

cobas[®] Cdiff

Teste de ácidos nucleicos para utilização no cobas[®] Liat[®] System



Para diagnóstico *in vitro*

**cobas[®] Cdiff Nucleic acid test for use on the
cobas[®] Liat[®] System**

20 Tests

P/N: 07454945190

**cobas[®] Cdiff Positive and Negative Control Kit
for use on the cobas[®] Liat[®] System**

5 Sets

P/N: 07454970190

ÍNDICE

Utilização prevista	4
Resumo e explicação do teste	4
Fundamentos: detecção do <i>C. difficile</i>	4
Explicação do teste	5
Princípios do procedimento	5
Preparação de amostras	5
Amplificação por PCR e detecção por sondas TaqMan®	5
Amplificação seletiva	6
Reagentes e materiais	7
Reagentes e controlos do cobas® Cdiff	7
Armazenamento e manuseamento de reagentes	10
Materiais adicionais necessários.....	10
Material opcional.....	11
Equipamentos e software necessários mas não fornecidos	11
Precauções e requisitos de manuseamento.....	11
Advertências e precauções	11
Boas práticas de laboratório.....	12
Contaminação	12
Integridade	12
Eliminação	13
Derrames e limpeza.....	13
Colheita, transporte e armazenamento de amostras	13
Colheita de amostras.....	13
Armazenamento e estabilidade das amostras durante o transporte	13
Procedimento de teste.....	14
Fluxo de trabalho “Adicionar lote”	14
Fluxo de trabalho de transferência de amostra	14
Fluxo de trabalho do cobas® Cdiff.....	14
Instruções de utilização	15
Procedimento “Adicionar lote”	15
Transferência da amostra para cobas® PCR Media	17
Execução do cobas® Cdiff em amostras clínicas	17
Execução de corridas de controlo adicionais	19

Resultados.....	20
Controlo de qualidade e validade dos resultados.....	20
Controlo positivo	20
Controlo negativo.....	20
Controlo interno	20
Interpretação dos resultados.....	21
Procedimento recomendado de repetição de teste	22
Limitações do procedimento	22
Avaliação do desempenho.....	23
Sensibilidade analítica.....	23
Detecção de genótipos do <i>C. difficile</i>	23
Precisão	24
Especificidade analítica.....	25
Interferência	27
Desempenho clínico com amostras clínicas	29
Correlação do cobas® Cdiff com cultura	29
Correlação do cobas® Cdiff com o NAT comparativo	30
Taxas de inválidos	30
Códigos de falha	31
Informações adicionais	32
Características principais do teste.....	32
Símbolos	33
Apoio técnico.....	34
Fabricante e importador.....	34
Marcas comerciais e patentes	34
Direitos de autor.....	34
Bibliografia	35
Revisão do documento	37

O teste de ácidos nucleicos cobas® Cdiff para utilização no cobas® Liat® System destina-se a ser utilizado por profissionais de saúde ou operadores qualificados com experiência na utilização do cobas® Liat® System em testes próximos do paciente, no centro de atendimento de pacientes (*Point of Care*, PoC) ou em cenários de laboratório clínico.

Utilização prevista

O teste de ácidos nucleicos cobas® Cdiff para utilização no cobas® Liat® System, é um teste automatizado, qualitativo, de diagnóstico *in vitro*, que utiliza reação de polimerização em cadeia (PCR) em tempo real, para a detecção 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 infeção por *C. difficile* (CDI). O teste de ácidos nucleicos cobas® Cdiff para utilização no cobas® Liat® System, destina-se a ser utilizado como auxiliar no diagnóstico da CDI em seres humanos em conjunto com fatores de risco clínico e epidemiológico.

Resumo e explicação do teste

Fundamentos: detecção do *C. difficile*

O *Clostridioides difficile* (*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 e da diarreia associadas aos antibióticos.^{1,2} O *C. difficile* é o agente patogénico nosocomial mais frequentemente referido³ e é considerado responsável por 15 a 20% dos casos de diarreia relacionados com antibióticos e de quase todos os casos de colite pseudomembranosa associada aos antibióticos.⁴ Em menos de 2 décadas, a incidência da infeção pelo *C. difficile* (CDI) aumentou 4 vezes⁵ e está associada a doenças graves e a mortalidade³. Os aumentos na incidência têm sido parcialmente atribuídos ao surgimento de estirpes hipervirulentas, como o ribotipo BI/027/pulsotipo 1 norteamericano (NAP1). Pacientes idosos e hospitalizados que tenham utilizado recentemente antibióticos, são as pessoas com maior risco de contrair a CDI, no entanto, a frequência da CDI está a aumentar também fora do ambiente hospitalar.^{3,6}

As infeções são transmitidas por esporos e, após colonização com o *C. difficile* toxigénico, os indivíduos poderão tornar-se portadores assintomáticos ou contrair uma doença no cólon. As características clínicas da CDI poderão ir desde uma diarreia moderada até uma 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. Apesar do aumento drástico da incidência e gravidade da CDI, o metronidazol e a vancomicina continuam a ser os tratamentos médicos preferidos para episódios agudos e infeções recorrentes.⁷

O diagnóstico da CDI é geralmente estabelecido pela presença de toxinas em amostras fecais. A maioria das estirpes toxigénicas do *C. difficile* produz normalmente duas exotoxinas proteicas: toxina A e toxina B.⁸ Uma pequena percentagem das estirpes toxigénicas poderá produzir apenas toxina B.⁹ A demonstração do efeito citopático numa monocamada de células pela ação da toxina B tem sido usada como referência.^{10,11} Pode ser efetuada a incubação direta de sobrenadante fecal na monocamada de células; alternativamente, isolados do *C. difficile* de amostras fecais podem ser cultivados em caldo enriquecido antes de incubar o sobrenadante na monocamada celular (cultura toxigénica). Ambas as técnicas exigem um mínimo de 48 a 72 horas para um resultado final do teste.

A cultura fecal não é amplamente utilizada, devido à complexidade processual e ao tempo prolongado necessário para obter resultados, conforme descrito acima, e o diagnóstico é muitas vezes efetuado com imunoensaios enzimáticos (EIA) ou testes com base em ADN.^{3,12} São amplamente utilizados imunoensaios para a detecção das toxinas, porque proporcionam resultados positivos em menos de 4 horas, no entanto, a sensibilidade é menor quando comparado com

a cultura.^{12, 13} Em contrapartida, foi observado que a detecção do gene toxina *C. difficile* através de reação em cadeia da polimerase (PCR), tem maior sensibilidade e necessita de menos tempo para a obtenção de resultados do que a cultura e os imunoensaíais.^{3, 14-17}

As medidas para o controlo da infeção incluem a utilização prudente de agentes antimicrobianos, a prevenção de infeção cruzada e a vigilância ativa de casos.¹⁸ 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 o início imediato do tratamento antimicrobiano e a implementação imediata de medidas de controlo da infeção.¹⁴⁻¹⁶ O teste de ácidos nucleicos cobas® Cdiff para utilização com o cobas® Liat® System foi concebido para ser um teste molecular rápido para a detecção do gene toxina B do *C. difficile* em amostras fecais sem forma obtidas de pacientes dos quais se suspeita terem contraído a CDI.

Explicação do teste

O teste de ácidos nucleicos cobas® Cdiff para utilização no cobas® Liat® System (doravante designado como “cobas® Cdiff”) é um teste rápido com automatização total da preparação de amostras, amplificação por PCR e detecção em tempo real de sequências do ADN alvo no cobas® Liat® Analyzer. O cobas® Cdiff é constituído por um tubo de teste cobas® Cdiff descartável de utilização única que contém reagentes para a purificação de ácidos nucleicos e para a reação de PCR, assim como um Controlo Interno (*Bacillus thuringiensis israelensis* ou Bti). O tubo de teste cobas® Cdiff acolhe os processos de preparação de amostras e de PCR. O tubo de teste cobas® Cdiff é independente, pelo que o risco de contaminação cruzada entre amostras é reduzido.

Princípios do procedimento

Preparação de amostras

Os organismos em amostra fecal são lisados com um agente caotrópico e com proteinase K. Os ácidos nucleicos libertados, incluindo o ADN do controlo interno Bti, ligam-se a partículas de vidro magnéticas. As partículas são lavadas e os ácidos nucleicos ligados são eluídos num pequeno volume de tampão e depois misturados com Mistura Principal e co-fator de ativação para a reação PCR.

Amplificação por PCR e detecção por sondas TaqMan®

O reagente de mistura principal contém iniciadores (primers) e sondas (probes) para toxina B do *C. difficile* 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 (amplicons). Estes produtos são detetados por sondas TaqMan® específicas contendo um corante sinalizador fluorescente e um supressor. Geralmente o supressor suprime a fluorescência do corante sinalizador. No entanto, se o produto da PCR estiver presente, a sonda liga-se com o produto e é clivada pela atividade da nuclease 5' a 3' da polimerase, separando assim o corante sinalizador e o supressor. Esta reação permite que seja emitida fluorescência do corante sinalizador, e o sinal é registado em tempo real durante cada ciclo da PCR pelo cobas® Liat® Analyzer. Este sinal é interpretado pelo software do cobas® Liat® System e reportado como resultado final.

