

Instructions for use

***C. difficile* ELITe MGB® Kit**

reagentes para PCR em tempo real do ADN



REF M800358

UDI 08033891486563



HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

Rev.	Aviso de alteração	Data (dd/ /mm/aa)
07	Alargamento da utilização com o ELITE BeGenius Novos gráficos e definição de conteúdos das instruções de utilização.	22/11/24
06	ELITE InGenius - CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO: Atualização dos marcadores potencialmente interferentes para incluir Clostridium Nexile.	09/09/24
05	Adição de dados analíticos (Verificação LdD, Equivalência de pré-tratamento da matriz, Marcadores e substâncias potencialmente interferentes) e método alternativo de pré-tratamento de amostras.	15/03/24
00– 04	desenvolvimento de novo produto e alterações subsequentes	-

TABLE OF CONTENT

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA	4
2 EXPLICAÇÃO DO ENSAIO	4
3 PRINCÍPIOS DO ENSAIO	4
4 DESCRIÇÃO DO PRODUTO	5
5 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	5
6 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	5
7 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	5
8 AVISOS E PRECAUÇÕES	6
9 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA ELITE InGenius e ELITE BeGenius	8
10 PROCEDIMENTO do ELITE InGenius	10
11 PROCEDIMENTO do ELITE BeGenius	15
12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITE InGenius e ELITE BeGenius	19
13 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA OUTROS SISTEMAS	31
14 PROCEDIMENTO NOUTROS SISTEMAS	34
15 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM OUTROS SISTEMAS	39
16 REFERÊNCIAS	51
17 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	51
18 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	52
19 SÍMBOLOS	56
20 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	56
Appendix A QUICK START GUIDE	58

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto **C. difficile ELITE MGB® Kit** é um dispositivo médico de diagnóstico in vitro destinado a ser utilizado por profissionais de saúde como um ensaio de PCR em tempo real de ácidos nucleicos multiplexado e qualitativo para a **deteção de genes da toxina A e toxina B de Clostridium difficile toxigénico (C. difficile)**, incluindo a estirpe NAP1/BI/027 epidémica hipervirulenta, em amostras de ADN extraídas de amostras de fezes líquidas ou não formadas.

O ensaio foi validado em associação com os instrumentos **ELITE InGenius®** e **ELITE BeGenius®**, sistemas automatizados e integrados para a extração, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, usando amostras humanas de fezes.

O ensaio é também validado em associação com o **7500 Real-Time PCR System**, usando amostras humanas de fezes.

O produto destina-se a ser utilizado como auxiliar no diagnóstico de **C. difficile** toxigénico em contextos de saúde em conjunto com outros resultados de análises laboratoriais e dados clínicos.

Os resultados devem ser interpretados em conjunto com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

2 EXPLICAÇÃO DO ENSAIO

A infeção toxigénica por *C. difficile* manifesta-se normalmente por diarreia leve a moderada, ocasionalmente com cólicas abdominais. Em casos raros, pacientes com infeção toxigénica por *C. difficile* podem apresentar colite fulminante com risco de vida e abdominal aguda. Aproximadamente 20% dos indivíduos internados *C. difficile* toxigénico durante o internamento, e mais de 30% destes pacientes desenvolvem diarreia. Assim, a colite toxigénica por **C. difficile** é atualmente uma das infeções nosocomiais mais comuns. O diagnóstico de colite *C. difficile* toxigénica deve ser suscitado em qualquer paciente com diarreia que tenha recebido antibióticos nos últimos 2 meses e/ou quando a diarreia ocorre 72 horas ou mais após o internamento. A colonização ocorre pela via fecal-oral. Estirpes patogénicas de *C. difficile* toxigénico produzem 2 toxinas distintas. A Toxina A é uma enterotoxina e a toxina B é uma citotoxina. Tanto a Toxina A como a toxina B parecem desempenhar um papel na patogénese da colite toxigénica por *C. difficile* em seres humanos.

O **C. difficile ELITE MGB Kit** é um ensaio triplex baseado na amplificação em tempo real que tem como alvo os genes toxina A e toxina B de *C. difficile* toxigénico e um controlo interno. Os ensaios baseados em amplificação em tempo real diminuem significativamente o tempo de laboratório em comparação com os testes de cultura padrão, aumentando a eficácia do procedimento.

O **C. difficile ELITE MGB Kit** tem como alvo tanto o gene da toxina A (tcdA) como o gene da toxina B (tcdB), detetando assim todos os possíveis genótipos toxigénicos (A+/B+; A+/B-; A-/B+).

3 PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio é uma deteção qualitativa de PCR em tempo real dos **genes da toxina A e toxina B de Clostridium difficile toxigénico (C. difficile)**, incluindo a estirpe epidémica hipervirulenta NAP1/BI/027, isolada de amostras e amplificada utilizando o reagente do ensaio **C. difficile PCR Mix**, que contém primers e sondas com tecnologia ELITE MGB.

As sondas ELITE MGB são ativadas quando hibridizam com os correspondentes produtos da PCR. **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** monitorizam o aumento da fluorescência e calculam os ciclos de limite (Ct) e as temperaturas de fusão (Tm).

Nas sondas ELITE MGB, os fluoróforos são inativados no estado de cadeia única de espiral aleatória da sonda. Os fluoróforos são ativados no duplex amplicon / sonda dado que o inativador está espacialmente separado do fluoróforo.

Ressalva-se que o fluoróforo não é clivado durante a PCR e pode ser utilizado para a análise da dissociação e o cálculo da temperatura de fusão.

4 DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O **C. difficile ELITE MGB Kit** fornece o reagente do ensaio **C. difficile PCR Mix**, uma mistura de PCR otimizada e estabilizada que contém os primers e sondas específicos para:

- o **gene da toxina A específico de C. difficile, detetado no canal Toxina A**; a sonda é estabilizada por MGB, inativado pelo Eclipse Dark Quencher e identificado pelo corante AquaPhluor® 525 (AP525).
- o **gene da toxina A específico de C. difficile, detetado no canal Toxina B**; a sonda é estabilizada por MGB, inativado pelo Eclipse Dark Quencher e identificado pelo corante FAM.
- Internal Control (**IC**), específico para a sequência artificial **IC2**, detetado no Canal **IC**; a sonda é estabilizada por MGB, inativado pelo Eclipse Dark Quencher e identificado pelo corante AquaPhluor 642 (AP642).

A mistura de reação **C. difficile PCR Mix** também contém tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos de nucleótido e hot-start DNA Polimerase.

O produto **C. difficile ELITE MGB Kit** contém reagentes suficientes para **96 testes** no **ELITE InGenius** e no **ELITE BeGenius**, com 20 µL usados por reação.

O produto contém reagentes suficientes para **100 testes noutros sistemas**, com 20 µL usados por reação.

5 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Table 1

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
C. difficile PCR Mix ref. M800358	Mistura de reagentes para PCR em tempo real tubo com tampa BRANCA	4 × 540 µL	-

6 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Exaustor de fluxo de ar laminar.
- Luvras de nitrilo sem pó descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrífuga de bancada (~5.000 RPM).
- Microcentrífuga de bancada (~13.000 RPM).
- Termomisturador.
- Micropipetas e pontas estéreis com filtro de aerossol ou pontas de deslocação positiva estéreis (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Tubos com tampa de rosca esterilizados de 2,0 mL (Sarstedt, Alemanha, ref. 72.694.005).
- Água de qualidade para biologia molecular.

7 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para extração do ADN de amostra, o controlo interno da extração e inibição, o positive control e o negative control de amplificação e os consumíveis não são fornecidos com este produto.

Para a extração automática de ácidos nucleicos, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados das amostras, são necessários os produtos seguintes.

Table 2

Instrumentos e software	Produtos e reagentes
ELiTe InGenius (ELiTechGroup S.p.A., EG SpA, ref. INT030). ELiTe InGenius Software versão 1.3.0.17 (ou superior). Cdiff ELiTe_PC , protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Positive Control. Cdiff ELiTe_NC , protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control. Cdiff ELiTe_ST_200_100 , protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra de fezes.	ELiTe InGenius SP200 (EG SpA, ref. INT032SP200) ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, ref. INT032CS). ELiTe InGenius PCR Cassette (EG SpA, ref. INT035PCR). ELiTe InGenius Waste Box (EG SpA, ref. F2102-000). 300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., ref. TF-350-L-R-S) com o ELiTe InGenius apenas. 1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Switzerland, ref. 30180118) com o ELiTe BeGenius apenas. CPE - Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE). C. difficile – ELiTe Positive Control (EG SpA, ref. M800373) InhibitEX Buffer (QIAGEN GmbH, Alemanha, ref. 19593), ou S. T.A.R. buffer (Roche Diagnostics GmbH, ref. 3 335 208) ou um dispositivo equivalente. Minitip Flocked Swab® (COPAN Italia S.p.A., Itália, ref. 518CS01) ou um dispositivo equivalente.
ELiTe BeGenius (EG SpA, ref. INT040). ELiTe BeGenius Software versão 2.1.0 (ou superior). Cdiff ELiTe_Be_PC , protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Positive Control. Cdiff ELiTe_Be_NC , protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control. Cdiff ELiTe_Be_ST_200_100 , protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra de fezes.	MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (Life Technologies, ref. 4346906) NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux SA, Ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), InviMag Universal Kit / IG (INVITEK, ref. 2450120100). ELiTe GALAXY 300 Extraction Kit (EG SpA, ref. INT021EX), CPE - Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE) C. difficile – ELiTe Positive Control (EG SpA, ref. M800373) S.T.A.R. buffer (Roche Diagnostics GmbH, ref. 3 335 208).
7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, ref. 4406985) NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, ref. 200111) ELiTe STAR (EG SpA, ref. INT010) ELiTe GALAXY (EG SpA, ref. INT020)	

8 AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido para utilização exclusiva in-vitro.

Avisos e precauções gerais

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem infecciosas. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Tubos, pontas e outros materiais que entrarem em contacto com as amostras biológicas devem ser tratados durante, pelo menos, 30 minutos com hipoclorito de sódio (lixívia) a 3% ou em autoclave durante uma hora a 121 °C antes da eliminação.

Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais usados na realização do ensaio como se fossem infecciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os resíduos devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os resíduos líquidos que contenham ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação. Não permita que os reagentes de extração entrem em contacto com hipoclorito de sódio (lixívia).

Use vestuário e luvas de proteção adequados e proteja os olhos e o rosto.

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

Não coma, beba, fume ou aplique produtos cosméticos nas áreas de trabalho.

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

Elimine os reagentes remanescentes e os desperdícios em conformidade com os regulamentos em vigor.

Leia atentamente todas as instruções fornecidas antes de efetuar o ensaio.

Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas com o produto.

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

Use apenas os reagentes fornecidos com o produto e os recomendados pelo fabricante.

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular requerem profissionais qualificados e com formação, para evitar o risco de resultados incorretos, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos na amostra ou à contaminação da amostra por produtos da PCR.

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter disponíveis áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/detecção de produtos de amplificação. Nunca introduza um produto de amplificação na área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter disponíveis batas, luvas e ferramentas de laboratório que sejam exclusivamente usadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/detecção de produtos de amplificação.

Nunca transfira batas, luvas ou ferramentas de laboratório da área designada para a amplificação/detecção de produtos de amplificação para a área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

São necessárias batas de laboratório, luvas e ferramentas para preparação da sessão de trabalho.

