ser colhido numa zaragatoa de uma amostra fecal. A quantidade de substância interferente é expressa como a concentração na amostra fecal primária. Foram adicionados 2 isolados de *C. difficile* a uma concentração de 3 x o Limite de Detecção (LOD) do teste **cobas**® Cdiff e usados como alvos nos testes. Não foi observada qualquer interferência para as substâncias exógenas. Para a gordura fecal, não foi observada qualquer interferência até 28%; para sangue total, não foi observada qualquer interferência até 50% e, para mucina, não foi observada qualquer interferência até 25%. Estes resultados estão indicados na Tabela 10.

Tabela 10 Resultados de testes com substâncias interferentes

Substância	Concentração	Resultados
Gordura fecal	4 ~ 28% (p/v)	Sem interferência
Sangue total	25, 50% (v/v)	Sem interferência
Mucina	25, 50% (p/v)	Sem interferência até 25% (p/v)
Tums	10% (p/v)	Sem interferência
Vancomicina	1% (p/v)	Sem interferência
Metronidazole	10% (p/v)	Sem interferência
Imodium AD®	10% (p/v)	Sem interferência
Amolecedor de fezes	10% (p/v)	Sem interferência
Pepto-Bismol® (Procter & Gamble)	10% (v/v)	Sem interferência
Pomada Nystatin USP	10% (p/v)	Sem interferência
Preparação H® com creme Bio-Dyne® (Wyeth)	10% (p/v)	Sem interferência
GYNOL II	10% (p/v)	Sem interferência
Crema anti-prurido Vagisil®	10% (p/v)	Sem interferência
Anusol® Plus	10% (p/v)	Sem interferência
Protector solar	1% (p/v)	Sem interferência
Monistat® 7	10% (p/v)	Sem interferência
Vaseline™	10% (p/v)	Sem interferência
Supositórios SAB-Dimhydrinate® (SABEX®)	10% (p/v)	Sem interferência
Óleo mineral	10% (v/v)	Sem interferência
Laxante vegetal natural Equate	10% (p/v)	Sem interferência
Dulcolax®	10% (p/v)	Sem interferência
Fleet® (CB Fleet Company)	10% (p/v)	Sem interferência
Gel K-Y/Gelée® (McNeil-PPC)	1% (p/v)	Sem interferência
Spray nasal original Afrin	10% (v/v)	Sem interferência
Hamamélide	Líquido de 1 zaragatoa	Sem interferência
Sulfato de bário de alta densidade E-Z-HD™ para suspensão (Canadá E-Z-EM)	20% (p/v)	Sem interferência
Ácido palmítico	10% (p/v)	Sem interferência
Ácido esteárico	10% (p/v)	Sem interferência
Aleve	10% (p/v)	Sem interferência

Desempenho clínico com amostras clínicas

O desempenho do teste **cobas**® Cdiff foi comparado a um teste de ácidos nucleicos (NAT), comparável e “State-of-the-Art”, de marca CE e aprovado pela FDA, utilizando como método de referência testes de cultura de tecido para citotoxicidade em isolados do *C. difficile* de cultura directa. Amostras fecais colhidas em 3 centros médicos/hospitais foram testadas pelo teste **cobas**® Cdiff e pelo teste de ácidos nucleicos (NAT) comparável e enviadas para um laboratório de referência para testes de cultura de tecido para citotoxicidade.

O teste **cobas**® Cdiff e o teste NAT comparável e “State-of-the-Art” foram executados de acordo com as instruções do fabricante. O teste de cultura de tecido para citotoxicidade foi executado utilizando um procedimento de cultura directa. Cada amostra fecal foi inoculada para uma ágar de cicloserina-cefoxitina-frutose pré-reduzida (CCFA-HT). As colónias suspeitas foram identificadas como *C. difficile* pela coloração de Gram, pela aero-intolerância e pelo teste Pro-Disk e foram inoculadas para um caldo de carne moída anaeróbico. Os sobrenadantes obtidos do caldo de carne moída anaeróbico foram então processados para a detecção de toxina B do *C. difficile*, utilizando o teste de cultura de tecido para citotoxicidade (teste C. DIFFICILE TOX-B, Techlab).

Um total de 1.434 indivíduos foram registados a partir de 5 localizações. Foram excluídos 156 indivíduos devido a resultados incompletos. Foram encontradas 152 amostras positivas para o *C. difficile* por cultura directa (prevalência: 11,9%). O desempenho do teste **cobas**® Cdiff e do teste comparável de ácidos nucleicos (NAT), relativamente a cultura directa é apresentado na Tabela 11 e Tabela 12.

Tabela 11 Teste **cobas**® Cdiff relativamente a cultura directa

		Cultura directa		
		Positivo	Negativo	Total
Teste cobas® Cdiff	Positivo	147	30	177
	Negativo	5	1.096	1.101
	Total	152	1.126	1.278

Sensibilidade e Especificidade

A sensibilidade e a especificidade do teste **cobas**® Cdiff relativamente a cultura directa são, respectivamente, 96,7% (intervalo de confiança bilateral de 95%: 92,5 a 98,6%) e 97,3% (intervalo de confiança bilateral de 95%: 96,2 a 98,1%).