Amplificação seletiva

A amplificação seletiva do ácido nucleico alvo da amostra é conseguida no **cobas**® Cdiff pela utilização da 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 desoxiuridina¹⁹, mas não o ADN que contém 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 suscetível 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 inativa a temperaturas acima dos 55 °C, ou seja, durante os passos de amplificação térmica, pelo que não destrói o amplicon alvo. O **cobas**® Cdiff demonstrou inativar pelo menos 1000 cópias de amplicon *C. difficile* contendo desoxiuridina, por PCR.

Reagentes e materiais

Reagentes e controlos do cobas® Cdiff

Tabela 1. cobas® Cdiff

Teste de ácidos nucleicos cobas® Cdiff para utilização no cobas® Liat® System Conservar entre 2 e 8 °C 20 testes (P/N 07454945190) 2 embalagens de pipetas de transferência cobas® Liat® (P/N 09329676001)		
Reagentes no tubo de teste cobas® Cdiff	Ingredientes dos reagentes	Símbolo e advertência de segurança ^a
cobas® Liat® Cdiff Internal Control (controlo interno)	PBS Tween-80 0,01% de conservante ProClin® 300 Glicerol EDTA < 1% stock de Bti (inativado) EUH210: Ficha de segurança fornecida a pedido. EUH208: Contém uma mistura de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona e 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1). Pode desencadear uma reação alérgica.	N/A
cobas® Liat® Proteinase K	Tampão Tris EDTA Cloreto de cálcio Acetato de cálcio < 2,0% de proteinase K ^b Glicerina	 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 ANTI-VENENOS/médico. 39450-01-6 Proteinase, <i>Tritirachium album</i> serine
cobas® Liat® Magnetic Glass Particles (partículas de vidro magnéticas)	Partículas de vidro magnéticas Água	N/A

Teste de ácidos nucleicos cobas® Cdiff para utilização no cobas® Liat® System

Conservar entre 2 e 8 °C

20 testes (P/N 07454945190)

2 embalagens de pipetas de transferência cobas® Liat® (P/N 09329676001)

Reagentes no tubo de teste cobas® Cdiff	Ingredientes dos reagentes	Símbolo e advertência de segurança ^a
cobas® Liat® Lysis Buffer (tampão de lise)	Citrato de sódio 3% de polidocanol ^b 42,6% de Tiocianato de guanidina ^b Ditiotreitól	 PERIGO H302: Nocivo por ingestão. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. H412: Nocivo 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. P301 + P330 + P331: SE INGERIDO: enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito. 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. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol

Teste de ácidos nucleicos cobas® Cdiff para utilização no cobas® Liat® System

Conservar entre 2 e 8 °C

20 testes (P/N 07454945190)

2 embalagens de pipetas de transferência **cobas® Liat®** (P/N 09329676001)

Reagentes no tubo de teste cobas® Cdiff	Ingredientes dos reagentes	Símbolo e advertência de segurança ^a
cobas® Liat® Wash Buffer (tampão de lavagem)	Citrato de sódio desidratado 0,05% de N-metilisotiazolona-HCl	 ADVERTÊNCIA H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea. P261: Evitar respirar as névoas ou vapores. P272: A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho. P280: Usar luvas de proteção. P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. P362 + P364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar. P501: Eliminar o conteúdo/recipiente numa instalação de eliminação de resíduos aprovada. 26172-54-3 Cloridrato de 2-metil-2H-isotiazol-3-ona
cobas® Liat® Elution Buffer-1 (tampão de eluição)	Albumina sérica humana recombinante Tampão Tris-HCl 0,09% de azida de sódio	N/A
cobas® Liat® Cdiff Master Mix-1 (mistura principal)	Tampão de tricina EDTA DMSO Acetato de potássio Hidróxido de potássio 0,01% de primers 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 0,09% de azida de sódio	N/A
cobas® Liat® Cdiff Master Mix-2 (mistura principal)	DMSO Tween 20 < 0,19% de dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 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 de sódio	N/A
cobas® Liat® Cdiff Cofactor (co-fator)	Acetato de manganês Acetato de magnésio Albumina sérica bovina de plasma bovino originado nos Estados Unidos 0,09% de azida de sódio	N/A

Tabela 2. Kit de controlo positivo e negativo do **cobas® Cdiff** para utilização no **cobas® Liat® System**

Kit de controlo positivo e negativo do cobas® Cdiff para utilização no cobas® Liat® System Conservar entre 15 e 30 °C 5 conjuntos (P/N 07454970190)			
Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança
Cdiff (+) C (controlo positivo do cobas® Liat® Cdiff)	Tampão Tris EDTA < 0,01% de ARN de Poli rA (sintético) 0,05% de azida de sódio < 0,01% de ADN de plasmídeo não infeccioso (de origem microbiana) contendo sequência de <i>C. difficile</i>	5 frascos	N/A
BUF (-) C (controlo negativo do cobas® Liat®)	Tampão Tris EDTA 0,05% de azida de sódio < 0,01% de ARN de Poli rA (sintético)	5 frascos	N/A

Armazenamento e manuseamento de reagentes

Tabela 3. Armazenamento e manuseamento de reagentes

Reagente	Temperatura de armazenamento	Tempo de armazenamento
Teste de ácidos nucleicos cobas® Cdiff para utilização no cobas® Liat® System	2 a 8 °C	Estável até ao fim do prazo de validade indicado
Kit de controlo positivo e negativo do cobas® Cdiff para utilização no cobas® Liat® System	15 a 30 °C	Estável até ao fim do prazo de validade indicado

Nota: não congelar os reagentes.

Não abra a embalagem individual do tubo de teste até que o operador esteja pronto para executar o teste.

A embalagem de pipetas de transferência **cobas® Liat®** pode ser armazenada à temperatura ambiente a seguir à primeira remoção do kit de tubo de teste **cobas® Cdiff**. Use sempre luvas limpas quando retirar pipetas de transferência da embalagem de pipetas de transferência **cobas® Liat®**. Volte a vedar a embalagem de pipetas de transferência **cobas® Liat®** imediatamente após retirar a(s) pipeta(s) necessária(s).

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

Tabela 4. Materiais adicionais necessários

Materiais	P/N
cobas® PCR Media Uni Swab Sample Kit	07958030190
Luvas de laboratório descartáveis, sem pó	São aceitáveis quaisquer luvas de laboratório sem pó.

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

Material opcional

Tabela 5. Material opcional

Material	P/N
cobas® PCR Replacement Cap Kit	07958056190

Para mais informações relativamente ao material opcional, contacte o representante local da Roche.

Equipamentos e software necessários mas não fornecidos

Tabela 6. Equipamentos e software necessários mas não fornecidos

Equipamentos e software necessários, não fornecidos
cobas® Liat® Analyzer (P/N 07341920190)
Incluindo o software do cobas® Liat® System (Core), versão 3.3.0 ou superior
cobas® Cdiff Script v1.1 ou superior

Para mais informações relativamente aos equipamentos e software necessários, 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 de laboratório são essenciais para um desempenho adequado deste teste. 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*.
- O teste de ácidos nucleicos **cobas®** Cdiff para utilização no **cobas®** Liat® System destina-se a ser utilizado por profissionais de saúde ou operadores qualificados com experiência na utilização do **cobas®** Liat® System em testes no centro de atendimento de pacientes (*Point of Care*, PoC) ou num cenário de laboratório clínico.
- Evitar a contaminação dos reagentes e amostras por microrganismos e ADN.
- Mude de luvas antes de retirar uma pipeta de transferência da embalagem de pipetas de transferência **cobas®** Liat® e depois de manusear cada amostra ou controlo, para evitar contaminação de reagentes e pipetas.
- Estão disponíveis Folhas de Dados de Segurança (SDS, Safety Data Sheets) que podem ser solicitadas ao representante local da Roche.
- O tampão de lise do **cobas®** Liat® (reagente LYS) contém tiocianato de guanidina. Não permita o contacto direto entre o tiocianato de guanidina e o hipoclorito de sódio (lixívia) ou outros reagentes altamente reativos tais como ácidos ou bases. Essas misturas podem libertar gases nocivos.
- O tampão de eluição 1 (EB) do **cobas®** Liat®, a mistura principal 1 do **cobas®** Liat® Cdiff (Cdiff MMX-1), a mistura principal 2 do **cobas®** Liat® Cdiff (Cdiff MMX-2), o co-fator do **cobas®** Liat® Cdiff (Cofactor), o BUF (-) C e o Cdiff (+) C contêm azida de sódio.
- Para outras advertências, precauções e procedimentos para reduzir o risco de contaminação do **cobas®** Liat® Analyzer, consulte o Guia do utilizador atual do **cobas®** Liat® System.
- Na UE: informe as autoridades competentes locais e o fabricante sobre quaisquer incidentes graves que possam ocorrer ao utilizar este ensaio.