As amostras devem ser adequadas e, se possível, exclusivas para este tipo de análise. As amostras devem ser manuseadas sob uma câmara de fluxo laminar. As pipetas usadas no manuseamento de amostras devem ser usadas exclusivamente para este fim específico. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, estar livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os reagentes devem ser manuseados sob uma câmara de fluxo laminar. As pipetas usadas no manuseamento dos reagentes devem ser usadas exclusivamente para este fim. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os produtos de extração devem ser manuseados de modo a reduzir a dispersão para o ambiente, para evitar a possibilidade de contaminação.

As PCR Cassette devem ser manuseadas com cuidado de modo a evitar a emissão do produto da PCR para o ambiente e a contaminação da amostra e do reagente.

Avisos e precauções específicos para os componentes

Table 3

Componente	Temperatura de armazenamento	Utilização a partir da primeira abertura	Ciclos de congelação / descongelação	Estabilidade de bordo (ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius)
Cdiff PCR Mix	-20 °C ou menos (ao abrigo da luz solar)	um mês	até cinco	até cinco sessões separadas* de três horas cada

*com congelamento intermédio

9 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius

9.1 Amostras

Este produto destina-se a ser usado no instrumento **ELiTe InGenius** e **ELiTe BeGenius** com o ácido nucleico extraído das seguintes amostras clínicas identificadas e manuseadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, e colhidas, transportadas e armazenadas sob as condições seguintes:

Table 4

Amostra	Requisitos de colheita	Condições de transporte/armazenamento			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2° / +8°C*	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
Fezes nativas	colhidas sem conservantes	≤ 24 horas	≤ 48 horas	≤ 1 mês	> 1 mês

Recomenda-se a divisão das amostras em alíquotas antes da congelação, para evitar ciclos repetidos de congelação / descongelação. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Siga as instruções descritas abaixo para o pré-tratamento de amostras com InhibitEX Buffer (QIAGEN, Alemanha. ref. 19593):

Procedimento de pré-tratamento a partir de vezes nativas colhidas sem conservantes

- transfira 1 mL de tampão InhibitEX Buffer para um tubo de 2 mL Sarstedt,
- colha a amostra de fezes com uma Minitip Flocked Swab com quebra de 80mm (Copan), colha a amostra de diferentes porções de fezes e elimine o excesso inclinando contra a parede do recipiente,
- insira a zaragatoa no tubo Sarstedt de 2 mL que contém o tampão InhibitEX e rode-a pelo menos 10 vezes, inclinando contra a parede,
- elimine a zaragatoa e feche a tampa do tubo,
- misture por vórtice durante cerca de 60 segundos,
- incube num termomisturador a cerca de +80 °C e a cerca de 800 rpm durante 10 min,
- centrifugue a 10.000x RCF durante 15 segundos,
- transfira cuidadosamente 200 µL do sobrenadante das fezes clarificado para um tubo de extração (para o instrumento ELiTe InGenius) ou para um tubo Sarstedt de 2 mL (para o instrumento ELiTe BeGenius), tendo o cuidado de não afetar o material fecal sedimentado.

Siga as instruções descritas abaixo para o pré-tratamento de amostras com tampão S.T.A.R. (Roche Diagnostics GmbH, ref. 3 335 208):

Procedimento de pré-tratamento a partir de vezes nativas colhidas sem conservantes

- prepare um tubo de 1,5 mL identificado para cada uma das fezes não tratadas e transfira 0,8 mL de tampão S.T.A.R. para um tubo.
- submeta a vórtice as fezes não tratadas e, em seguida, utilize uma pipeta com uma ponta resistente a aerossol para transferir aproximadamente 200 µL (use uma ponta de orifício largo ou uma espátula de plástico, conforme necessário para amostras de fezes espessas) de fezes não tratadas para o tubo de 1,5 mL que contém o tampão S.T.A.R.
- tape bem o tubo e, em seguida, submeta a vórtice o tubo para homogeneizar a mistura (20-30 seg).
- Centrifugue a solução homogeneizada a 13.000×g (RCF) durante 1 minuto para clarificar a amostra.
- transfira cuidadosamente 200 µL do sobrenadante das fezes clarificado para um tubo de extração (para o instrumento ELiTe InGenius) ou para um tubo Sarstedt de 2 mL (para o instrumento ELiTe BeGenius).
- Armazene as fezes clarificadas a +2 / +8 °C durante até 7 dias antes de efetuar a extração.

NOTE

O tampão S.T.A.R. deve ser armazenado à temperatura ambiente. Podem formar-se precipitados brancos quando o tampão é armazenado abaixo da temperatura ambiente. Antes de iniciar o procedimento de extração, verifique se se formaram precipitados e, em caso afirmativo, aqueça a solução a 30-40 °C em banho-maria ou na incubadora até que os precipitados se dissolvam.

Guarde os ácidos nucleicos purificados a +2/+8 °C se forem usados no mesmo dia em que foram extraídos ou a uma temperatura inferior a -20 °C para um armazenamento a longo prazo.

Para realizar o teste das amostras no **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**, devem ser usados os seguintes protocolos de ensaio. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com o **ELITE InGenius** ou **ELITE BeGenius** com as matrizes indicadas.

Table 5 Protocolos de ensaio para o C. difficile ELITE MGB Kit

Amostra	Instrumento	Nome do protocolo de ensaio	Relatório	Características
Fezes nativas colhidas sem conservantes	ELITE InGenius	Cdiff ELITE_ST_200_100	Positiva / Negativa	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição do extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL Análise de fusão: opcional
	ELITE BeGenius	Cdiff ELITE_Be_ST_200_100		

Para todos os protocolos, 200 µL de amostra pré-tratada devem ser transferidos para o tubo de extração (para ELITE InGenius) ou tubo Sarstedt de 2 mL (para ELITE BeGenius).

NOTE

A pipetagem de amostras para o **Extraction Tube** (Tubo de extração) ou para o **tubo Sarstedt de 2 mL** pode **gerar contaminação**. Utilize as pipetas adequadas e siga todas as recomendações reportadas na secção 8 AVISOS E PRECAUÇÕES page 6

Os ácidos nucleicos purificados podem ser deixados à temperatura ambiente durante 16 horas e armazenados a -20 °C ou abaixo durante não mais de um mês.

Consulte "Substâncias Potencialmente Interferentes" na secção **12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITE InGenius e ELITE BeGenius** page 19 para verificar os dados relativos a substâncias interferentes.

9.2 Controlos da PCR

Os resultados do controlo da PCR têm de ser gerados e aprovados para cada lote de reagente de PCR.

- Para o Positive Control, use o produto **C. difficile – ELITE Positive Control** (não fornecido com este kit) com os protocolos de ensaio **Cdiff ELITE_PC** ou **Cdiff ELITE_Be_PC**.
- Para o Negative Control, utilize água de grau biológico molecular (não fornecida com este kit) com os protocolos de ensaio **Cdiff ELITE_NC** ou **Cdiff ELITE_Be_NC**.

NOTE

O **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** permite a geração e o armazenamento e a validação do controlo de PCR para cada lote de reagente de PCR. Os resultados do controlo da PCR expiram após **15 dias** e, nesse momento, é necessário voltar a executar os controlos positivos e negativos.

Os Controlos da PCR devem ser novamente testados se ocorrer algum dos seguintes eventos:

- se for usado um novo lote de reagentes,
- os resultados da análise de controlo da qualidade se encontrarem fora da especificação (ver o parágrafo seguinte),
- for realizada qualquer reparação ou manutenção significativa no **ELITE InGenius** ou **ELITE BeGenius**.

9.3 Controlos da qualidade

Recomenda-se a verificação do procedimento de extração e PCR. Podem ser usadas amostras arquivadas ou material de referência certificado. Os controlos externos devem ser usados em conformidade com as organizações de acreditação locais, estatais e federais, consoante aplicável.

Os controlos externos para ensaios de *Clostridium difficile* são fornecidos por vários fabricantes (por exemplo, Qnostics Ltd, UK e ZeptoMetrix Corp., US).

10 PROCEDIMENTO do ELITE InGenius

O procedimento para uso do **C. difficile ELITE MGB Kit** com o **ELITE InGenius** é composto por três passos:

Table 6

PASSO 1	Verificação da prontidão do sistema	
PASSO 2	Preparação da sessão	A) Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR])
		B) Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR]),
		C) Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [apenas PCR]).
PASSO 3	Revisão e aprovação de resultados	1) Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control
		2) Validação dos resultados das amostras
		3) Elaboração do relatório do resultado da amostra

PASSO 1 - Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- - ligue o **ELITE InGenius** e inicie sessão no modo “**CLOSED**” (fechado),
- no menu “Controlos” na página inicial, verifique se os controlos de PCR (**Positive Control**, **Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de **PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote da **PCR Mix** execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,
- escolher o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA. (ver “Amostras e Controlos”)

Se o protocolo do ensaio que precisa não estiver carregado no sistema, contacte o Serviço de Apoio ao cliente da ELITechGroup de sua localidade.

PASSO 2 - Configuração da sessão

O **C. difficile ELITE MGB Kit** pode ser usado no **ELITE InGenius** para realizar:

- A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]),
- B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),
- C. Execução do Positive Control e Negative Control (apenas PCR).

Todos os parâmetros requeridos estão incluídos no Protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente carregados quando o Protocolo de ensaio é selecionado.

NOTE

O **ELITE InGenius** pode ser ligado ao "Laboratory Information System" (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite descarregar a informação da sessão. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Antes de configurar uma execução:

Descongele os tubos **PCR Mix** necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para **24 testes** em condições ideais de utilização (pelo menos 5 testes por sessão). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

Proteja a **PCR Mix** da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

Para configurar um dos três tipos de execução, siga os passos abaixo diante da GUI

Table 7

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução do Positive e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
1	Identifique amostras e, se necessário, descongele até à temperatura ambiente. Pré-trate as amostras de acordo com o procedimento descrito na secção "Amostras e Controlos". Para este ensaio, 200 µL da amostra pré-tratada devem ser transferidos para um Tubo de extração anteriormente identificado.	Descongele os Elution tubes contendo os ácidos nucleicos extraídos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.	Descongele os tubos de Positive Control à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 4 reações.
2	Descongele os tubos de CPE necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 12 extrações.	Não aplicável	Prepare o Negative Control transferindo pelo menos 50 µL de água de grau de biologia molecular para um "Elution tube" (Tubo de eluição), fornecido com o ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home".	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home".	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home".
4	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.
5	Para cada amostra, atribua um Track e introduza a "SampleID" (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.	Para cada amostra, atribua um Track e introduza a "SampleID" (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.	Não aplicável

Table 7 (continued)

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução do Positivo e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
6	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos"). Introduza o número do lote e a data de validade do Positive Control e da água de grau biológico molecular.
7	Certifique-se de que o "Protocol" (Protocolo) apresentado é: "Extract + PCR" (Extrair + PCR).	Selecione "PCR Only" (apenas PCR) na coluna "Protocol".	Certifique-se de que "PCR Only" (Apenas PCR) está selecionado na coluna "Protocol" (Protocolo).
8	Selecione a posição de carregamento da amostra como "Extraction Tube" (Tubo de extração) na coluna "Sample Position" (Posição da amostra).	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" (Posição da amostra) é "Elution Tube (bottom row)" (Tubo de eluição [linha inferior]).	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" (Posição da amostra) é "Elution Tube (bottom row)" (Tubo de eluição [linha inferior]).
9	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
10	Carregue a CPE e PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza a CPE e o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.	Carregue a PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.	Carregue a PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.
11	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
12	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.
13	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
14	Carregue a PCR Cassette , os cartuchos de extração ELITE InGenius SP 200 e todos os consumíveis e amostras necessários para serem extraídos	Carregue a PCR Cassette e os tubos de eluição com as amostras extraídas	Carregue os tubos de PCR Cassette, Positive Control e Negative Control.
15	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
16	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
17	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

Quando a sessão é concluída, o **ELITE InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

NOTE

No final da execução a restante amostra extraída no **Elution tube** (Tubo de eluição) deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 ± 10 °C durante não mais de um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

NOTE

No final da operação, a **PCR Mix** pode ser retirada do instrumento, tapada e armazenada a -20 °C ou abaixo ou pode ser mantida no bloco frigorífico durante até 5 sessões de trabalho de 3 horas; misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a próxima sessão.