Valor preditivo positivo e negativo

Os valores preditivos observados positivos e negativos do teste **cobas**® Cdiff para as amostras do estudo são, respectivamente, 83,1% (intervalo de confiança bilateral de 95%: 76,7 a 88,3%) e 99,5% (intervalo de confiança bilateral de 95%: 98,9 a 99,9%).

Tabela 12 Teste comparável de ácidos nucleicos (NAT) relativamente a cultura directa

		Cultura directa		
		Positivo	Negativo	Total
NAT comparável	Positivo	147	29	176
	Negativo	5	1.097	1.102
	Total	152	1.126	1.278

Sensibilidade e Especificidade

A sensibilidade e a especificidade do teste comparável NAT relativamente a cultura directa são, respectivamente, 96,7% (intervalo de confiança bilateral de 95%: 92,5 a 98,6%) e 97,4% (intervalo de confiança bilateral de 95%: 96,3 a 98,2%).

Correlação para o teste comparável NAT

A Tabela 13 apresenta o desempenho do teste **cobas**® Cdiff em comparação directa com um teste de ácidos nucleicos (NAT), comparável e “State-of-the-Art”, de marca CE e aprovado pela FDA.

Tabela 13 Teste **cobas**® Cdiff em comparação com teste comparável de ácidos nucleicos (NAT)

		NAT comparável		
		Positivo	Negativo	Total
Teste cobas® Cdiff	Positivo	167	10	177
	Negativo	9	1.092	1.101
	Total	176	1.102	1.278

Concordância na percentagem positiva e concordância na percentagem negativa

A concordância na percentagem positiva e a concordância na percentagem negativa do teste **cobas**® Cdiff são, respectivamente, 94,9% (intervalo de confiança bilateral de 95%: 90,6 a 97,3%) e 99,1% (intervalo de confiança bilateral de 95%: 98,3 a 99,5%).

Informações adicionais

Características principais do ensaio

Tipo de amostra	Amostras fecais sem forma
Quantidade de amostra necessária	Para um teste cobas ® Cdiff, é necessário um mínimo de 3 ml de amostra em 4,3 ml de cobas ® PCR Media num frasco primário.
Duração do teste	Os resultados ficam disponíveis no prazo de 2,5 horas após o carregamento da amostra no sistema (1 a 22 amostras).
Sensibilidade analítica	De 54 a 460 CFU/zaragatoa, consoante o isolado.
Especificidade	Nenhuma reactividade cruzada com 125 organismos estreitamente relacionados ou organismos geralmente presentes em amostras fecais.
Inclusividade	Todos os <i>C. difficile</i> conhecidos (toxintipos 0 ~ XXXI, excepto os toxintipos XI não toxigénicos) incluindo a estirpe epidémica hipervirulenta NAP1/BI/027.

Símbolos

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

Tabela 14 Símbolos utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche

Age/DOB	Idade ou data de nascimento		Dispositivo não para testes efetuados próximo dos pacientes	QS IU/PCR	UI QS por reação PCR, utilize as Unidades Internacionais QS (UI) por reação PCR no cálculo dos resultados.
	Software auxiliar		Dispositivo não para autotestes	SN	Número de série
Assigned Range [copies/mL]	Intervalo atribuído (cópias/mL)		Distribuidor (Nota: o país/região aplicável poderá estar indicado por baixo do símbolo.)	Site	Centro
Assigned Range [IU/mL]	Intervalo atribuído (UI/mL)		Não reutilizar	Procedure Standard	Procedimento padrão
EC REP	Representante autorizado na Comunidade Europeia		Mulher	STERILE EO	Esterilizado com óxido de etileno
	Folha de dados de códigos de barras		Apenas para avaliação do desempenho IVD		Armazenar no escuro
LOT	Número do lote	GTIN	Global Trade Item Number		Limite de temperatura
	Risco biológico		Importador		Ficheiro de definição de teste
REF	Referência de catálogo	IVD	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>		Este lado para cima
	Marcação de conformidade CE; este dispositivo está em conformidade com os requisitos aplicáveis para marcação CE de um dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	LLR	Limite inferior do intervalo atribuído	Procedure UltraSensitive	Procedimento ultrasensível
Collect Date	Data da colheita		Homem	UDI	Identificação exclusiva do equipamento
	Consulte as instruções de utilização		Fabricante	ULR	Limite superior do intervalo atribuído
	Conteúdo suficiente para <n> testes	CONTROL -	Controlo negativo	Urine Fill Line	Linha de enchimento da urina
CONTENT	Conteúdo do kit		Não esterilizado	Rx Only	Apenas nos EUA: a Lei federal dos Estados Unidos restringe a venda deste dispositivo a um profissional licenciado ou a pedido deste.
CONTROL	Controlo		Nome do paciente		Prazo de validade
	Data do fabrico		Número do paciente		
	Dispositivo para testes efetuados próximo dos pacientes		Abra aqui		
	Dispositivo para autotestes	CONTROL +	Controlo positivo		
		QS copies / PCR	Cópias QS por reação PCR, utilize as cópias QS por reação PCR no cálculo dos resultados.		