Boas práticas de laboratório

- Não efetue pipetagem com a boca.
- Não coma, não beba nem fume nas áreas de trabalho.
- Lave muito bem as mãos depois de manusear amostras e reagentes do kit.
- Por política institucional, use sempre proteção para os olhos, bata de laboratório e luvas de laboratório quando manusear quaisquer reagentes. Evite o contacto destes materiais com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Se ocorrer contacto, lave imediatamente com água em abundância. Caso não seja efectuado tratamento, podem surgir queimaduras. Se ocorrer derrame, dilua com água antes de limpar com um pano seco.
- A adição de enzima AmpErase à Mistura Principal do **cobas**® Liat® Cdiff permite a amplificação seletiva 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.
- Limpe e desinfete 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

- Devem ser usadas luvas e estas devem ser mudadas antes de remover uma pipeta de transferência **cobas**® Liat® da embalagem de pipetas de transferência **cobas**® Liat®, entre o manuseamento de diferentes amostras e tubo de teste **cobas**® Cdiff ou frascos de controlos para prevenir contaminação. Evite contaminar as luvas quando manusear amostras e controlos. Use luvas de laboratório, bata de laboratório e proteção ocular quando manusear amostras e reagentes do kit.
- Evite a contaminação microbiana e por ribonucleases dos reagentes.
- Poderão ocorrer resultados falsos-positivos se o carryover de amostras (contaminação de amostras por outras amostras) não for impedido durante a manipulação das amostras.
- As amostras deverão ser manuseadas como se fossem infecciosas, utilizando procedimentos laboratoriais seguros, tais como os descritos em Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories²⁰ e no Documento M29-A4 do CLSI.²¹

Integridade

- Não utilize kits fora dos prazos de validade.
- Não misturar reagentes.
- Não utilize um tubo de teste **cobas**® Cdiff danificado ou um tubo de teste **cobas**® Cdiff que tenha caído depois de retirado da sua bolsa de alumínio.
- Não reutilize os tubos de teste **cobas**® Cdiff. Se um tubo de teste **cobas**® Cdiff não estiver alojado num invólucro, ou se o compartimento de amostra do tubo já contiver líquido, NÃO utilize o tubo.
- Todos os equipamentos devem ser mantidos adequadamente, de acordo com as instruções do fabricante.
- Todos os kits de reagente devem ser armazenados adequadamente. Consulte a Tabela 3.

Eliminação

- Os tubos de teste **cobas**® Cdiff devem ser eliminados num recipiente apropriado para resíduos com potencial risco biológico, conforme especificado pelas normas de segurança e saúde ambiental específicas da sua instituição.
- Os reagentes e controlos do **cobas**® Cdiff contêm azida de sódio (consultar “Advertências e precauções”). A azida de sódio pode reagir com tubagens de chumbo e de cobre, produzindo azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar soluções contendo azida de sódio nos lavatórios do laboratório, lave os canos com um grande volume de água fria para impedir a formação de azidas.
- Elimine os tubos de teste não utilizados e os resíduos em conformidade com a legislação nacional, federal, estatal e local.

Derrames e limpeza

- Se ocorrerem derrames no **cobas**® Liat® Analyzer, siga as instruções de limpeza aplicáveis indicadas no Guia do Utilizador do **cobas**® Liat® System.

Colheita, transporte e armazenamento de amostras

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

Colheita de amostras

O **cobas**® Cdiff só deverá ser utilizado com **amostras fecais com forma parcial ou sem forma**. Isto é definido como uma amostra fecal que toma a forma do seu recipiente. Efetue a colheita da amostra fecal num recipiente limpo, seco e não usado, seguindo os procedimentos de operação padrão da sua instituição.

Armazenamento e estabilidade das amostras durante o transporte

As amostras fecais sem forma mantêm-se estáveis à temperatura ambiente (entre 2 e 30 °C) durante 2 dias, ou entre 2 e 8 °C durante 9 dias, antes de serem transferidas para **cobas**® PCR Media e testadas no **cobas**® Liat® System (isto foi demonstrado testando amostras depois de armazenamentos consecutivos a 30±1 °C durante 2 dias, seguido de armazenamento entre 2 e 8 °C durante 7 dias).

As amostras fecais ressuspensas em **cobas**® PCR Media mantêm-se estáveis entre 2 e 30 °C durante 7 dias antes de serem testadas no **cobas**® Liat® System.

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

Fluxo de trabalho “Adicionar lote”

Figura 1. Fluxo de trabalho “Adicionar lote”

1	Inicie o sistema e inicie sessão
2	Remova controlos, tubos de teste e pipetas de transferência do armazenamento
3	No Menu de testes, selecione “Novo lote”
4	Efetue a leitura do código de barras no cartão de código de barras da ID, no folheto informativo
5	Efetue a leitura e execute o controlo negativo
6	Efetue a leitura e execute o controlo positivo

Fluxo de trabalho de transferência de amostra

Figura 2. Fluxo de trabalho de transferência de amostra

1	Mergulhe uma zaragatoa na amostra fecal
2	Coloque a zaragatoa num tubo com cobas® PCR Media
3	Quebre a haste da zaragatoa pelo nó cinzento
4	Coloque a tampa no tubo e misture por rotação pelo menos 5 vezes

Fluxo de trabalho do cobas® Cdiff

Figura 3. Fluxo de trabalho do **cobas®** Cdiff

1	Inicie o sistema e inicie sessão
2	Remova amostras, tubos de teste e pipetas de transferência do armazenamento
3	A partir do menu principal, selecione “Executar teste”
4	Efetue a leitura do código de barras do tubo de teste cobas® Cdiff
5	Efetue a leitura ou introduza a ID de amostra
6	Adicione a amostra ao tubo de teste cobas® Cdiff, utilizando uma pipeta de transferência e volte a colocar a tampa no tubo
7	Efetue novamente a leitura do código de barras do tubo de teste cobas® Cdiff
8	Inicie a corrida, inserindo o tubo de teste cobas® Cdiff
9	Examine os resultados*
10	Descarregue e elimine o tubo de teste cobas® Cdiff usado

* Para detalhes do envio de resultados para DMS e LIS, consulte o Guia do utilizador atual do **cobas®** Liat® System.

Instruções de utilização

Procedimento “Adicionar lote”

Antes de utilizar um novo lote de tubos de teste **cobas® Cdiff**, deve ser executado o procedimento “Adicionar lote” no **cobas® Liat® Analyzer** para validar o lote de tubos de teste **cobas® Cdiff** no seu local de trabalho. O procedimento inclui a execução de uma amostra de controlo negativo e uma amostra de controlo positivo Cdiff.

Materiais necessários para o “Adicionar lote”

- Novo lote de teste de ácidos nucleicos **cobas® Cdiff** para utilização no **cobas® Liat® System** (dois tubos de teste)
- 2 pipetas de transferência da embalagem de pipetas de transferência **cobas® Liat®**
- Cartão de código de barras da ID do folheto informativo do novo lote de tubos de teste **cobas® Cdiff**
- Controlo positivo do **cobas® Liat® Cdiff**
- Controlo negativo do **cobas® Liat®**
- Cartão de código de barras do controlo positivo Cdiff do **cobas® Liat®** e do controlo negativo do **cobas® Liat®**

***Nota:** para instruções de operação detalhadas, consulte o Guia do utilizador do **cobas® Liat® System**.*

Procedimento

1. Prima o botão de ligar/desligar para ligar o **cobas® Liat® Analyzer**.
2. Selecione **Iniciar** sessão no ecrã do **cobas® Liat® Analyzer**.
3. Introduza o nome de utilizador quando este for pedido e selecione **Introduzir**.
4. Introduza a palavra-passe de utilizador quando esta for pedida e selecione **Introduzir**.

***Nota:** o sistema poderá pedir-lhe para confirmar que leu o Guia do utilizador (isto é, o Guia do utilizador do **cobas® Liat® System**).*

5. Selecione **Menu de testes** no menu principal de um **cobas® Liat® Analyzer**.
6. Selecione **Novo lote** no fundo da lista.
7. Quando o sistema indicar **Ler ID folheto infor.**, selecione **Ler** e efetue a leitura do cartão de código de barras da ID no folheto informativo do **cobas® Cdiff**. Certifique-se de que a luz vermelha de leitura incide sobre todo o código de barras.

***Nota:** o sistema poderá pedir-lhe para confirmar que leu o folheto informativo ou as instruções de utilização.*

8. Quando o sistema indicar **Ler ID controlo negativo**, selecione **Ler** e efetue a leitura do cartão de código de barras do Controlo Negativo incluído no kit de controlos. Certifique-se de que a luz vermelha de leitura incide sobre todo o código de barras. Em seguida, o **cobas® Liat® Analyzer** apresenta a mensagem **Adicionar controlo negativo e ler ID tubo**.
9. Segure um tubo de controlo negativo do **cobas® Liat®** na vertical e bata suavemente numa superfície plana para recolher o líquido no fundo do tubo.
10. Abra uma bolsa de alumínio de um tubo de teste **cobas® Cdiff** (do lote a adicionar) e retire o tubo de teste.

11. Utilize uma pipeta de transferência da embalagem de pipetas de transferência **cobas® Liat®** para adicionar controlo negativo **cobas® Liat®** ao tubo de teste **cobas® Cdiff**. Aperte firmemente o bolbo da pipeta até que o mesmo fique totalmente esvaziado, e depois insira a ponta da pipeta no líquido e aspire a amostra desapertando lentamente o bolbo.

Nota: utilize apenas a pipeta de transferência fornecida na embalagem de pipetas de transferência cobas® Liat® para transferir controlos e amostras para o tubo de teste cobas® Cdiff.