NOTE

No final da execução, o **Positive Control** restante deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C ou menos. Evite o derrame de **Positive Control**. O **Negative Control** restante deve ser eliminado.

NOTE

O **Positive Control** pode ser usado para 4 sessões separadas de 3 horas cada.

NOTE

No final da execução, a **PCR Cassette** e os outros consumíveis têm de ser eliminados seguindo todos os regulamentos governamentais e ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

O **ELITE InGenius** monitoriza os sinais de fluorescência do alvo e do Internal Control para cada reação e aplica automaticamente os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo de ensaio) para gerar curvas de PCR que são então interpretadas sob a forma de resultados.

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã “Results Display” (Exibição dos resultados). Neste ecrã são mostrados os resultados e informações sobre a execução. A partir deste ecrã é possível aprovar os resultados, imprimir ou guardar os relatórios (“Sample Report” ou “Track Report”). Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

O sistema **ELITE InGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite carregar os resultados da sessão no centro de dados laboratoriais. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

O **ELITE InGenius** gera os resultados com o **C. difficile ELITE MGB Kit** através do seguinte procedimento:

1. Validação dos resultados de Positive Control e Negative Control,
2. Validação dos resultados da amostra,
3. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

Validação da amplificação dos resultados de Positive Control e Negative Control

O **ELITE InGenius Software** interpreta os resultados da PCR para os alvos da reação de Positive Control e Negative Control com os parâmetros dos protocolos de ensaio **ELITE_PC** e **ELITE_NC**. Os valores de Ct e Tm resultantes são usados para verificar o sistema (lote de reagentes e instrumento).

Os resultados do Positive Control e Negative Control, específicos para o lote do reagente de PCR, são registados na base de dados (Controlos). Podem ser visualizados e aprovados pelos utilizadores “Administrator” (Administrador) ou “Analyst” (Analista) seguindo as instruções na GUI.

Os resultados de Positive Control e Negative Control expiram após **15 dias**.

Os resultados da amplificação do Positive Control e Negative Control são usados pelo **software ELITE InGenius** para preparar os Gráficos de controlo que monitorizam os desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

Se o resultado de Positive Control ou Negative Control não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Failed" no ecrã "Calibration". Neste caso, os resultados não podem ser aprovados e as execuções de têm de Positive Control ou Negative Control têm de ser repetidas.

NOTE

Se o resultado de Positive Control ou Negative Control não for válido e as amostras tiverem sido incluídas na mesma execução, as amostras podem ser aprovadas mas os resultados não são válidos. Neste caso, o controlo(s) falhado e as amostras têm de ser todos repetidos.

Validação dos resultados da amostra

O **ELITE InGenius software** interpreta os resultados de PCR para o alvo (canal **Toxina A** e **Toxina B**) e o Internal Control (canal **IC**) com os parâmetros do Protocolo de Ensaio **Cdiff ELITE_ST_200_100**.

Os resultados são mostrados no ecrã "Result Display".

Os resultados da amostra podem ser aprovados quando forem verdadeiras as duas condições reportadas na tabela abaixo.

Table 8

1) Positive Control	Estado
Positive Control de <i>C. difficile</i>	APROVADO
2) Negative Control	Estado
Negative control de <i>C. difficile</i>	APROVADO

Os resultados da amostra são automaticamente interpretados pelo **software ELITE InGenius** usando os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo do ensaio).

Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado.

Para cada amostra o sistema comunica uma combinação das seguintes mensagens a especificar se os ADN dos agentes patogénicos foram detetados ou não detetados.

Table 9

Resultado da execução da amostra	Interpretação
Cdiff: DNA Detected (Cdiff: DNA Detetado)	Foi detetado ADN do gene da toxina A ou do gene da toxina B de <i>C. difficile</i> na amostra. A amostra é positiva para <i>C. difficile</i> e pode ser toxigénica .
Cdiff: DNA Not Detected or below LoD (Cdiff: DNA não detetado ou abaixo de LoD)	Não foi detetado ADN do gene da toxina A e do gene da toxina B de <i>C. difficile</i> na amostra. A amostra é válida negativa para <i>C. difficile</i> toxigénico ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
Invalid - Retest Sample (Inválido-Testar novamente a amostra)	Resultado do ensaio inválido causado por falha do Controlo Interno (extração incorreta, transferência de inibidores). O teste deve ser repetido.

As amostras reportadas como "Invalid - Retest Sample" (Inválido - Voltar a testar a amostra) pelo **software ELITE InGenius** não são adequadas para interpretação dos resultados. Neste caso, o ADN do Controlo Interno não foi detetado eficientemente devido a problemas no passo de amplificação ou extração (degradação do ADN, perda de ADN durante a extração ou transferência de inibidores na eluição), que pode causar resultados incorretos.

Quando o volume da eluição é suficiente, a amostra extraída pode ser novamente testada através de uma execução da amplificação no modo "PCR Only" (Apenas PCR). No caso de um segundo resultado inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova alíquota utilizando o modo "Extract + PCR". (ver [18 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS page 52](#))

As amostras reportadas como "Cdiff DNA Not Detected or below LoD" (Cdiff: DNA não detetado ou abaixo de LoD) são adequadas para análise mas não foi possível detetar ADN de *C. difficile* para os genes da toxina A e da toxina B. Neste caso não pode excluir-se que o ADN de *C. difficile* para os genes da toxina A e da toxina B esteja presente a uma concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver [12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITE InGenius e ELITE BeGenius page 19](#)). Em alternativa, pode estar presente na amostra *C. difficile* não toxigénico.

NOTE

Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados em combinação com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

Os resultados da execução da Amostra são guardados na base de dados e, se válidos, podem ser aprovados (Exibição dos resultados) pelos utilizadores "Administrator" (Administrador) ou "Analyst" (Analista), seguindo as instruções na GUI. A partir da janela "Result Display" (Exibição de resultados) é possível imprimir e guardar os resultados da execução da amostra como "Sample Report" (Relatório de amostra) e "Track Report" (Relatório de calha).

Elaboração do relatório do resultado da amostra

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e os relatórios podem ser exportados como "Sample Report" (Relatório da amostra) e "Track Report" (Relatório da calha).

O "Sample Report" (Relatório da amostra) apresenta os detalhes dos resultados pela amostra selecionada (SID).

O "Track Report" (Relatório do track) apresenta os detalhes do resultado pelo Rastreo selecionado.

O "Sample Report" (Relatório da amostra) e o "Track Report" (Relatório da calha) podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

11 PROCEDIMENTO do ELITE BeGenius

O procedimento para uso do **C. difficile ELITE MGB Kit** com o **ELITE BeGenius** é composto por três passos:

Table 10

PASSO 1	Verificação da prontidão do sistema	
PASSO 2	Preparação da sessão	A) Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR])
		B) Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),
		C) Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [apenas PCR]).
PASSO 3	Revisão e aprovação de resultados	1) Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control
		2) Validação dos resultados das amostras
		3) Elaboração do relatório do resultado da amostra

PASSO 1 - Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- ligue o **ELITE BeGenius** e inicie sessão no modo "**CLOSED**" (fechado),
- no menu "Controlos" na página inicial, verifique se os controlos de PCR (**Positive Control, Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de **PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja controlos de PCR

válidos disponíveis para o lote da **PCR Mix**, execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,

- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (consulte “Amostras e Controlos”).

Se o protocolo do ensaio que precisa não estiver carregado no sistema, contacte o Serviço de Apoio ao cliente da ELITechGroup de sua localidade.

PASSO 2 - Configuração da sessão

OC. **difficile ELITE MGB Kit** pode ser usado no **ELITE BeGenius** para realizar:

- Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]),
- Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),
- Execução do Positive Control e Negative Control (apenas PCR).

Todos os parâmetros requeridos estão incluídos no protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente carregados quando o protocolo de ensaio é selecionado.

NOTE

O **ELITE BeGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite descarregar a informação da sessão. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Antes de configurar uma execução:

Descongele os tubos **PCR Mix** necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para **24 testes** em condições ideais de utilização (pelo menos 5 testes por sessão). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

Proteja a **PCR Mix** da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

Para configurar um dos três tipos de execução, siga os passos abaixo diante da GUI:

Table 11

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução do Positive e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
1	Identifique amostras e, se necessário, descongele até à temperatura ambiente. Pré-trate as amostras de acordo com o procedimento descrito na secção “Amostras e Controlos”. Para este ensaio, 200 µL da amostra pré-tratada devem ser transferidos para o tubo Sarstedt de 2mL previamente identificado.	Se necessário, descongele os tubos de eluição contendo os ácidos nucleicos extraídos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.	Descongele os tubos de Positive Control à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 4 reações. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.
2	Descongele os tubos de CPE necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 12 extrações.	Não aplicável	Prepare o Negative Control transferindo pelo menos 50 µL de água de grau de biologia molecular para um “Elution tube” (Tubo de eluição), fornecido com o ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Selecione “ Perform Run ” (Executar) a partir do ecrã “Home”.	Selecione “ Perform Run ” (Executar) a partir do ecrã “Home”	Selecione “ Perform Run ” (Executar) a partir do ecrã “Home”.