Apoio técnico

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

Fabricante e importador

Tabela 15 Fabricante e importador



Roche Molecular Systems, Inc.
1080 US Highway 202 South
Branchburg, NJ 08876 USA
www.roche.com

Fabricado nos EUA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Alemanha

Marcas comerciais e patentes

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

Direitos de autor

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Bibliografia

1. Bartlett JG, Chang TW, Moon N, Onderdonk AB. Antibiotic-induced lethal enterocolitis in hamsters: studies with eleven agents and evidence to support the pathogenic role of toxin-producing *Clostridia*. *Am J Vet Res*. 1978;39(9):1525-1530.
2. Larson HE, Price AB, Honour P, Borrielo SP. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet*. 1978;1(8073):1063-1066.
3. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med*. 2002;346(5):334-339.
4. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(3):409-415.
5. Loo VG, Poirier L, Miller MA, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med*. 2005;353(23):2442-2449.
6. Song X, Bartlett JG, Speck K, Naegeli A, Carroll K, Perl TM. Rising economic impact of *clostridium difficile*-associated disease in adult hospitalized patient population. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29(9):823-828.
7. Wolfhagen MJ, Torensma R, Fluit AC, Verhoef J. Toxins A and B of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Rev*. 1994;13(1):59-64.
8. Johnson S, Sambol SP, Brazier JS, et al. International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1543-1547.
9. Barbut F, Decré D, Lalande V, et al. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. *J Med Microbiol*. 2005;54(Pt 2):181-185.
10. Geric B, Rupnik M, Gerding DN, Grabnar M, Johnson S. Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital. *J Med Microbiol*. 2004;53(Pt 9):887-894.
11. Pépin J, Valiquette L, Alary ME, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ*. 2004;171(5):466-472.
12. Warny M, Pepin J, Fang A, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*. 2005;366(9491):1079-1084.
13. Bartlett JG. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann Intern Med*. 2006;145(10):758-764.
14. Fekety R. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*. 1997;92(5):739-750.
15. Peterson LR, Manson RU, Paule SM, et al. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool samples by real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*. 2007;45(9):1152-1160.
16. Sloan LM, Duresko BJ, Gustafson DR, Rosenblatt JE. Comparison of real-time PCR for detection of the *tcdC* gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol*. 2008;46(6):1996-2001.

17. Deshpande A, Pasupuleti V, Rolston DD, et al. Diagnostic accuracy of real-time polymerase chain reaction in detection of *Clostridium difficile* in the stool samples of patients with suspected *Clostridium difficile* infection: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2011;53(7):e81-90. Epub 2011/09/06.
18. Kufelnicka AM, Kirn TJ. Effective utilization of evolving methods for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis. 2011;52(12):1451-1457. Epub 2011/06/02.
19. Tenover FC, Baron EJ, Peterson LR, Pershing DH. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection can molecular amplification methods move us out of uncertainty? J Mol Diagn. 2011;13(6):573-582. Epub 2011/08/23.
20. Peterson LR, Mehta MS, Patel PA, Hacek DM, Harazin M, Nagwekar PP, et al. Laboratory testing for *Clostridium difficile* infection: light at the end of the tunnel. Am J Clin Pathol. 2011;136(3):372-380.
21. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*--more difficult than ever. N Engl J Med. 2008;359(18):1932-1940.
22. Monaghan T, Boswell T, Mahida YR. Recent advances in *Clostridium difficile*-associated disease. Gut. 2008;57(6):850-860.
23. Hardy K, Price C, Szczepura A, et al. Reduction in the rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition in surgical wards by rapid screening for colonization: a prospective, cross-over study. Clin Microbiol Infect. 2010;16(4):333-339. Epub 2009/07/23.
24. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. HHS Publication No. (CDC) 21-1112. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 5th edition. Revised December 2009.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.

Informações de revisão do documento

Informações de revisão do documento	
Doc Rev 7.0 04/2023	Alteração de <i>Clostridium</i> para <i>Clostridioides</i> em todo o documento. Remoção de todas as referências ao kit do teste Cdiff 240T devido a obsolescência. Atualização da secção Precauções e requisitos de manuseamento para aconselhar o utilizador a entrar em contacto com a autoridade local competente. Adição de aviso “dano/fuga” à secção Integridade. Secção Correlação renomeada para Desempenho clínico com amostras clínicas. Weblink adicionado ao resumo do relatório de segurança e de desempenho. Adição de símbolo de marca CE com número do organismo notificado. Atualizada a página de símbolos harmonizados. Atualização para os atuais Operadores Económicos. Secção Marcas comerciais e patentes atualizada, incluindo o link. Símbolo “Rx Only” inserido na primeira página. Adicionada indicação do local de fabrico. Secção de Apoio técnico adicionada. Marca cobas® atualizada. Se tiver quaisquer questões, por favor contacte o representante local da Roche.
Doc Rev 8.0 02/2024	Atualizadas as informações sobre perigos dos kits Lysis Kit 1. Marca cobas® atualizada. Se tiver quaisquer questões, por favor contacte o representante local da Roche.

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