12. Retire cuidadosamente a tampa do tubo de teste **cobas® Cdiff** e insira a pipeta na abertura. Coloque a ponta da pipeta perto do fundo do segmento aberto.
13. Aperte lentamente o bolbo para esvaziar o conteúdo da pipeta para dentro do tubo de teste **cobas® Cdiff**. Evite criar bolhas na amostra. Não solte o bolbo da pipeta enquanto a pipeta ainda se encontrar no tubo de teste **cobas® Cdiff**.

Nota: não perfure o tubo de teste cobas® Cdiff ou o selo no fundo do compartimento de amostra. Se qualquer destes dois componentes ficar danificado, elimine o tubo de teste cobas® Cdiff e a pipeta de transferência e reinicie o procedimento de teste com um novo tubo de teste e pipeta cobas® Cdiff.

14. Enrosque novamente a tampa do tubo de teste **cobas® Cdiff**. Elimine a pipeta de transferência.
15. Selecione **Ler** e coloque o tubo de teste **cobas® Cdiff** na horizontal na mesa por debaixo do leitor de código de barras de modo que a luz vermelha de leitura incida sobre todo o código de barras. A porta de entrada de tubos no cimo do **cobas® Liat® Analyzer** abre-se automaticamente assim que o código de barras for lido.
16. Remova o invólucro do tubo de teste **cobas® Cdiff** e insira imediatamente o tubo de teste **cobas® Cdiff** no **cobas® Liat® Analyzer**, até que o tubo de teste encaixe no lugar com um estalido.

Nota: o tubo de teste cobas® Cdiff só encaixa num sentido – o lado sulcado do tubo de teste cobas® Cdiff deve ficar à esquerda e a tampa virada para cima.

17. Se o tubo de teste não for inserido até que a porta feche, volte a efetuar a leitura do código de barras do tubo de teste **cobas® Cdiff** e insira novamente o tubo de teste **cobas® Cdiff**. Após o tubo de teste **cobas® Cdiff** ter sido inserido adequadamente, o **cobas® Liat® Analyzer** fechará a porta automaticamente e iniciará o teste.
18. Durante o teste, o **cobas® Liat® Analyzer** indica o estado da execução e uma estimativa de tempo restante. Assim que o teste estiver concluído, se for apresentado **Resultado de controlo negativo aceite**, selecione **Confirmar**. Se o resultado for rejeitado, repita a execução do controlo negativo (passos 8 a 18). Se a corrida repetida do controlo não produzir os resultados previstos, contacte o representante local da Roche.
19. Assim que o teste estiver concluído, o **cobas® Liat® Analyzer** apresenta a mensagem **Retire o tubo de teste lenta e cuidadosamente** e abre automaticamente a porta de entrada de tubos de teste. Levante lentamente o tubo de teste **cobas® Cdiff** para fora do **cobas® Liat® Analyzer**. Elimine o tubo de teste **cobas® Cdiff** usado num recipiente para resíduos com potencial risco biológico.
20. Selecione **Anterior** para prosseguir com o teste do controlo positivo Cdiff do **cobas® Liat®** no mesmo equipamento.
21. Da mesma maneira, siga os passos 8 a 17 com um controlo positivo Cdiff do **cobas® Liat®** em vez do controlo negativo do **cobas® Liat®**.
22. Se aparecer a mensagem **“Resultado do controlo positivo aceite. Lote ... adicionado”** no fim da corrida, selecione **Confirmar** e depois selecione **Anterior** para voltar ao menu principal. Se o resultado for rejeitado, repita o teste do controlo positivo Cdiff do **cobas® Liat®**. Se a corrida repetida do controlo não produzir os resultados previstos, contacte o representante local da Roche.

23. Repita o passo 19.
24. Selecione **Menu de testes** para verificar se o novo lote foi adicionado.

Depois do procedimento “Adicionar lote” ter sido efetuado num analisador, utilize o menu Ferramentas no **cobas® Liat Analyzer** com uma tecla USB para transferir as informações do lote para outros analisadores no seu local de trabalho. Este procedimento permite que outros analisadores utilizem este lote de tubos de teste **cobas® Cdiff** sem ter de efetuar o procedimento “Adicionar lote” em cada analisador. Siga as instruções no Guia do utilizador do **cobas® Liat® System** e realize um “Exportar lotes de testes” no analisador no qual foi realizado “Adicionar lote”. Depois, realize o procedimento de “Importar lotes de testes” em cada um dos outros analisadores no seu local de trabalho.

Transferência da amostra para **cobas® PCR Media**

1. A amostra fecal deverá ser transferida para o tubo de **cobas® PCR Media** e testada dentro do período de tempo descrito na secção “Colheita, transporte e armazenamento de amostras”. Neste documento, a amostra fecal original também é designada como “amostra primária”, e a suspensão fecal em **cobas® PCR Media** (ver passos a seguir) também é designada como “amostra secundária”.
2. Utilize a zaragatoa fornecida no **cobas® PCR Media Uni Swab Sample Kit** para transferir a amostra fecal. 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 cônica.
3. Retire sem demora a zaragatoa inoculada e coloque-a no tubo de **cobas® PCR Media**. Não teste a amostra se esta não tiver quantidade suficiente para submergir totalmente a ponta da zaragatoa.
4. Quebre a haste da zaragatoa pela marca a cinzento, fazendo pressão contra o lado do tubo de **cobas® PCR Media**.
5. Coloque a tampa no tubo e misture por rotação do tubo pelo menos 5 vezes.

Nota: o **cobas® Cdiff** foi validado para utilização com o **cobas® PCR Media Uni Swab Sample Kit**. Outros dispositivos ou tipos de meio não foram validados para utilização com o **cobas® Cdiff**.

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

Nota: os tubos de **cobas® PCR Media** contêm volume de **cobas® PCR Media** para suspensões fecais suficientes para vários ensaios no **cobas® Liat® System**. O volume mínimo de suspensão fecal para realizar uma corrida **cobas® Cdiff** é 0,2 ml.

Execução do **cobas® Cdiff** em amostras clínicas

Material necessário para uma corrida **cobas® Cdiff**

- Tubo de teste **cobas® Cdiff** da bolsa de alumínio **cobas® Cdiff**
- Pipeta de transferência da embalagem de pipetas de transferência **cobas® Liat®**
- Amostras fecais transferidas e ressuspensas em **cobas® PCR Media** (consultar “Transferência da amostra para **cobas® PCR Media**”)

Procedimento

1. Certifique-se de que o **cobas® Liat® Analyzer** está ligado.
2. Selecione **Iniciar** sessão no ecrã do **cobas® Liat® Analyzer**.
3. Introduza o nome de utilizador quando este for pedido e selecione **Introduzir**.
4. Introduza a palavra-passe de utilizador quando esta for pedida e selecione **Introduzir**.

Nota: o sistema poderá pedir-lhe para confirmar que leu o Guia do utilizador (isto é, o Guia do utilizador do cobas® Liat® System).

5. A partir do menu principal, selecione **Executar teste**.
6. Abra uma embalagem do tubo de teste **cobas® Cdiff** e tire para fora o tubo de teste. Quando aparecer a mensagem **Ler ID de tubo**, selecione **Ler** e coloque o tubo de teste **cobas® Cdiff** na horizontal na mesa por debaixo do leitor de código de barras de modo que a luz vermelha de leitura incida sobre todo o código de barras.
7. Quando aparecer a mensagem **Ler ID de amostra**, selecione **Ler** para efetuar a leitura do código de barras da amostra. No caso do código de barras da amostra não poder ser lido, selecione **Introduzir** para introduzir manualmente a ID da amostra.

Nota: dependendo da configuração do analisador, se for necessário confirmar a informação do paciente recebida, selecione o botão Confirmar.

8. Quando for solicitado, adicione a amostra ao tubo de teste **cobas® Cdiff**.
9. Use uma pipeta de transferência da embalagem de pipetas de transferência **cobas® Liat®** para transferir amostra secundária. Aperte firmemente o bolbo da pipeta até que o mesmo fique totalmente esvaziado, e depois insira a ponta da pipeta no líquido e aspire a amostra desaperando lentamente o bolbo.

Nota: mude de luvas antes de retirar uma pipeta de transferência da embalagem de pipetas de transferência cobas® Liat®, para evitar contaminação da embalagem de pipetas.

10. Retire cuidadosamente a tampa do tubo de teste **cobas® Cdiff** e insira a pipeta na abertura. Coloque a ponta da pipeta perto do fundo do segmento aberto.
11. Aperte lentamente o bolbo para esvaziar o conteúdo da pipeta para dentro do tubo de teste **cobas® Cdiff**. Não solte o bolbo da pipeta enquanto a pipeta ainda se encontrar no tubo de teste **cobas® Cdiff**.
12. Volte a colocar a tampa no tubo de teste **cobas® Cdiff** e elimine a pipeta de transferência.

Nota: evite contaminação cruzada de luvas, equipamentos e superfícies de trabalho com o conteúdo residual da pipeta.

13. Selecione **Ler** e efetue novamente a leitura do código de barras do mesmo tubo de teste **cobas® Cdiff**. A porta de entrada de tubos de teste no cimo do **cobas® Liat® Analyzer** abre-se automaticamente.
14. Remova o invólucro do tubo de teste **cobas® Cdiff** e insira imediatamente o tubo de teste **cobas® Cdiff** no **cobas® Liat® Analyzer**, até que o tubo de teste encaixe no lugar com um estalido.