Table 11 (continued)

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução do Positivo e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
4	Retire os Suportes da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.	Retire os "Racks" de "Lane 1, 2 and 3" (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.	Retire os "Racks" de "Lane 1, 2 and 3" (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
5	Selecione o "Run mode": "Extract + PCR" (Extrair + PCR).	Selecione o "Run mode": "PCR Only" .	Selecione o "Run mode": "PCR Only" .
6	Carregue as amostras no "Sample Rack" (Suporte de amostras). Quando os tubos secundários "2 mL Tubes" forem carregados, use adaptadores azuis para o "Sample Rack" (Rack da amostra).	Carregue as amostras no "Elution Rack" (Rack de eluição).	Carregue os tubos de Positivo Control e Negative Control no "Elution Rack".
7	Insira o "Sample Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 5" (L5). Se necessário, insira a "Sample ID" (SID) para cada "Position" usada (se os tubos secundários estiverem carregados, sinalize o "2 mL Tube". Se os tubos secundários não possuírem código de barras, digite manualmente a "Sample ID").	Insira o "Elution Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 3" (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição), insira a "Sample ID" (Identificação da amostra), a "Sample matrix" (Matriz da amostra), o "Extraction kit" (Kit de extração) e o "Extracted elute vol." (Volume de eluato extraído).	Insira o "Elution Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 3" (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição) introduza o "Reagent name" (Nome do reagente) e o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
8	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
9	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume de entrada de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição extraído") é de 100 µL.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume de entrada de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição extraído") é de 100 µL.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.
10	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").
11	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
	NOTE Quando forem processadas mais de 12 amostras, repita o procedimento a partir do ponto 6.		-
12	Coloque os "Elution tubes" (Tubo de eluição) no "Elution Rack" (rack de eluição) (os tubos de eluição podem ser etiquetados com código de barras para melhorar a capacidade de localização).	Não aplicável	Não aplicável
13	Insira o "Elution Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 3" (L3). Quando mais de 12 amostras forem processadas, repita usando a "Lane 2" (L2).	Não aplicável	Não aplicável

Table 11 (continued)

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução do Positivo e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
14	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Não aplicável	Não aplicável
15	Carregue o CPE e a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).	Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).	Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).
16	Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) se estiver disponível, ou na "Lane 1" (L1). Se necessário, para cada reagente da PCR Mix e/ou CPE, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) se estiver disponível, ou na "Lane 1" (L1). Se necessário, para cada reagente da PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) se estiver disponível, ou na "Lane 1" (L1). Se necessário, para cada reagente da PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
17	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
18	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.
19	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
20	Carregue o " PCR Rack " com a "PCR Cassette" na área dos reagentes.	Carregue o " PCR Rack " com a "PCR Cassette" na área dos reagentes.	Carregue o " PCR Rack " com a "PCR Cassette" na área dos reagentes.
21	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
22	Carregue o "Extraction Rack" (rack de extração) com os cartuchos de extração "ELITE InGenius SP 200" e os consumíveis de extração necessários.	Não aplicável	Não aplicável
23	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
24	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

Quando a sessão é concluída, o **ELITE BeGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

NOTE

No final da execução a restante amostra extraída no **Elution tube** (Tubo de eluição) deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 ± 10 °C durante não mais de um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

NOTE

No final da operação, a **PCR Mix** pode ser retirada do instrumento, tapada e armazenada a -20 °C ou abaixo ou pode ser mantida no bloco frigorífico durante até 5 sessões de trabalho de 3 horas; misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a próxima sessão.

NOTE

No final da execução, o **Positive Control** restante deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C ou menos. Evite o derrame do Positive Control. O **Negative Control** restante deve ser eliminado.

NOTE

O **Positive Control** pode ser usado para 4 sessões separadas de 3 horas cada.

NOTE

No final da execução, a **PCR Cassette** e os outros consumíveis têm de ser eliminados seguindo todos os regulamentos governamentais e ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

O **ELiTe BeGenius** monitoriza os sinais de fluorescência do alvo e do Internal Control para cada reação e aplica automaticamente os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo de ensaio) para gerar curvas de PCR que são então interpretadas sob a forma de resultados.

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã “Results Display” (Exibição dos resultados). Neste ecrã são mostrados os resultados e informações sobre a execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios (“Sample Report” (Relatório da amostra) ou “Track Report” (Relatório da calha)). Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

O sistema **ELiTe BeGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite carregar os resultados da sessão no centro de dados laboratoriais. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

O **ELiTe BeGenius** gera os resultados com o **C. difficile ELiTe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

1. Validação dos resultados de Positive Control e Negative Control,
2. Validação dos resultados da amostra,
3. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

NOTE

Para mais informações, consulte o mesmo parágrafo do Procedimento do **ELiTe InGenius**.

12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius

12.1 Limite de deteção

A sensibilidade analítica deste ensaio, como Limite de deteção (LoD) da amplificação de ADN, permite detetar a presença de cerca de 10 cópias em 10 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

O LoD deste ensaio foi testado usando o ADN de plasmídeo que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. O ADN plasmídico foi diluído até um título de cerca de 10 cópias / 10 µL na presença de 20.000 cópias de Internal Control (IC) / 10 µL. Esta amostra foi testada em 18 réplicas, efetuando a amplificação com produtos ELiTechGroup S.p.A. em associação com dois instrumentos **ELiTe InGenius** diferentes.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 12

Amostras	N	positivo	negativo	Média de Ct da toxina A	Média de Ct da toxina B
10 cópias de ADN de plasmídeo + 20.000 cópias de CI	18	18	0	35,80	36,62

O LdD foi verificado através de testes em amostras de fezes clínicas negativas do ELITE InGenius adicionadas com materiais de referência (ZeptoMetrix) a 500 CFU/mL. O teste foi efectuado utilizando os procedimentos de pré-tratamento **InhibitEX Buffer** (QIAGEN) e **S.T.A.R. buffer** (Roche Diagnostics GmbH).

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 13

Amostra de fezes	Título (C-F-U/ /m-L)	N	Toxina B		Toxina A		% taxa de positividade
			Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Pré-tratamento com S.T.A.R Buffer	50-0	30	30	0	29	1	100 %
Pré-tratamento com Inhibitex Buffer	50-0	30	30	0	30	0	100 %

O valor LoD de 500 CFU/mL foi verificado através de testes em amostras de fezes nativas do ELITE BeGenius reforçadas com material de referência e os resultados obtidos confirmaram a concentração declarada.

12.2 Equivalência de pré-tratamento da matriz

A equivalência de pré-tratamento da matriz entre **InhibitEX Buffer** (QIAGEN) e **S. T. A. R. buffer** (Roche Diagnostics GmbH) foi verificada utilizando amostras de fezes nativas presumivelmente negativas colhidas de diferentes indivíduos e as mesmas amostras reforçadas com materiais de referência (ZeptoMetrix) a 3xLoD

Os resultados de percentagem de concordância negativa são comunicados na tabela seguinte.

Table 14

Amostras de fezes negativas	N	Toxina B		Toxina A		% de concordância negativa
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Pré-tratamento com STAR Buffer	26	1	25	0	26	96,2%
Pré-tratamento com Inibitex Buffer	26	1	25	0	26	96,2%

Os resultados de percentagem de concordância positiva são comunicados na tabela seguinte.

Table 15

Amostras de fezes reforçadas	N	Toxina B		Toxina A		% do acordo positivo
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Pré-tratamento com STAR Buffer	25	25	0	25	0	100%
Pré-tratamento com Inibitex Buffer	25	25	0	25	0	100%

12.3 Teste com material de referência certificado

Os desempenhos do produto foram avaliados utilizando o material de referência calibrado «Clostridium difficile 017 Evaluation Panel» (Qnostics, Ltd, Reino Unido). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação do resultado por produtos ELITechGroup S.p.A. em associação com o instrumento **ELITE InGenius**.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 16 Testes com «Clostridium difficile 017 Evaluation Panel»

Amostra	Conteúdo da amostra	Título nominal (CFU/mL)	Positivo/réplicas
CD1421749	<i>C. difficile</i> A-B+	8.0×10^4	2/2
CD1421759	<i>C. difficile</i> A-B+	8.0×10^5	2/2
CD1421769	<i>C. difficile</i> A-B+	8.0×10^6	2/2
CD142CS53	<i>C. sordellii</i> A-B-	2.1×10^5	0/2

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

Foi realizado um teste adicional usando o material de referência calibrado «Clostridium difficile 027 Evaluation Panel» (Qnostics, Ltd, Reino Unido). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação do resultado por produtos ELITechGroup S.p.A. em associação com o instrumento **ELITE InGenius**. Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Table 17 Testes com «Clostridium difficile 027 Evaluation Panel»

Amostra	Conteúdo da amostra	Título nominal (CFU/mL)	Positivo/réplicas
CD1422737	<i>C. difficile</i> A+B+	5.0×10^3	2/2
CD1422747	<i>C. difficile</i> A+B+	5.0×10^4	2/2
CD1422757	<i>C. difficile</i> A+B+	5.0×10^5	2/2
CD1422767	<i>C. difficile</i> A+B+	5.0×10^6	2/2

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

Os desempenhos do produto também foram avaliados usando o material de referência «QCMD 2013 Clostridium difficile EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido), um painel de *diluições de C. difficile* dentro do limite de concentração. Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação do resultado por produtos ELITechGroup S.p.A. em associação com o instrumento **ELITE InGenius**.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 18 Testes com «QCMD 2013 Clostridium difficile EQA Panel»

Amostra	Conteúdo da amostra	Título nominal (CFU/mL)	Estado da amostra	Pos./Rep.
CD13-01	C. difficile 027	4.6x10 ⁵	Frequentemente detetado	2/2
CD13-02	C. difficile 017	8.0x10 ⁶	Frequentemente detetado	2/2
CD13-03	Cd Negativo	-	Negativo	0/2
CD13-04	C. difficile 027	4.6x10 ⁶	Detetado	2/2
CD13-05	C. difficile 027	4.6x10 ⁶	Frequentemente detetado	2/2
CD13-06	C. difficile 017	8.0x10 ⁵	Frequentemente detetado	2/2
CD13-07	C. difficile 027	4.6x10 ³	Detetado	2/2
CD13-08	C. sordellii	2.1x10 ⁵	Negativo	0/2
CD13-09	C. difficile 027	4.6x10 ⁵	Frequentemente detetado	2/2
CD13-10	C. difficile 017	8.0x10 ⁴	Detetado	2/2

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

12.4 Reprodutibilidade com material de referência

A reprodutibilidade dos valores de C. difficile ELiTe MGB Kit em associação com o instrumento ELiTe InGenius foi testada através da análise do material de referência «NATrol™ C. difficile Verification Panel» (ZeptoMetrix, US) contendo os ribotipos 002, 017, 078 e 027.

A Reprodutibilidade foi obtida através da análise de amostras de painel em duplicado, em duas execuções por dia. Foram testados três lotes diferentes do produto em três dias diferentes, em três instrumentos diferentes e por três operadores diferentes.

Os valores Ct dos genes da toxina A e da toxina B foram usados para calcular a percentagem do Coeficiente de variabilidade (%CV) para avaliar a Capacidade de reprodução como imprecisão.

Na tabela seguinte é apresentado um resumo dos resultados.

Table 19

Amostra	Gene da toxina A				Gene da toxina B			
	Pos./rep.	Ct médio	SD	%CV	Pos./rep.	Ct médio	SD	%CV
C. difficile 002	12/12	20,70	0,31	1,50	12/12	21,78	0,23	1,05
C. difficile 017	12/12	24,39	0,20	0,84	12/12	25,48	0,11	0,43
C. difficile 078	12/12	24,32	0,24	0,98	12/12	25,30	0,09	0,34
C. difficile 027-1	12/12	22,42	0,25	1,12	12/12	23,13	0,16	0,71
C. difficile 027-2	12/12	24,10	0,32	1,32	12/12	24,82	0,25	1,01
C. sordellii	0/12	-	-	-	0/12	-	-	-

A Reprodutibilidade dos valores de Tc para os dois alvos mostrou um %CV baixo que não ultrapassou 2%.

Além disso, os valores da reprodutibilidade da temperatura de dissociação (Tm) obtidos pelos produtos ELiTechGroup S.p.A. em associação com o instrumento ELiTe InGenius foram testados através da análise do material de referência «NATrol™ C. difficile Verification Panel» (ZeptoMetrix, US).

A Reprodutibilidade foi obtida através da análise de amostras de painel em duplicado, em duas execuções por dia. Foram testados três lotes diferentes do produto em três dias diferentes, em três instrumentos diferentes e por três operadores diferentes.

Os valores Tm dos genes da toxina A e da toxina B foram usados para calcular o % CV para avaliar a Reprodutibilidade como imprecisão.

Na tabela seguinte é apresentado um resumo dos resultados.

Table 20

Amostra	Gene da toxina A				Gene da toxina B			
	N	Tm média	SD	%CV	N	Tm média	SD	%CV
<i>C. difficile</i> 002	12	64,78	0,16	0,25	12	60,73	0,22	0,37
<i>C. difficile</i> 017	12	64,59	0,10	0,15	12	60,58	0,29	0,48
<i>C. difficile</i> 078	12	64,55	0,09	0,14	12	60,57	0,28	0,47
<i>C. difficile</i> 027-1	12	64,73	0,17	0,26	12	62,98	0,22	0,35
<i>C. difficile</i> 027-2	12	64,68	0,12	0,19	12	63,12	0,23	0,37

A Reprodutibilidade dos valores de Tm para os dois alvos mostrou um %CV baixo que não ultrapassou 0,5%.

Curiosamente, enquanto o Tm para o gene da Toxina A resultou muito semelhante para todo o ribotipo de *C. difficile* analisado, o Tm para o gene da toxina B resultou agrupado em dois grupos: um inclui os ribotipos de *C. difficile* 002, 017 e 078, o outro o ribotipo de *C. difficile* 027 hipervirulento.

A análise agrupada é indicada na tabela seguinte.

Table 21

Amostra	Gene da toxina A				Gene da toxina B			
	N	Tm média	SD	%CV	N	Tm média	SD	%CV
<i>C. difficile</i> 002, 017, 078	60	64,67	0,15	0,24	36	60,63	0,27	0,45
<i>C. difficile</i> 027 hipervirulento					24	63,05	0,23	0,37

Esta aglomeração deve-se a dois polimorfismos de nucleótidos na região de hibridização da sonda do gene da toxina B partilhada pelo ribotipo 027 hipervirulento de *C. difficile* (por exemplo, estirpe R 12087, SEQID HM062510; estirpe UK1, SEQID KC292158; estirpe CD196, SEQID FN538970) e outras estirpes de *C. difficile* positivas para toxina binária de clado 2 (por exemplo, estirpe R9385, ribotipo 122, SEQID HM062502; estirpe R10870, ribotipo 111, SEQID HM062497; estirpe CH6230, ribotipo 251, SEQID HM062509; estirpe J9965, SEQID HM062500).

Com base nos resultados, pode ser definido um valor-limite de Tm de 62,0 °C para identificar a presença presumido do ribotipo 027 hipervirulento de *C. difficile* na amostra, conforme mostrado na tabela abaixo.

Table 22

Valores de Tm do gene da toxina B				
Outros <i>C. difficile</i>		Valor-limite de Tm	<i>C. difficile</i> 027 hipervirulento presumido	
Tm média	Média de Tm + 4SD		Média de Tm – 4 SD	Tm média
60,63	61,71	62,00	62,12	63,05

12.5 Marcadores potencialmente interferentes: Interferência

A inibição por marcadores potencialmente interferentes foi avaliada através da análise de um painel de ácidos nucleicos purificados a alta concentração (pelo menos 10^5 cópias/reacção) incluindo os seguintes organismos: *Aeromonas hydrophilia* (AH), *Bacteroides fragilis* (BF), *Vibrio cholera* (VC), *Helicobacter pylori* (HP), *Saccharomyces cerevisiae* (SC), *Plesiomonas shigelloides* (PS), *Klebsiella pneumoniae* (KC), *Escherichia coli* (Ecoli), *Serratia marcescens* (SM), *Acinetobacter baumannii* (AB), *Bifidobacterium spp* (Bifido), *Candida albicans* (CA), *Citrobacter freundii* (CF), *Clostridium nexile* (Cnex), *Proteus mirabilis* (PM), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Enterobacter cloacae* (EC), *Giardia lamblia* (GL), *Cryptosporidium spp* (CP), *Entamoeba histolytica* (EH), *Enterovirus*, *Adenovirus*, *Astrovirus*, *Norovirus*, *Rotavirus*, *Sapovirus*.

Os ADN genómicos de cada organismo a alta concentração (pelo menos 10^5 cópias/reacção) foram reforçados com ADN genómico de *Clostridioides difficile* (Vircell Microbiologists, Espanha, código MBC043), como material de referência numa concentração de cerca de 3×10^6 CFU/mL (1500 CFU/mL) e adicionado com 20.000 cópias/modelo de reacção de Internal Control (CPE - Internal Control) para replicar as amostras clínicas extraídas.

Também foram analisadas amostras de referência com os alvos de interesse, mas sem os potenciais organismos interferentes.

Cada organismo foi testado em 6 repetições em posições aleatórias no ELITE InGenius no modo “PCR Only” (Apenas PCR).

Nas tabelas seguintes é apresentado um resumo dos resultados.

Table 23

Amostra	N		Ct médio			% Pos. Concordância	Resultado
	Toxina B	Toxina A	Toxina B	Toxina A	CI		
Referência (Cdif)	6/6	6/6	37,29	37,08	24,41	100%	Ausência de inibição
Cdif + AH-BF-VC	6/6	6/6	36,97	36,57	24,27	100%	Ausência de inibição
Cdif + HP-SC-PS	6/6	6/6	37,33	37,42	23,92	100%	Ausência de inibição
Cdif + KP-Ecoli-SM	6/6	6/6	37,56	37,64	23,67	100%	Ausência de inibição
Cdif + AB-Bifido-CA	6/6	6/6	37,93	38,37	24,26	100%	Ausência de inibição
Cdif + CF-Cnex-PM	6/6	6/6	38,55	38,00	24,26	100%	Ausência de inibição
Cdif + PA-EC-GL	6/6	6/6	38,66	38,11	24,16	100%	Ausência de inibição
Cdiff+ EH	6/6	6/6	38,26	37,90	23,94	100%	Ausência de inibição
Cdiff+ CP	6/6	6/6	38,03	38,29	23,97	100%	Ausência de inibição
Cdiff-Adeno	6/6	6/6	37,81	37,49	23,64	100%	Ausência de inibição
Cdiff-Entero	6/6	6/6	37,62	37,86	23,03	100%	Ausência de inibição
Cdiff-Astro	6/6	6/6	37,58	37,34	24,11	100%	Ausência de inibição
Cdiff-Noro	6/6	6/6	37,75	37,90	24,22	100%	Ausência de inibição

Table 23 (continued)

Amostra	N		Ct médio			% Pos. Concordância	Resultado
	Toxina B	Toxina A	Toxina B	Toxina A	CI		
Cdiff-Sapo	6/6	6/6	37,21	36,92	23,92	100%	Ausência de inibição
Cdiff-Rota	6/6	6/6	37,74	37,45	22,90	100%	Ausência de inibição
Cdiff-Cnex	6/6	6/6	37,59	36,77	24,03	100%	Ausência de inibição

Todos os organismos potencialmente interferentes testados revelaram que não há inibição da amplificação do alvo de *C. difficile* utilizando o *C. difficile* ELITE MGB Kit.

12.6 Marcadores potencialmente interferentes: reatividade cruzada

A ausência de reatividade cruzada com potenciais organismos interferentes também foi verificada através da análise de um painel de ácidos nucleicos purificados de diferentes organismos conforme indicado nos marcadores potencialmente interferentes: Teste de interferência acima.

O ADN genómico de cada organismo a alta concentração (pelo menos 10^5 cópias/reação) foi adicionado com 20.000 cópias/modelo de reação de Internal Control (CPE - Internal Control) para imitar as amostras clínicas extraídas.

Também foram analisadas amostras de referência com os alvos de interesse, mas sem os potenciais organismos interferentes.

Cada organismo foi testado em 6 repetições em posições aleatórias no ELITE InGenius no modo "PCR Only" (Apenas PCR).

Nas tabelas seguintes é apresentado um resumo dos resultados.

Table 24

Amostra	Positivo/réplicas		Ct médio CI	% de concordância negativa	Resultado
	Toxina A	Toxina B			
Referência	0 / 6	0 / 6	24,55	100%	Sem reatividade cruzada
AH-BF-VC	0 / 6	0 / 6	23,77	100%	Sem reatividade cruzada
HP-SC-PS	0 / 6	0 / 6	23,72	100%	Sem reatividade cruzada
KP-Ecoli-SM	0 / 6	0 / 6	23,85	100%	Sem reatividade cruzada
AB-Bifido-CA	0 / 6	0 / 6	25,58	100%	Sem reatividade cruzada
CF-Cnex-PM	0 / 6	0 / 6	25,50	100%	Sem reatividade cruzada
PA-EC-GL	0 / 6	0 / 6	23,90	100%	Sem reatividade cruzada
CP-EH-Enteroc	0 / 6	0 / 6	23,77	100%	Sem reatividade cruzada
Adeno-Astro-Noro	0 / 6	0 / 6	23,87	100%	Sem reatividade cruzada

Table 24 (continued)

Amostra	Positivo/réplicas		Ct médio CI	% de concordância negativa	Resultado
	Toxina A	Toxina B			
Rota-Sapo	0 / 6	0 / 6	23,84	100%	Sem reatividade cruzada
C. nexile	0/6	6/6	23,74	0%	Reatividade cruzada

Todos os marcadores potencialmente interferentes testados revelaram que não há reatividade cruzada para o alvo *C. difficile* utilizando o *C. difficile* ELITE MGB Kit, à exceção de *Clostridium Nexile* estirpe VPI C48-37, que produziu reação cruzada com a reação de amplificação do gene da toxina B.

12.7 Substâncias potencialmente interferentes

O efeito de substâncias potencialmente interferentes foi avaliado através da análise de substâncias endógenas ou exógenas que podem ser encontradas em amostras de fezes nativas (matriz mais difícil), dentro de limites clinicamente relevantes. Em particular, as seguintes substâncias exógenas e endógenas foram testadas na tabela abaixo, conforme indicado no CLSI EP37 Ed1E:

Table 25

Substância interferente	Princípio ativo/produto	ID	Concentração
Enemas	Óleo de vaselina	VAS	20 mg/mL
Lubrificante espermicida	Nonoxynol-9	NON	1,2% v/v
Medicamentos anti-diarreicos	Subsalicilato de bismuto	BISM	0,87 mg/mL
	Cloridrato de Loperamida	LOP	0,005 mg/mL
Laxantes	Bisacodyl	BISA	0,25 mg /mL
Antibióticos	Azitromicina	AZI	10 µg /mL
	Vancomicina	VAN	0,12 mg/mL
	Metronidazol	MET	0,12 mg/mL
	Ampicilina	AMP	0,08 mg/mL
	Cefpodoxime	CEF	4,5 µg/mL
	Ciprofloxacina	CIP	5 µg/mL
Anti-inflamatórios	Hidro cortisona	HYD	3 mg/mL
Antiácidos	Carbonato de cálcio	CAL	0,5 mg/mL
	Ácido algínico	ALG	0,01 mg/mL
	Hidróxido de alumínio	ALU	0,03 mg/mL
	Trissilicato de magnésio	MAG	0,01 mg/mL
Sangue Total	Hemoglobina, imunoglobulinas, ácidos nucleicos, etc.	WB	5% v/v
Componentes fecais	Mucina	MUC	3 mg/mL
	Ácido palmítico	PAL	0,85 mg/mL
	Ácido esteárico	STE	0,85 mg/mL

As substâncias potencialmente interferentes foram testadas em 6 grupos de 3 substâncias. A mucina, cefpodoxime, ciprofloxacina, hidrocortisona e sangue total foram testados isoladamente.

Material de referência de *Clostridioides difficile* NAP1 (ZeptoMetrix) foi reforçado em amostras de fezes nativas a uma concentração de cerca de 3xLdD.

Também foram analisadas amostras de referência com os alvos de interesse, mas sem as potenciais substâncias interferentes.