Nota: o tubo de teste cobas® Cdiff só encaixa num sentido – o lado sulcado do tubo de teste cobas® Cdiff deve ficar à esquerda e a tampa virada para cima.

15. Se o tubo de teste não for inserido até que a porta feche, volte a efetuar a leitura do código de barras do tubo de teste **cobas® Cdiff** e insira novamente o tubo de teste **cobas® Cdiff**. Após o tubo de teste **cobas® Cdiff** ter sido inserido adequadamente, o **cobas® Liat® Analyzer** fechará a porta automaticamente e iniciará o teste.
16. Durante o teste, o **cobas® Liat® Analyzer** indica o estado da execução e uma estimativa de tempo restante. Assim que o teste estiver concluído, o **cobas® Liat® Analyzer** apresenta a mensagem **Retire o tubo de teste lenta e cuidadosamente** e abre automaticamente a porta de entrada de tubos de teste. Levante lentamente o tubo de teste **cobas® Cdiff** para fora do **cobas® Liat® Analyzer**. Elimine o tubo de teste **cobas® Cdiff** usado num recipiente para resíduos com potencial risco biológico.
17. Selecione **Relatório** para visualizar o relatório de resultados. Se aplicável, selecione **Imprimir** para imprimir o relatório.
18. Selecione **Anterior** e, em seguida, **Principal**, para regressar ao menu principal para efetuar o teste seguinte.

Execução de corridas de controlo adicionais

Em conformidade com os requisitos locais, estatais, federais e/ou de agências de acreditação, podem ser executadas corridas de controlos adicionais com um lote de tubos de teste **cobas® Cdiff** que já tenha sido adicionado através do procedimento “Adicionar lote”. Utilize o Kit de Controlo Positivo e Negativo do **cobas® Cdiff** para utilização com o **cobas® Liat® System** para efetuar estas corridas.

Material necessário para as corridas de controlos adicionais

- Tubos de teste **cobas® Cdiff** e pipetas de transferência
- Controlo positivo Cdiff do **cobas® Liat®** e/ou controlo negativo do **cobas® Liat®**
- Código de barras correspondente do controlo positivo Cdiff do **cobas® Liat** e/ou do controlo negativo do **cobas® Liat®**

Procedimento

Utilize o procedimento descrito na secção “Executar o **cobas® Cdiff** em amostras clínicas”, para executar as corridas de controlos adicionais. No passo 7, certifique-se de que utiliza os códigos de barras de controlo fornecidos no Kit de controlo positivo e negativo **cobas® Cdiff** para efetuar a leitura como código de barras da ID da amostra. A interpretação de resultados do **cobas® Cdiff** ao executar controlos negativos ou controlos positivos Cdiff adicionais, é indicada na Tabela 9 e na Tabela 10 da secção “Interpretação dos resultados”. Se forem utilizados códigos de barras que não sejam os códigos de barras de controlos fornecidos, poderão ser originados resultados de controlo incorretos.

Resultados

Controlo de qualidade e validade dos resultados

Durante o procedimento “Adicionar lote” descrito anteriormente, são executados um controlo positivo Cdiff **cobas®** Liat® e um controlo negativo **cobas®** Liat®. Para que os resultados sejam validados no equipamento, têm de ser obtidos resultados válidos tanto do controlo positivo como do controlo negativo com o novo lote de tubos de teste **cobas®** Cdiff. Podem ser efetuadas corridas de controlos adicionais depois do procedimento “Adicionar lote”. Para os detalhes, consulte “Executar corridas de controlo adicionais” nas instruções de utilização.

O controlo interno Cdiff do **cobas®** Liat® está contido dentro de cada tubo de teste **cobas®** Cdiff e será executado juntamente com cada amostra durante todo o fluxo de trabalho do teste.

Controlo positivo

O controlo positivo Cdiff do **cobas®** Liat® contém ADN de plasmídeos não infecciosos com sequência do *C. difficile* alvo. O controlo positivo Cdiff do **cobas®** Liat® verifica a integridade dos reagentes no tubo de teste **cobas®** Cdiff e o funcionamento adequado do **cobas®** Liat Analyzer. Se os resultados do controlo positivo Cdiff do **cobas®** Liat® forem frequentemente inválidos, contacte o representante local da Roche, para obter assistência técnica.

Controlo negativo

O controlo negativo do **cobas®** Liat® não contém sequências alvos e monitoriza uma potencial contaminação com sequências alvos do fluxo de trabalho ou do ambiente. Se os resultados do controlo negativo do **cobas®** Liat® forem frequentemente inválidos, contacte o representante local da Roche, para obter assistência técnica.

Controlo interno

No tubo de teste é incluído o organismo completo do controlo interno (Bti) e é automaticamente adicionado a todas as amostras no início da preparação de amostras. O controlo interno do Cdiff **cobas®** Liat® é uma bactéria quimicamente inativada que é incluída em cada tubo de teste **cobas®** Cdiff e é processada juntamente com cada amostra. O controlo interno verifica o processamento adequado das bactérias alvo ao longo de todos os passos do teste e monitoriza a presença de inibidores na preparação de amostras e a PCR. O controlo interno Cdiff do **cobas®** Liat® deve ser positivo numa amostra negativa e pode ser negativo ou positivo numa amostra positiva para o Cdiff.

Interpretação dos resultados

Nota: a validação de todas as amostras e corridas de controlo é determinada pelo cobas® Liat® System.

Os resultados quando o procedimento “Adicionar lote” é executado são interpretados conforme indicado na Tabela 7.

Tabela 7. Interpretação de resultados do cobas® Cdiff quando é executado o procedimento “Adicionar lote”

Indicação no cobas® Liat® Analyzer	Impressão e interpretação do relatório de resultados
Controlo negativo válido	Controlo negativo válido O controlo é negativo para a presença de ADN de <i>C. difficile</i> .
Controlo negativo inválido. Repetir exec.	Controlo negativo inválido O resultado é inválido. O controlo negativo deve ser novamente testado para obter um resultado válido. Repita a corrida.
Controlo positivo válido	Controlo positivo válido O controlo é positivo para a presença de ADN de <i>C. difficile</i> .
Controlo positivo inválido. Repetir exec.	Controlo positivo inválido O resultado é inválido. O controlo positivo deve ser novamente testado para obter um resultado válido. Repita a corrida.

Os resultados de amostra são interpretados conforme indicado na Tabela 8.

Tabela 8. Interpretação de resultados do cobas® Cdiff quando é executada uma amostra clínica

Indicação no cobas® Liat® Analyzer	Impressão e interpretação do relatório de resultados
Cdiff Detetado	Cdiff Detetado A amostra é positiva para a presença de ADN de <i>C. difficile</i> .
Cdiff Não detetado	Cdiff Não detetado* A amostra é negativa relativamente ADN do <i>C. difficile</i> ou, caso presente, não foi detetado.
Teste inválido	Teste inválido** O resultado é inválido. A amostra original deverá ser novamente testada para obter um resultado válido. Consulte “Procedimento recomendado de repetição de teste”.
Teste anulado pelo utilizador	Teste anulado pelo utilizador Corrida cancelada pelo utilizador. A amostra original deverá ser novamente testada para obter um resultado válido. Consulte “Procedimento recomendado de repetição de teste”.
Teste anulado pelo sistema	Teste anulado pelo sistema Corrida cancelada pelo sistema. A amostra original deverá ser novamente testada para obter um resultado válido. Consulte “Procedimento recomendado de repetição de teste”.

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

** Poderão ser obtidos resultados inválidos se as amostras contiverem matéria fecal em excesso ou substâncias interferentes que impeçam a extração do ácido nucleico alvo e/ou a sua amplificação e deteção. Para as substâncias interferentes conhecidas, consulte a secção “Limitações do procedimento”. Volume de amostra insuficiente também pode originar resultados inválidos. O volume mínimo de suspensão fecal/cobas® PCR Media necessária para o cobas® Cdiff é 0,2 ml.

Quando são executados controlos adicionais depois do procedimento “Adicionar lote”, os resultados são interpretados conforme indicado na Tabela 9 e na Tabela 10.

Tabela 9. Interpretação de resultados do cobas® Cdiff quando é executado um controlo positivo

Indicação no cobas® Liat® Analyzer	Impressão e interpretação do relatório de resultados
Controlo positivo válido	Controlo positivo válido O controlo é positivo para a presença de ADN de <i>C. difficile</i> .
Controlo positivo inválido	Controlo positivo inválido O resultado é inválido. O Controlo Positivo deve ser novamente testado para obter um resultado válido. Repita a corrida.

Tabela 10. Interpretação de resultados do cobas® Cdiff quando é executado um controlo negativo

Indicação no cobas® Liat® Analyzer	Impressão e interpretação do relatório de resultados
Controlo negativo válido	Controlo negativo válido O controlo é negativo para a presença de ADN de <i>C. difficile</i> .
Controlo negativo inválido	Controlo negativo inválido O resultado é inválido. O controlo negativo deve ser novamente testado para obter um resultado válido. Repita a corrida.