Cada organismo foi testado em 6 repetições em posições aleatórias no ELITE InGenius no modo “Extract + PCR” (Extrair + PCR).

Nas tabelas seguintes é apresentado um resumo dos resultados.

Table 26

Amostra	Positivo/réplicas		Ct médio			% do acordo positivo		Resultado
	Toxina B	Toxina A	Toxina B	Toxina A	CI	Toxina B	Toxina A	
Referência (Cdiff)	6/6	6/6	34,68	34,53	25,35	100%	100%	Ausência de inibição
Cdiff+ VAN+MET+AMP	6/6	6/6	36,43	36,53	25,54	100%	100%	Ausência de inibição
Cdiff+LOP+BISA+AZI	6/6	6/6	36,31	36,27	25,46	100%	100%	Ausência de inibição
Cdiff+ ALG+ALU+MAG	6/6	6/6	36,41	36,48	25,72	100%	100%	Ausência de inibição
Cdiff+ WB	6/6	6/6	35,64	35,41	25,72	100%	100%	Ausência de inibição
Cdiff+VAS+NON+BISM	6/6	6/6	34,75	34,31	25,36	100%	100%	Ausência de inibição
C.dif+CAL+PAL+STE	6/6	6/6	35,95	36,20	25,70	100%	100%	Ausência de inibição
C.dif+MUC	6/6	6/6	36,96	37,24	25,70	100%	100%	Ausência de inibição
Cdiff+ CEF	6/6	6/6	35,14	34,93	25,69	100%	100%	Ausência de inibição
Cdiff+ CIP	6/6	6/6	34,96	34,54	25,79	100%	100%	Ausência de inibição
Cdiff+ HYD	6/6	6/6	34,85	34,26	25,86	100%	100%	Ausência de inibição

Todas as substâncias potencialmente interferentes testadas revelaram que não há inibição da amplificação do alvo de *C. difficile* utilizando o *C. difficile* ELITE MGB Kit.

12.8 Substâncias potencialmente interferentes: reatividade cruzada

A ausência de reatividade cruzada com potenciais substâncias interferentes também foi verificada através da análise de substâncias endógenas ou exógenas que podem ser encontradas em amostras de fezes nativas (matriz mais difícil), dentro de limites clinicamente relevantes, conforme relatado no teste de substâncias potencialmente interferentes acima.

As substâncias potencialmente interferentes foram testadas em 6 grupos de 3 substâncias. A mucina e o sangue total foram testados isoladamente.

A cada amostra foram adicionadas 20.000/modelo de reação de Internal Control (CPE - Internal Control) para replicar a amostra clínica extraída.

Também foi analisada a amostra de referência sem as potenciais substâncias interferentes.

Cada amostra foi extraída e amplificada em 6 repetições, em posições aleatórias, no modo "Extract + PCR" (Extrair + PCR), no sistema ELITE InGenius.

Cada organismo foi testado em 6 repetições em posições aleatórias no ELITE InGenius no modo "Extract + PCR" (Extrair + PCR).

Nas tabelas seguintes é apresentado um resumo dos resultados.

Table 27

Amostra	Positivo/réplicas		Ct médio CI	% de concordância negativa	Resultado
	Toxina A	Toxina B			
Referência	0 / 6	0 / 6	25,91	100%	Sem reatividade cruzada
LOB+BISA+AZI	0 / 6	0 / 6	25,69	100%	Sem reatividade cruzada
VAN+MET+AMP	0 / 6	0 / 6	25,58	100%	Sem reatividade cruzada
ALG+ALU+MAG	0 / 6	0 / 6	25,79	100%	Sem reatividade cruzada
CEF+CIP+HYD	0 / 6	0 / 6	25,77	100%	Sem reatividade cruzada
WB	0 / 6	0 / 6	25,50	100%	Sem reatividade cruzada
VAS+NON+BISM	0 / 6	0 / 6	25,88	100%	Sem reatividade cruzada
CAL+PAL+STE	0 / 6	0 / 6	25,64	100%	Sem reatividade cruzada
MUC	0 / 6	0 / 6	25,63	100%	Sem reatividade cruzada

Todas as substâncias potencialmente interferentes testadas revelaram que não há reatividade cruzada para o alvo *C. difficile* usando o *C. difficile* ELITE MGB Kit.

12.9 Repetibilidade

A Repetibilidade do ensaio foi avaliada no ELITE InGenius e ELITE BeGenius através da análise de um painel de amostras de fezes nativas negativas ou reforçadas com material de referência de *C. difficile* (Zeptometrix).

Um exemplo dos resultados da repetibilidade intra-sessão (em um dia) são mostrados nas tabelas seguintes.

Table 28 Repetibilidade intra-sessão do ELITE InGenius (dia 1)

Amostra	N	Toxina B			Toxina A			% Concordância
		Ct médio	SD	%CV	Ct médio	SD	%CV	
Neg	8	-	-	-	-	-	-	100%
3x o LdD	8	36,14	0,35	0,96	35,74	0,57	1,59	100%
10x o LdD	8	33,68	0,33	0,99	33,05	0,39	1,19	100%

Table 29 Repetibilidade intra-sessão do ELITE BeGenius (dia 1)

Amostra	N	Toxina B			Toxina A			% Concordância
		Ct médio	SD	%CV	Ct médio	SD	%CV	
Neg	8	-	-	-	-	-	-	100%
3x o LdD	8	36,84	0,37	1,01	36,31	0,51	1,41	100%
10x o LdD	8	34,12	0,44	1,29	33,17	0,45	1,35	100%

Um exemplo dos resultados da repetibilidade inter-sessão (em dois dias) são mostrados nas tabelas seguintes.

Table 30 Repetibilidade inter-sessão do ELITE InGenius

Amostra	N	Toxina B			Toxina A			% Concordância
		Ct médio	SD	%CV	Ct médio	SD	%CV	
Neg	16	-	-	-	-	-	-	100%
3x o LdD	16	36,11	0,35	0,96	35,75	0,44	1,22	100%
10x o LdD	16	33,51	0,31	0,93	32,88	0,41	1,24	100%

Table 31 Repetibilidade inter-sessão do ELITE BeGenius

Amostra	N	Toxina B			Toxina A			% Concordância
		Ct médio	SD	%CV	Ct médio	SD	%CV	
Neg	16	-	-	-	-	-	-	100%
3x o LdD	16	36,73	0,39	1,06	36,03	0,61	1,70	100%
10x o LdD	16	33,97	0,39	1,16	33,02	0,47	1,44	100%

No teste de repetibilidade, o C. difficile ELITE MGB Kit detetou todas as amostras conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV menor que 5%.

12.10 Reprodutibilidade

A Reprodutibilidade do ensaio foi avaliada no ELITE InGenius e ELITE BeGenius através da análise de um painel de amostras de fezes nativas negativas ou reforçadas com material de referência de *C. difficile* (Zeptomatrix).

Um exemplo de resultados de reprodutibilidade interlote (em dois lotes) é apresentado nas tabelas abaixo.

Table 32 Reprodutibilidade interlote do ELITE InGenius

Amostra	N	Toxina B			Toxina A			% Concordância
		Ct médio	SD	%CV	Ct médio	SD	%CV	
Neg	8	-	-	-	-	-	-	100%
3x o LdD	8	36,22	0,67	1,85	35,24	0,28	0,78	100%
10x o LdD	8	33,86	0,27	0,81	32,72	0,34	1,05	100%

Table 33 Reprodutibilidade interlote do ELITE BeGenius

Amostra	N	Toxina B			Toxina A			% Concordância
		Ct médio	SD	%CV	Ct médio	SD	%CV	
Neg	8	-	-	-	-	-	-	100%
3x o LdD	8	36,47	0,61	1,69	34,63	0,44	1,28	100%
10x o LdD	8	33,92	0,24	0,72	32,20	0,23	0,72	100%

Um exemplo de reprodutibilidade inter-instrumento (em dois lotes) é apresentado nas tabelas abaixo.

Table 34 Reprodutibilidade inter-instrumento do ELITE InGenius

Amostra	N	Toxina B			Toxina A			% Concordância
		Ct médio	SD	%CV	Ct médio	SD	%CV	
Neg	16	-	-	-	-	-	-	100%
3x o LdD	16	35,74	0,27	0,75	34,92	0,34	0,96	100%
10x o LdD	16	33,41	0,69	2,05	32,47	0,59	1,82	100%

Table 35 Reprodutibilidade inter-instrumento do ELITE BeGenius

Amostra	N	Toxina B			Toxina A			% Concordância
		Ct médio	SD	%CV	Ct médio	SD	%CV	
Neg	16	-	-	-	-	-	-	100%
3x o LdD	16	36,26	0,46	1,27	34,74	0,63	1,81	100%
10x o LdD	16	33,55	0,35	1,03	32,04	0,36	1,13	100%

No teste de reprodutibilidade, o C. difficile ELITE MGB Kit detetou todas as amostras conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV menor que 5%.

12.11 Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada em associação com o ELITE InGenius, analisando amostras clínicas de fezes certificadas negativas para ADN de C. difficile.

Dado que o ELITE BeGenius tem desempenhos analíticos equivalentes ao ELITE InGenius, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a Especificidade de diagnóstico do ensaio obtido em associação com o ELITE InGenius também se aplica ao ELITE BeGenius.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 36

Fezes negativas	N	Positivo	Negativo	% de especificidade do diagnóstico
C. difficile	45	1	44	97,8%

O valor-limite de IC está definido para 32 para o ELITE InGenius e o ELITE BeGenius.

12.12 Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A Sensibilidade de Diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada em associação com o ELITE InGenius através da análise de amostras clínicas de fezes certificadas positivas para ADN de *C. difficile*.

Dado que o ELITE BeGenius tem desempenhos analíticos equivalentes ao ELITE InGenius, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a sensibilidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o ELITE InGenius também se aplica ao ELITE BeGenius.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 37

Fezes positivas	N	Positivo	Negativo	%Sensibilidade de diagnóstico
<i>C. difficile</i>	30	30	0	100%

NOTE

Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados no Ficheiro técnico do produto para o "C. difficile ELITE MGB Kit", FTP M800358.

13 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA OUTROS SISTEMAS

13.1 Amostras

Este produto deve ser utilizado com o ADN extraído das seguintes amostras clínicas: fezes líquidas ou não formadas.

As amostras de fezes, destinadas à extração de ADN, devem ser colhidas seguindo os procedimentos padrão de colheita e manipulação de fezes e identificadas de acordo com as diretrizes do laboratório. As fezes não tratadas devem ser adequadamente seladas num recipiente esterilizado com tampa de rosca que possa impedir o derrame acidental do conteúdo e devem ser transportadas de acordo com todos os regulamentos aplicáveis para o transporte de agentes etiológicos. Armazene amostras refrigeradas (+2 / +8 °C) durante até 48 horas antes do processamento. Se a clarificação das fezes não puder ser realizada dentro de 48 horas após a colheita, conserve as amostras a ≤-70 °C.