Procedimento recomendado de repetição de teste

Corridas inválidas e corridas falhadas/canceladas podem ser repetidas uma vez utilizando a mesma amostra secundária. Se a corrida repetida ainda for inválida, pode ser preparada uma nova amostra secundária a partir da amostra fecal primária. Alternativamente, obtenha uma nova amostra primária, se possível, para efetuar novamente o cobas® Cdiff.

Limitações do procedimento

1. O cobas® Cdiff só foi validado para utilização com amostras fecais sem forma ou com forma parcial que tenham sido transferidas para o tubo de cobas® PCR Media de acordo com estas instruções de utilização (também denominadas Folheto informativo).
2. A obtenção de resultados fiáveis está dependente da colheita, transporte, armazenamento e processamento adequados das amostras. Siga os procedimentos descritos neste documento de instruções de utilização do cobas® Cdiff e no Guia do Utilizador do cobas® Liat® System.
3. A deteção de ADN do *C. difficile* depende do número de organismos presentes na amostra e poderá ser afetada pelos métodos de colheita/processamento das amostras, o histórico de hospitalização, 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 cobas® Cdiff para ajudar a identificar as amostras que contêm substâncias passíveis de interferir com o isolamento de ácidos nucleicos e a amplificação por PCR. As substâncias interferentes conhecidas incluem, mas podem não se limitar, às seguintes:
 - As amostras que contêm mais do que 50% (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, este teste não é recomendado para utilização em monitorização de tratamentos ou como um teste de cura.
6. Mutações ou polimorfismos em regiões de ligação do primer ou da sonda poderão afetar a deteção de variantes novas ou desconhecidas, originando um resultado falso-negativo com o cobas® Cdiff.

7. O valor preditivo de um teste depende da prevalência da doença numa determinada população.
8. A utilização deste produto deve estar limitada a pessoal com formação sobre a utilização do **cobas®** Liat® System.

Avaliação do desempenho

Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica (Limite de Detecção ou LoD) do **cobas®** Cdiff foi determinada por análise de culturas quantificadas do *C. difficile* diluídas a vários níveis de concentração, numa suspensão de fundo fecal negativo em **cobas®** PCR Media. Foram testados todos os níveis em três réplicas, cada uma utilizando dois lotes únicos de tubos de teste **cobas®** Cdiff. O nível mais baixo com taxa de positividade de 100% foi testado com réplicas adicionais para confirmar o nível do LoD. Se a taxa de positividade geral para esse nível foi inferior a 95%, o nível acima do painel foi testado com réplicas adicionais. O nível final do LoD foi confirmado com pelo menos 21 réplicas adicionais. O LoD para este teste é definido como a concentração do alvo que pode ser detetada como positiva em $\geq 95\%$ das réplicas testadas, com base nos resultados gerados pelo lote de reagente de pior desempenho.

Os resultados do estudo de sensibilidade analítica estão indicados na Tabela 11.

Tabela 11. Limite de Detecção (LoD) do teste **cobas®** Cdiff

ID da estirpe	Toxinotipo	Tipo de REA*	Tipo de PFG†	Ribotipo	Fenótipo	LoD (CFU/zaragatoa)
ATCC 43255 (VPI 10463)	0	N/A	N/A	87	A+B+CDT-	90
R12087 (CD196)	III	BI	NAP1	27	A+B+CDT+	45

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

Detecção de genótipos do *C. difficile*

Foi verificado o limite de detecção do **cobas®** Cdiff em 37 estirpes toxigénicas representando toxinotipos adicionais, testando 3 réplicas por estirpe a 3 vezes o nível do LoD (270 CFU/zaragatoa) do ATCC 43255. Foram preparadas diluições e amostras de teste de uma maneira semelhante à descrita atrás no estudo do Limite de Detecção (LoD).

Todas as 37 estirpes toxigénicas (Tabela 12) foram detetadas como positivas a 100% neste estudo, confirmando que o **cobas®** Cdiff pode detetar estes genótipos do *C. difficile*.

Tabela 12. Resumo dos resultados da verificação toxigénica do *C. difficile*

	Estirpe Cdiff	Toxinotipo	Ribotipo	Taxa de positividade
1	ATCC# BAA-1382, 630	0	12	100,00%
2	EX 623	I	102	100,00%
3	AC 008	II	103	100,00%
4	2004118, CDC-204118 (NAP-1)	III	27	100,00%
5	SE 844	IIIa	80	100,00%
6	CH6230	IIIc	N/A	100,00%
7	P43	IV	N/A	100,00%
8	55767	IV	23	100,00%
9	2748-06	V	78	100,00%
10	SE 881	V	45	100,00%
11	SE 1203	VI	33	100,00%
12	57267	VII	63	100,00%

	Estirpe Cdiff	Toxinotipo	Ribotipo	Taxa de positividade
13	ATCC# 43598, 1470	VIII	17	100,00%
14	51680	IX	19	100,00%
15	CCUG 8864/STCC20309	X	36	100,00%
16	F15	XII	N/A	100,00%
17	IS 25	XII	56	100,00%
18	R 9367	XIII	70	100,00%
19	R 10870	XIV (novo XIVa)	111	100,00%
20	R 9385	XV (novo XIVb)	122	100,00%
21	SUC36	XVI	78	100,00%
22	No 1313	XVII	232	100,00%
23	K095	XVIII	14	100,00%
24	TR13	XIX	N/A	100,00%
25	TR14	XX	N/A	100,00%
26	CH6223	XXI	N/A	100,00%
27	CD07-468	XXII	N/A	100,00%
28	8785	XXIII (novo IXc)	N/A	100,00%
29	597B	XXIV	131	100,00%
30	7325	XXV	27	100,00%
31	7459	XXVI	N/A	100,00%
32	KK2443/2006	XXVII	N/A	100,00%
33	CD08-070	XXVIII	126	100,00%
34	CD07-140	XXIX	56	100,00%
35	ES 130	XXX	N/A	100,00%
36	WA 151	XXXI	N/A	100,00%
37	173070	XXXII	N/A	100,00%

Precisão

Foi realizado um estudo de precisão interno utilizando um painel composto por culturas ATCC 43255 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 cobas® Cdiff. Também foi testado um nível negativo composto apenas da suspensão fecal negativa em cobas® PCR Media. O estudo utilizou 3 lotes únicos de reagentes do cobas® Cdiff e 6 equipamentos, para um total de 192 corridas num período de tempo de 12 dias. A Tabela 13 apresenta uma descrição dos painéis de precisão e o resumo do estudo.

A análise dos componentes de variação (Tabela 14) sugeriu que a maioria da variabilidade dos valores Ct alvo se deve a fatores aleatórios e do equipamento (67% e 32%, respetivamente) para um nível de concentração ao nível do LoD ou próximo do LoD. Para um nível de concentração superior ao LoD, a maioria da variabilidade do valor Ct deve-se a fatores aleatórios e do lote (58% e 20%, respetivamente). Os resultados (Tabela 15) indicam que os valores Ct alvo apresentam um CV geral (%) de 2,4% para um nível de concentração ao nível do LoD e 2,3% para um nível de concentração superior ao LoD.

Tabela 13. Análise de taxa de positividade do estudo de precisão interno

Membro do painel	N.º de testados	N.º de positivos	Taxa de positivos	LC de 95%	
				Inferior	Superior
Negativo	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
< 1 × LoD	48	33	68,8%	54,7%	80,1%
~ 1 × LoD	48	48	100,0%	92,6%	100,0%
~ 3 × LoD	48	48	100,0%	92,6%	100,0%

LoD = limite de deteção

Tabela 14. Análise dos componentes de variação de Ct dos membros do painel de precisão

Nível	Ct médio	Componentes de variação / Percentagem de contribuição do total				Total
		Lote	Equipamento	Dia	Aleatório	
~ 1 × LoD	31,8	0,008	0,189	0	0,398	0,595
		1%	32%	0%	67%	100,00%
~ 3 × LoD	30,3	0,097	0,049	0,055	0,274	0,476
		20%	10%	12%	58%	100,00%

LoD = limite de detecção

Tabela 15. Análise dos desvios padrão de Ct e coeficientes de variação (%) dos membros do painel de precisão

Nível	Ct médio	Componentes do DP / Percentagem CV				Total
		Lote	Equipamento	Dia	Aleatório	
~ 1 × LoD	31,8	0,089	0,434	0	0,631	0,771
		0,30%	1,40%	0%	2,00%	2,40%
~ 3 × LoD	30,3	0,312	0,222	0,234	0,524	0,69
		1,00%	0,70%	0,80%	1,70%	2,30%

LoD = limite de detecção

Especificidade analítica

Para avaliar a especificidade analítica do **cobas**® Cdiff, foram testados os seguintes painéis de organismos:

- 1) 118 bactérias, fungos e vírus que podem ser encontrados em amostras fecais e um tipo de célula humana (Tabela 16)
- 2) 32 organismos do género *Clostridium*, incluindo o *C. difficile* não toxigénico (Tabela 17)

A especificidade analítica do *Clostridium botulinum* foi prevista 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.

Todas as bactérias e células humanas foram adicionadas a uma concentração de 1×10^6 unidades*/ml, e todos os vírus foram adicionados a uma concentração de 1×10^5 unidades*/ml equivalentes em matriz fecal. Os testes foram executados com os organismos sozinhos ou com dois isolados do *C. difficile* toxigénico presentes individualmente a $3 \times$ o Limite de Detecção (LoD) do **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.

* As bactérias foram quantificadas em unidades formadoras de colónias (CFU)/ml, as células humanas foram quantificadas em células/ml e os vírus foram quantificados em TCID₅₀/ml, exceto o *Chlamydia trachomatis* que foi quantificado em IFU/ml.

Tabela 16. Microrganismos e células humanas testados

<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 35655	<i>Alcaligenes faecalis</i> subespécie <i>faecalis</i> ATCC 15554
<i>Alcaligenes faecalis</i> subespécie <i>faecalis</i> ATCC 8750	<i>Anaerococcus tetradius</i>	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13472	<i>Bacteroides caccae</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Bacteroides merdae</i>	<i>Bacteroides stercoris</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Campylobacter coli</i> ATCC 33559	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43479
<i>Campylobacter jejuni</i> subespécie <i>jejuni</i> ATCC 33292	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida catenulata</i>
<i>Cedecea davisae</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i> serovar L2 LGVII454	<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 faecium</i> van A	<i>Enterococcus faecalis</i> van B
<i>Enterococcus gallinarum</i> van C	<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700927
<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 grimontii</i>
<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC BAA-839	<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> ATCC 25933
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	<i>Proteus penneri</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>
<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 35554
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 33584	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Ruminococcus bromii</i>
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i> ATCC 7001	<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>arizonae</i> ATCC 13314 (nome antigo: <i>Salmonella choleraesuis</i> subespécie <i>arizonae</i>)	<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> CMCC 1975
<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> ATCC 19430	<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Serratia liquefaciens</i> CMCC 169
<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC 27592	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100
<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</i> sp. estirpe V8 ATCC 12973	<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 41	Coxsackievírus humano A4	Coxsackievírus humano B4
Ecovírus humano 11	Enterovírus humano 71	Rotavírus humano
Norovírus GII	-	-

Tabela 17. Organismos do género *Clostridium*, 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>Clostridioides difficile</i> (ES 1103) (não toxigénico tipo XIa)**
<i>Clostridioides difficile</i> (6035/06) (não toxigénico tipo XIa)**	<i>Clostridioides difficile</i> (F14) (não toxigénico tipo XIb)**	<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> ATCC 15579	<i>Clostridium sporogenes</i> CCRI 11128	<i>Clostridium symbiosum</i>
<i>Clostridium tertium</i>	<i>Clostridium tetani</i>	-

* Baseado na análise do programa BLAST.

** Estão incluídas nesta tabela 3 estirpes Cdiff não toxigénicas (toxintipo XI) testadas durante o estudo de inclusividade que não foram detetadas pelo teste cobas® Cdiff.

Interferência

Foram testados 38 medicamentos frequentemente utilizados, assim como gordura fecal, sangue total e mucina, relativamente aos efeitos de uma possível interferência com o 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 $3 \times$ o Limite de Detecção (LoD) do 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 39% (p/v); para sangue total, não foi observada qualquer interferência até 100% (p/v) e, para mucina, não foi observada qualquer interferência até 50% (p/v). Estes resultados estão indicados na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados de testes para substâncias interferentes

Substância	Concentração
Gordura fecal	0,22% a 39% (p/v)
Sangue total	100% (p/v)
Mucina	50% (p/v)
Aleve	100% (p/v)
Mylanta	100% (p/v)
Anusol	100% (p/v)
Dulcolax	23%* (p/v)
Laxante Equate	50%* (p/v)
Hidrocortisona Equate	100% (p/v)
Sulfato de bário de alta densidade E-Z-HD	100% (p/v)
Fleet	100% (p/v)
Supositórios de glicerina	100% (p/v)
Supositórios Gracol	100% (p/v)
Gel contraceptivo Gynol II	10%* (p/v)
Imodium	100% (p/v)
Kaopectato	100% (p/v)
K-Y Jelly	100% (p/v)
Metronidazol	100% (p/v)
Miconazol	100% (p/v)
Óleo mineral	100% (p/v)
Cremae Monistat	100% (p/v)
Tratamento completo Monistat	100% (p/v)
Pomada Nystatin	100% (p/v)
Ácido palmítico	100% (p/v)
Pedia Lax	100% (p/v)
Pepto Bismol	25%* (p/v)
Hamamélida	50%* (p/v)
Cremae hemorroidal Preparação H	100% (p/v)
Tomada hemorroidal Preparação H	100% (p/v)
Dramamine	12,5%* (p/v)
Ácido esteárico	100% (p/v)
Docusato sódico	100% (p/v)
Tums	50%* (p/v)
Suspensão retal Mesalamina	100% (p/v)
Cremae anti-prurido Vagisil	12,5%* (p/v)
Vancomicina	100% (p/v)
Vaselina	100% (p/v)
Protetor solar	100% (p/v)
Inserto vaginal Monistat	100% (p/v)
Película contraceptiva vaginal	100%
Preservativos com espermicida	100%

Desempenho clínico com amostras clínicas

O desempenho do cobas® Cdiff foi comparado a um teste de ácidos nucleicos (NAT) comparativo de tecnologia avançada disponível no mercado, utilizando como método de referência testes de citotoxicidade em cultura de tecido em isolados do *C. difficile* de cultura direta e enriquecida. Foram testadas pelo cobas® Cdiff e pelo NAT de comparação 442 amostras fecais colhidas previamente em 2 localizações e 284 amostras fecais congeladas de arquivo de 5 localizações. Uma segunda alíquota das amostras foi enviada para um laboratório de referência para testes de citotoxicidade em cultura de tecido.

O cobas® Cdiff e o teste NAT comparativo de tecnologia avançada foram executados de acordo com as instruções dos fabricantes. O teste de citotoxicidade em cultura de tecido foi executado utilizando procedimentos de cultura direta e enriquecida. Resumidamente, cada amostra fecal foi primeiro inoculada para uma ágar de cicloserina-cefoxitina-frutose pré-reduzida (CCFA-HT) e caldo CCMB TAL. O caldo CCMB TAL foi incubado durante 48 a 72 horas e depois sub-cultivado numa ágar Brucella durante 5 dias a 35 °C. Se as colônias de *C. difficile* foram difíceis de isolar, os organismos foram sub-cultivados numa ágar CCFA-VA. As colônias suspeitas foram identificadas como *C. difficile* pela coloração de Gram, pela aero-intolerância e pelo teste Pro-Disk e foram inoculadas num 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 citotoxicidade em cultura de tecido (teste C. DIFFICILE TOX-B, Techlab).

Foram encontradas 155 amostras positivas para o *C. difficile* por cultura direta e enriquecida combinada (prevalência: 21,3%). O desempenho do cobas® Cdiff e do teste de ácidos nucleicos (NAT) comparativo relativamente à cultura, são apresentados na Tabela 19 até à Tabela 21. É indicada a correlação com resultados de cultura direta e com resultados de cultura direta e enriquecida combinada. “Resultados combinados” significa que se qualquer um dos resultados de cultura direta ou de cultura enriquecida, ou ambos, forem positivos, a amostra será considerada positiva para o resultado de cultura combinada. Apenas quando tanto o resultado de cultura direta como o resultado de cultura enriquecida forem negativos, a amostra será considerada negativa para o resultado de cultura combinada.

Correlação do cobas® Cdiff com cultura

O desempenho do cobas® Cdiff em comparação com cultura direta, e com cultura direta e enriquecida combinada é indicado na Tabela 19 e na Tabela 20, respetivamente.

Tabela 19. cobas® Cdiff relativamente à cultura direta

		Cultura direta		
		Positivo	Negativo	Total
cobas® Cdiff	Positivo	129	21	150
	Negativo	9	567	576
	Total	138	588	726
Sensibilidade	93,5% (intervalo de confiança bilateral de 95% exato 88,1% a 96,5%)			
Especificidade	96,4% (intervalo de confiança bilateral de 95% exato 94,6% a 97,7%)			
Valor preditivo negativo	98,4% (intervalo de confiança bilateral de 95% exato 97,1% a 99,3%)			
Valor preditivo positivo	86,0% (intervalo de confiança bilateral de 95% exato 79,5% a 90,7%)			

Tabela 20. cobas® Cdiff relativamente à cultura direta e enriquecida

		Cultura direta e enriquecida		
		Positivo	Negativo	Total
cobas® Cdiff	Positivo	139	11	150
	Negativo	14	562	576
	Total	153	573	726
Sensibilidade	90,8% (intervalo de confiança bilateral de 95% exato 85,2% a 94,5%)			
Especificidade	98,1% (intervalo de confiança bilateral de 95% exato 96,6% a 98,9%)			
Valor preditivo negativo	97,6% (intervalo de confiança bilateral de 95% exato 96,0% a 98,5%)			
Valor preditivo positivo	92,7% (intervalo de confiança bilateral de 95% exato 87,3% a 95,9%)			

Correlação do cobas® Cdiff com o NAT comparativo

A Tabela 21 indica o desempenho do cobas® Cdiff em comparação direta com um teste de ácidos nucleicos (NAT) comparativo e de tecnologia avançada.