Prepare um tubo de 1,5 mL identificado para cada uma das fezes não tratadas e transfira 0,8 mL de tampão S.T.A.R. para o tubo. Submeta a vórtice as fezes não tratadas e, em seguida, utilize uma pipeta com uma ponta resistente a aerossol para transferir aproximadamente 200 µL (use uma ponta de orifício largo ou uma espátula de plástico, conforme necessário para amostras de fezes espessas) de fezes não tratadas para o

tubo de 1,5 mL que contém o tampão S.T.A.R. Tape bem o tubo e, em seguida, submeta a vórtice o tubo para homogeneizar a mistura (20-30 seg). Centrifugue a solução homogeneizada a 13.000×g (RCF) durante 1 minuto para clarificar a amostra. Transfira cuidadosamente 400-650 µL do sobrenadante das fezes clarificado para um tubo secundário identificado, tendo o cuidado de não perturbar o material fecal em grumos. Queira consultar as instruções de utilização do kit de extração para identificar os volumes e os tubos secundários compatíveis com os sistemas de extração. Armazene as fezes clarificadas a +2 / +8 °C durante até 7 dias antes de efetuar a extração.

NOTE

O tampão S.T.A.R. deve ser armazenado à temperatura ambiente. Podem formar-se precipitados brancos quando o tampão é armazenado abaixo da temperatura ambiente. Antes de iniciar o procedimento de extração, verifique se se formaram precipitados e, em caso afirmativo, aqueça a solução a 30-40 °C em banho-maria ou na incubadora até que os precipitados se dissolvam.

NOTE

Para processar amostras de fezes clarificadas com o **Sistema ELITE STAR** e a **versão do software 3.4.13** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **UUNI_E100_S200_ELI**, que utiliza 200 µL de amostra e elui o extrato em 100 µL (a eluição é feita normalmente em 115 µL, dos quais 100 µL são recuperados). Após transferência para o tubo secundário, carregue as amostras clarificadas no **ELITE STAR**. É sempre necessário um volume mínimo de 400-600 µL para cada amostra. Adicione **50 µL de CPE - Internal Control** e **750 µL de água de grau de biologia molecular** para o **tubo proteinase-transportadora** conforme indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

Guarde os ácidos nucleicos purificados a +2/+8 °C se forem usados no mesmo dia em que foram extraídos ou a uma temperatura inferior a -20 °C para um armazenamento a longo prazo.

NOTE

Para processar amostras de fezes clarificadas com o **Sistema ELITE GALAXY** com a **versão do software 1.3.1** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **xNA Extraction (Universal)**, que utiliza 300 µL de amostra e elui o extrato em 100 µL (a eluição é feita normalmente em 110 µL, dos quais 100 µL são recuperados). Após transferência para o tubo secundário, carregue as amostras clarificadas no **ELITE GALAXY**. É sempre necessário um volume mínimo de 400-650 µL, dependendo da classe do tubo usado, para cada amostra. Adicione **2,5 µL / amostra de CPE - Internal Control** e **7,5 µL / amostra de água de grau de biologia molecular na solução de IC + Transportador** conforme indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

Guarde os ácidos nucleicos purificados a +2/+8 °C se forem usados no mesmo dia em que foram extraídos ou a uma temperatura inferior a -20 °C para um armazenamento a longo prazo.

NOTE

Para processar amostras de fezes clarificadas com **NucliSENS® easyMAG®**, transfira 20 µL de cada uma das fezes clarificadas para o recipiente de amostras descartável **NucliSENS easyMAG** (8 amostras por recipiente e até três recipientes por execução) conforme estabelecido na lista de trabalho dos instrumentos.

Configure um pedido de extração no **sistema «NucliSENS easyMAG»** conforme se segue:

- Matriz = fezes;
- Protocolo = Genérico 2.0.1;
- Volume (mL) = 0,02 mL;
- Eluição (µL) = 110 µL;
- Tipo = Primário.

Crie uma nova execução de extração que tenha um nome de ficheiro unívoco e reconhecível (por exemplo, "Ano-Mês-Dia-Extração01"), e depois adicione cuidadosamente os pedidos de extração à execução na ordem pela qual foram colocados no descartável e, em seguida, comece o processo de lise de 10 minutos.

Durante o processo de lise de 10 minutos, prepare a suspensão de sílica magnética para 8 amostras misturando **550 µL de NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**, **545 µL de água de grau de biologia molecular** e **5 µL de Internal Control de C. difficile**. Para cada amostra, use o pipetador BioHit ou um pipetador manual para distribuir 125 µL de suspensão de sílica magnética para a tira NucliSENS easyMAG Strip para pré-mistura. Utilize o pipetador BioHit para transferir 100 µL de suspensão de sílica magnética para cada amostra no recipiente de amostras descartável de 8 poços, misturando bem para cima e para baixo com uma pipeta e, em seguida, dê início ao procedimento de extração automatizado. Após a conclusão do processo, remova os ácidos nucleicos isolados do descartável de 30 minutos após a conclusão da extração para evitar a contaminação das amostras com a sílica magnética.

13.2 Substâncias interferentes

Não foi demonstrado que a presença de sangue humano, munica, gorduras fecais, medicamentos de venda livre e com receita médica interfiram na deteção de **C. difficile** toxigénico pelo **C. difficile ELITE MGB® Kit** usado em associação com **NucliSENS® easyMAG®**.

Table 38

Substâncias potencialmente interferentes	Princípio ativo	Interfere?
Antifúngico / antiprurítico vaginal	Nistatina	Não
Cremes / pomadas / supositórios	Hidrocortisona, 1%	Não
Cremes/pomadas anti-hemorroidas	Fenilefrina, 0,25%	Não
Antiácidos	Carbonato de cálcio	Não
Enema	Óleo mineral	Não
Lubrificante espermicida	Nonoxynol 9	Não
Medicamentos anti-diarreicos	Cloridrato de Loperamida	Não
Medicamentos anti-diarreicos	Subsalicilato de bismuto	Não
Laxantes	Senósidos	Não
Antibióticos (orais ou injetáveis)	Metronidazol (oral)	Não
	Ciprofloxacina (oral)	Não
	Azitromicina (oral)	Não
	Vancomicina (oral)	Não
	Zosyn (injetável)	Não
Anti-inflamatório não esteroide	Naproxeno de sódio	Não
Anti-inflamatório esteroide	Prednisona	Não
Toalhetes humedecidos	Cloreto de benzalcônio 0,40%	Não
Toalhetes humedecidos	Álcool isopropílico, 70%	Não
Gordura fecal (ácido palmítico)	Ácido palmítico	Não
Gordura fecal (ácido esteárico)	Ácido esteárico	Não
Sangue	Glicose, hormonas, enzimas, iões, ferro, etc.	Não
Muco	Imunoglobulinas, lisozimas, polímeros, etc	Não

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por outros fármacos antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossupressores.

Uma elevada quantidade de ADN genómico humano no ADN extraído da amostra pode inibir a reação de amplificação.

13.3 Controlos de amplificação

É obrigatório validar cada sessão de amplificação com uma reação de controlo negativo e uma reação de controlo positivo.

Para o Negative Control, utilize água de qualidade para biologia molecular (não fornecida).

Para o positive control, utilize «**C. difficile - ELiTe Positive Control**» ref. M800373 (não fornecido).

13.4 Controlos da qualidade

Recomenda-se a validação de todo o procedimento de análise de cada sessão de extração e amplificação, através do processamento de uma amostra que testou negativo e uma amostra que testou positivo ou um material de referência calibrado.

14 PROCEDIMENTO NOUTROS SISTEMAS

Definição da sessão de amplificação em tempo real

(Para realizar na área de amplificação/detecção de produtos de amplificação)

Antes de iniciar a sessão, siga as recomendações do fabricante fornecidas na documentação do instrumento e:

- ligue o computador, ligue o ciclo térmico em tempo real, execute o software dedicado, abra uma sessão de “quantificação absoluta”;
- quando for usado o instrumento Applied Biosystem® **7500 Fast Dx Real-Time PCR** ou o sistema Applied Biosystem® **7500 Fast Real-Time PCR**, selecione o “Run mode: Fast 7500”;
- quando for usado o Applied Biosystem® **7500 Real-Time PCR System** “Run mode: Standard 7500” (Modo de execução: standard 7500) é selecionado automaticamente;
- crie um novo “detector” (detetor) ou defina um detetor apropriado no menu Ferramentas, selecionando o Gestor de Detetores:
 - defina o “detector” (detetor) para a sonda do gene da toxina A com o “reporter” (reportador) = “VIC” (AP525 é semelhante ao VIC) e o “quencher” (inativador) = “none” (nenhum) (não fluorescente)” e dê-lhe o nome “Toxin A” (toxina A);
 - defina o “detector” (detetor) para a sonda do gene da toxina B com o “reporter” (reportador) = “FAM”, o “quencher” (inativador) = “none” (nenhum) (não fluorescente)” e dê-lhe o nome “Toxin B” (toxina B);
 - defina o “detetor” para a sonda de controlo interno com o “reportador” = “CY5” (AP642 é semelhante ao Cy5), o “inativador” = “nenhum” (não fluorescente) e designe-o de “IC”;
- vá ao menu “Ver”, selecione o inspetor de poços e, para cada poço em utilização na microplaca, defina (Inspetor de poços) o “detetor” (tipo de fluorescência a ser medida), a “referência passiva” = “ROX” (AP593 é semelhante ao ROX, normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, negative control da amplificação, positive control da amplificação). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho** anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

Consulte abaixo um exemplo da forma como a análise qualitativa das 12 amostras pode ser organizada.

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
NC	PC										

Legenda: S1 - S12: Amostras a serem analisadas; NC: negative control da amplificação; PC: positive control da amplificação.

Consultando a documentação do instrumento, defina no software dedicado (Instrumento > Protocolo de ciclo térmico > Perfil térmico) os parâmetros do **ciclo térmico**:

- adicione à etapa de amplificação (Adicionar passo) um **passo de extensão a 72 °C**,

NOTE

A aquisição de fluorescência (Instrumento > Protocolo do ciclo térmico > Definições > Recolha de dados) deve ser definida durante o passo de hibridização a 56 °C.

- modifique o tempo como indicado na tabela "**Ciclo térmico**" abaixo,
- defina o número de ciclos para **45**,
- defina o volume de reação para **30 µL**,
- opcional: adicione a fase de dissociação (Adicionar fase de dissociação) e defina a temperatura de 40 °C a 80 °C.

Table 39

Parâmetros da ciclagem térmica		
Fase	Temperaturas	Tempo
Descontaminação	50 °C	2 min.
Desnaturação inicial	93 °C	2 min.
Amplificação e detecção (45 ciclos)	93 °C	10 seg.
	56 °C (recolha de dados)	30 seg.
	72 °C	15 seg.
Dissociação (opcional)	95 °C	15 seg.
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 seg.
	60 °C	15 seg.