Tabela 21. cobas® Cdiff relativamente ao teste comparativo de ácidos nucleicos (NAT)

		NAT comparativo		
		Positivo	Negativo	Total
cobas® Cdiff	Positivo	145	5	150
	Negativo	6	570	576
	Total	151	575	726
Concordância de positivos	96,0% (intervalo de confiança bilateral de 95% exato 91,6% a 98,2%)			
Concordância de negativos	99,1% (intervalo de confiança bilateral de 95% exato 98,0% a 99,6%)			

Taxas de inválidos

A taxa de inválidos para o cobas® Cdiff foi calculada a partir de resultados de teste de 978 amostras clínicas individuais, que incluem as 726 amostras no estudo de correlação. Entre as 978 amostras testadas, 2 tiveram resultados cobas® Cdiff inválidos. Ao testar novamente, 1 das 2 amostras gerou resultados válidos e a outra manteve-se inválida. Assim, a taxa de amostras inválidas para cobas® Cdiff neste grupo de amostras foi de 0,2%, e a taxa de inválidas ao testar novamente foi de 0,1%.

Códigos de falha

Os seguintes códigos de falhas descritos na Tabela 22 podem ser indicados no relatório de resultados com base na interpretação e processo de cálculo do resultado de teste.

Tabela 22. Códigos de falhas e definições

Código de falha	Amostra	Controlo negativo (Adicionar lote)	Controlo positivo (Adicionar lote)
r0	IC Negativo ou Inválido. Repetir exec.	IC Negativo ou Inválido. Repetir exec.	IC Negativo ou Inválido. Repetir exec.
r1			
r3*			
r4			
x4**	Cdiff positivo enquanto IC negativo ou inválido. Repetir exec.	N/A	Cdiff e/ou IC negativo ou inválido. Repetir exec.
FP	N/A	Cdiff positivo ou inválido. Repetir exec.	N/A
g0	N/A	N/A	Cdiff negativo ou inválido. Repetir exec.
g1			
g3			
g4			
x5	Volume de amostra demasiado baixo	Volume de amostra demasiado baixo	Volume de amostra demasiado baixo

Nota*: o código de falha r3 não aparece para controlos positivo e negativo.

Nota**: o código de falha x4 não aparece para controlo positivo (Adicionar lote). Para controlo positivo, o código de falha x4 só pode ser acionado quando a falha ocorre durante corridas de controlos positivos adicionais, depois do procedimento “Adicionar lote” (consultar “Executar corridas de controlo adicionais”).

Para informações sobre códigos de falhas adicionais, consulte o Guia do utilizador atual do **cobas® Liat® System**.

Informações adicionais

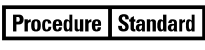
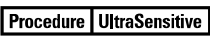
Características principais do teste

Tipo de amostra	Amostras fecais sem forma
Quantidade de amostra necessária	São fornecidos 4,3 ml de cobas ® PCR Media com cada cobas ® PCR Media Uni Swab Sample Kit, e é necessário um mínimo de 0,2 ml para um cobas ® Cdiff.
Duração do teste	Os resultados ficam disponíveis no prazo de ~20 minutos após o carregamento da amostra no sistema.
Sensibilidade analítica	De 45 a 90 CFU/zaragatoa, consoante o isolado.
Especificidade	Nenhuma reatividade cruzada com 149 organismos estreitamente relacionados ou organismos geralmente presentes em amostras fecais.
Inclusividade	Todos os <i>C. difficile</i> conhecidos (toxinotipos 0~XXXI, exceto os toxinotipos XI não toxigénicos) incluindo a estirpe epidémica hipervirulenta NAP1/BI/027

Símbolos

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

Tabela 23. Símbolos utilizados em rótulos de produtos de diagnóstico por PCR da Roche

 Idade ou data de nascimento	 Dispositivo não para testes efetuados próximo dos pacientes	 UI QS por reação PCR, utilize as Unidades Internacionais QS (UI) por reação PCR no cálculo dos resultados.
 Software auxiliar	 Dispositivo não para autotestes	 Número de série
 Intervalo atribuído (cópias/ml)	 Distribuidor (Nota: o país/região aplicável poderá estar indicado por baixo do símbolo.)	 Centro
 Intervalo atribuído (UI/ml)	 Não reutilizar	 Procedimento padrão
 Representante autorizado na Comunidade Europeia	 Mulher	 Esterilizado com óxido de etileno
 Folha de dados de códigos de barras	 Apenas para avaliação do desempenho IVD	 Armazenar no escuro
 Número do lote	 Global Trade Item Number	 Limite de temperatura
 Risco biológico	 Importador	 Ficheiro de definição de teste
 Referência de catálogo	 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>	 Limite inferior do intervalo atribuído	 Procedimento ultrasensível
 Data da colheita	 Homem	 Identificação exclusiva do equipamento
 Consulte as instruções de utilização	 Fabricante	 Limite superior do intervalo atribuído
 Conteúdo suficiente para <n> testes	 Controlo negativo	 Linha de enchimento da urina
 Conteúdo do kit	 Não esterilizado	 Apenas nos EUA: a Lei federal dos Estados Unidos restringe a venda deste dispositivo a um profissional licenciado ou a pedido deste.
 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	 Controlo positivo	
	 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 24. 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, Germany

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, Borriello SP. Clostridium difficile and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet.* 1978;1(8073):1063-1066.
3. Leffler D.A., Lamont J.T. Clostridium difficile Infection. *N Engl J Med* 2015; 372:1539-1548.
4. Bartlett J. G. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med.* 2002;346(5):334-9.
5. Vindigni S. M, Surawicz C. M. C. difficile Infection: Changing Epidemiology and Management Paradigms. *Clinical and Translational Gastroenterology.* 2015; 6, e99; doi:10.1038/ctg.2015.24.
6. Hensgens M. P., Keessen E. C., Squire M. M., Riley T. V., Koene M. G., de Boer E. Clostridium difficile infection in the community: a zoonotic disease? *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(7):635-45.
7. Kelly C. P., LaMont J. T. Clostridium difficile--more difficult than ever. *N Engl J Med.* 2008;359(18):1932-40.
8. Wolfhagen M. J., Torensma R., Fluit A. C., J Verhoef. Toxins A and B of Clostridium difficile. *FEMS Microbiol Rev.* 1994;13(1):59-64.
9. Johnson S., Sambol S. P., Brazier J. S., Delmee M., Avesani V., Merrigan M. International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile variants. *J Clin Microbiol.* 2003;41(4):1543-7.
10. Brecher S. M., Novak-Weekley S. M., E Nagy. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile infections: there is light at the end of the colon. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2013;57(8):1175-81.
11. Surawicz C. M., Brandt L. J., Binion D. G., Ananthakrishnan A. N., Curry S. R., H Gilligan P. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of Clostridium difficile infections. *The American journal of gastroenterology.* 2013;108(4):478-98; quiz 99.
12. Curry SR. Clostridium difficile. *Clinics in Laboratory Medicine.* June 2017; 37(2):341-6.
13. Sloan L. M., Duresko B. J., Gustafson D. R., Rosenblatt J. E. 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.
14. Deshpande A., Pasupuleti V., Rolston D. D., Jain A., Deshpande N., Pant C. 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.
15. Kufelnicka A. M., J Kirn T. Effective utilization of evolving methods for the laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis.* 2011;52(12):1451-7.
16. Tenover F. C., Baron E. J., Peterson L. R., H Persing D. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection can molecular amplification methods move us out of uncertainty? *J Mol Diagn.* 2011;13(6):573-82.
17. Peterson L. R., Mehta M. S., Patel P. A., Hacek D. M., Harazin M., Nagwekar P. Laboratory testing for Clostridium difficile infection: light at the end of the tunnel. *Am J Clin Pathol.* 2011;136(3):372-80.

18. Monaghan T., Boswell T., Mahida Y. Recent advances in Clostridium difficile-associated disease. Gut. 2008;57(6):850-60.
19. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene. 1990;93:125-128.
20. 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.
21. 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.

Revisão do documento

Informações de revisão do documento	
Doc Rev. 5.0 04/2024	Revisto para conformidade com os requisitos do IVDR. Referências e procedimentos alinhados e atual em suporte do cobas® Liat® Analyzer Software 3.3. Atualizadas as informações sobre perigos. Adição de declaração de utilização prevista. Atualizada a tabela 18 para incluir as unidades de concentração e remover informação redundante. Atualizado o cabeçalho da secção Inclusividade para o cabeçalho de secção Deteção de genótipos do <i>C. difficile</i>. Corrigidos erros e revisões de clarificação gerais. Atualizada a página de símbolos harmonizados. Secção Marcas comerciais e patentes atualizada, incluindo o link. Adicionada informação relativa à descrição e uso das embalagens de pipetas de transferência cobas® Liat® (12 pipetas/embalagem, N.º Ref. 09329676001). Se tiver quaisquer questões, por favor contacte o representante local da Roche.
Doc Rev. 6.0 07/2024	Atualizadas as informações sobre perigos de cobas® Cdiff. Marca cobas® atualizada. Atualizada a página de símbolos harmonizados. Indicação de autoridade competente atualizada. Rx Only removido da primeira página. Se tiver quaisquer questões, por favor contacte o representante local da Roche.