Preparação da amplificação

(A ser realizado na área de extração/preparação da reação de amplificação)

Antes de iniciar a sessão, é necessário:

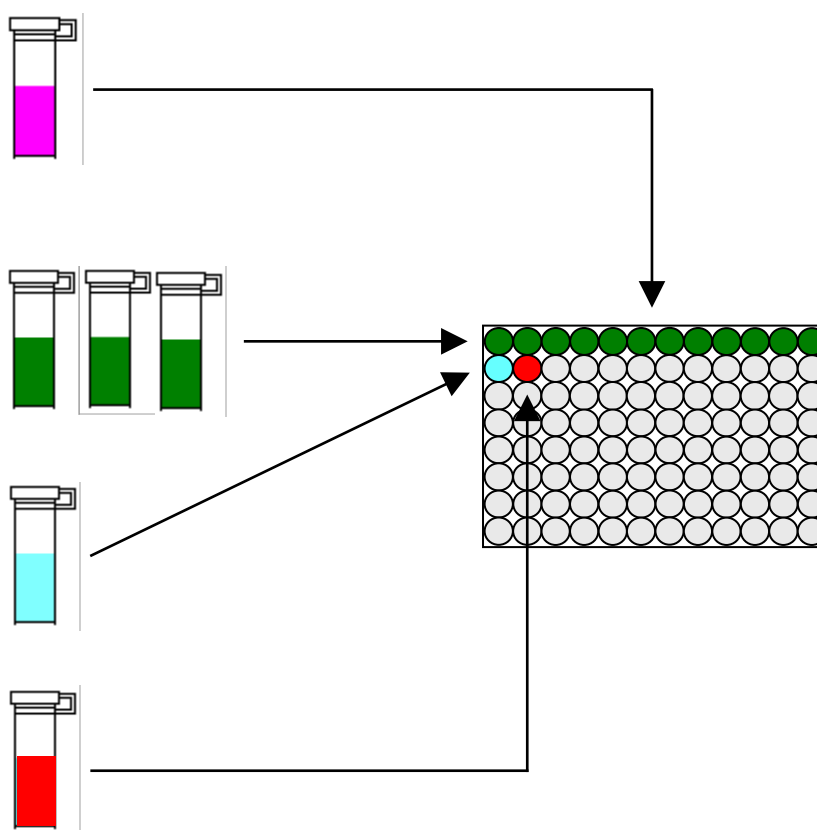
- descongele os tubos que contêm as amostras processadas a serem analisadas. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo,
 - descongele os tubos da **C. difficile PCR Mix** necessários para a sessão, sem esquecer que cada tubo é suficiente para a preparação de **25 reações**. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo durante um máximo de quatro horas,
 - descongele um tubo de **C. difficile Positive Control** (não fornecido). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo durante um máximo de quatro horas,
 - pegue na **microplaca da amplificação** que será usada durante a sessão, tendo cuidado para manusear a mesma com luvas sem pó e para não danificar os furos.
1. Distribua exatamente **20 µL** de **C. difficile PCR Mix** para o fundo dos poços da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Evite a criação de bolhas.

NOTE

Se não usar a totalidade da mistura de reação, guarde o volume restante num local escuro e a -20 °C durante um período máximo de um mês. Congele e descongele a mistura de reação um máximo de **cinco vezes**.

2. Adicione à mistura de reação **10 µL** da primeira amostra processada no poço designado, conforme anteriormente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Proceda da mesma forma para as outras amostras extraídas.
3. Adicione **10 µL** à mistura de reação de **água de qualidade para biologia molecular** (não fornecida) no poço de negative control, conforme anteriormente estabelecido na **Ficha de trabalho**.
4. Adicione à mistura de reação **10 µL** de **C. difficile Positive Control** no poço designado, conforme anteriormente estabelecido na **Ficha de trabalho**.
5. Vede com precisão a **microplaca da amplificação** com recurso à **folha adesiva da amplificação**.
6. Se estiver disponível uma centrífuga com adaptador de placa, rode a **microplaca de amplificação** para retirar a mistura de reação situada no fundo dos poços.
7. Transfira a **microplaca da amplificação** para o termociclador em tempo real na área de amplificação/detecção de produtos de amplificação e inicie o ciclo térmico para a amplificação. Guarde a configuração da sessão com um nome de ficheiro unívoco e reconhecível (por exemplo, "ano-mês-dia-C.difficile -EGSpA").

A figura seguinte ilustra a preparação da reação de amplificação.



1. Adicione 20 µL de PCR Mix a cada poço
2. Adicione 10 µL de ADN extraído
3. Adicione 10 µL de Negative Control
4. Adicione 10 µL de Positive Control

NOTE

se a preparação da reação de amplificação for realizada com o instrumento **ELiTe GALAXY**, carregue a microplaca de eluição, a mistura de Q-PCR e a microplaca de amplificação tal como indicado no manual do utilizador do instrumento e seguindo os passos exigidos pela GUI.

NOTE

No final do ciclo térmico, a **microplaca da amplificação** com os produtos de reação devem ser removidos do instrumento e descartados sem produzir contaminações ambientais. Para evitar derramar os produtos de reação, a **folha adesiva ótica de selagem não deve ser removida da microplaca da amplificação**.

Análise qualitativa dos resultados

Os valores registados da fluorescência emitida durante as reações de amplificação pela sonda do gene da toxina A (detetor VIC "Toxin A" (Toxina A), pela sonda do gene da toxina B (detetor FAM "Toxin B" (Toxina B)) e pela sonda do controlo interno (detetor CY5 "IC") a serem analisados pelo software do instrumento.

Antes de iniciar a análise, siga as recomendações do fabricante fornecidas na documentação do instrumento e:

- defina (Resultados > Traçado de amplificação > delta Rn vs. Ciclo) as **Definições da análise** para todos os detetores para **Base de referência automática** e **Ct manual**, com o **Limiar** definido para **0,05**. Prima o botão **Analisar** e **guarde** os resultados.

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas específicas na reação de amplificação e o valor do **Limiar** de fluorescência permitem determinar o **Ciclo do limiar (Ct)**. A Ct é o ciclo quando a fluorescência atinge o valor do **Limiar** e é proporcional à quantidade do alvo inicial.

Na reação de amplificação do **Positive Control**, os valores de **Ct** dos detetores da Toxina A e Toxina B (Resultados □ Relatório) são usados para validar a amplificação e a deteção, como descrito na tabela seguinte:

Table 40

Detetor de reação de positive control VIC "Toxin A" (Toxina A)	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct < 35	POSITIVO	CORRETO

Table 41

Detetor de reação de positive control FAM "Toxin B" (Toxina B)	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct < 35	POSITIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação dos Positive Control for Ct ≥ 35 ou Ct indeterminada para os detetores de Toxina A ou Toxina B, o ADN do alvo não foi corretamente detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou do positive control, degradação da mistura de reação ou do positive control, definição incorreta da posição do positive control, definição incorreta do ciclo térmico) que podem originar resultados incorretos. A execução inteira é inválida e precisa de ser repetida a partir do passo de amplificação.

Na reação de amplificação de **Negative Control**, os valores de Ct da Toxina A, Toxina B e dos detetores CI (Resultados □ Relatório) são usados para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Table 42

Detetor de reação de negative control VIC "Toxin A" (Toxina A)	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
CT indeterminada ou Ct ≥ 40	NEGATIVO	CORRETO

Table 43

Detetor de reação de negative control FAM "Toxin B" (Toxina B)	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
CT indeterminada ou Ct ≥ 40	NEGATIVO	CORRETO

Table 44

Detetor de reação de Negative Control Cy5 "IC"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
CT indeterminada ou Ct ≥ 34	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da amplificação do **Negative Control** for **Ct < 40**, para detetores da Toxina A ou da Toxina B e **Ct < 34** para o detetor de CI, o ADN do alvo foi incorretamente detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação (contaminação), que podem originar resultados falsos positivos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Em cada reação de amplificação da **amostra**, os valores da **Ct** dos detetores de Toxina A ou de Toxina B são usados para determinar o ADN do alvo, enquanto o valor de **Ct** do Controlo Interno é usado para validar a extração, amplificação e deteção.

NOTE

Verifique com o software do instrumento (Resultados à Lote de amplificação à delta Rn vs Ciclo) que o **Ct** foi determinado por um aumento súbito e regular da fluorescência e não por picos ou um aumento do fundo (fundo irregular ou alto).

Os valores da **Ct** das reações de amplificação de cada **amostra** (Resultados à Relatório) são usados como descrito na tabela seguinte:

Table 45

Reação da amostra			Resultado do ensaio
Detetor VIC "Toxin A" (Toxina A)	Detetor FAM "Toxin B" (Toxina B)	Detetor Cy5 "IC"	
Indeterminado ou Ct ≥ 40	Indeterminado ou Ct ≥ 40	Ct < 34	Negativo
		Indeterminado ou Ct ≥ 34	Inválido
Determinado, Ct ≤ 40	Indeterminado ou Ct ≥ 40	Não aplicável	Positivo
Indeterminado ou Ct ≥ 40	Determinado, Ct ≤ 40	Não aplicável	Positivo
Determinado, Ct ≤ 40	Determinado, Ct ≤ 40	Não aplicável	Positivo

Table 46

Resultado do ensaio	Interpretação do resultado
Negativo	Não foi detetado ADN do gene da toxina A ou do gene da toxina B de C. difficile na amostra. A amostra é negativa para <i>C. difficile</i> toxigénico ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
Inválido	Resultado do ensaio inválido. Repita a execução da extração da mesma amostra ou realize uma nova extração a partir de uma nova amostra.
Positivo	Foi detetado ADN do gene da toxina A ou do gene da toxina B de C. difficile na amostra. A amostra é positiva para <i>C. difficile</i> e pode ser toxigénica .

A presença de ambos os marcadores (gene da Toxina A ou gene da toxina B) ou de ambos os marcadores é indicativa de *C. difficile* toxigénico.

Se o resultado da reação de amplificação da amostra for **Ct indeterminado** ou **Ct $\geq$ 40** para os detetores da Toxina A e Toxina B e **Ct indeterminado** ou **Ct $\geq$ 34** para o detetor CI, isto significa que foi impossível detetar eficientemente os alvos e o ADN do controlo interno. Neste caso, ocorreram problemas durante o passo de amplificação (amplificação ineficiente ou inexistente) ou durante o passo de extração (degradação do ADN, perda de ADN durante a extração ou a transferência de inibidores no ADN extraído) que podem originar resultados incorretos e falsos negativos. Neste caso, a amostra não é adequada, a execução é inválida e precisa de ser repetida, começando pela extração da amostra ou de uma nova amostra do mesmo paciente.

Se o resultado da amplificação da amostra for **Ct indeterminado** ou **Ct $\geq$ 40** para os detetores de Toxina A ou Toxina B e **Ct $<$ 34** para o detetor CI, isto significa que o ADN de *C. difficile* não foi detetado na amostra processada. Presume-se que a amostra seja negativa. No entanto, o número de organismos na amostra está abaixo do limite de deteção do produto (consulte Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

NOTE

Quando é detetado ADN da Toxina A e/ou da Toxina B numa amostra, o detetor CI pode ser **Ct indeterminado** ou **Ct $\geq$ 34**. Com efeito, a elevada eficiência da amplificação de ADN do gene da toxina A e da toxina B pode competir com a baixa eficiência da amplificação do controlo interno. Neste caso, a amostra é adequada e o resultado positivo do ensaio é válido.

15 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM OUTROS SISTEMAS

15.1 Desempenhos clínicos

As características de desempenho do **C. difficile ELITE MGB Kit** usado em associação com amostras de fezes e o sistema **ELITE STAR** foram determinadas pela análise de um painel de amostras clínicas previamente testadas com o teste de cultura de citotoxicidade de *C. difficile* como método de referência. Foram testadas 82 amostras fecais, 30 positivas e 52 negativas. Cada amostra foi usada para a realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Table 47

C. difficile ELITE MGB Kit	Método de referência		
	Tx <i>C. difficile</i> Positivo	Tx <i>C. difficile</i> Negativo	Total
<i>C. difficile</i> toxigénico positivo	29	4	33
<i>C. difficile</i> toxigénico negativo	1	48	49
Total da amostra válido para análise	30	52	82
Sensibilidade de diagnóstico (percentagem de concordância positiva)	97%	-	
Especificidade de diagnóstico (percentagem de concordância negativa)	-	92%	

Em comparação com o método de referência, o **C. difficile ELITE MGB Kit** identificou 97% de amostras positivas para *C. difficile* toxigénico e 92% de amostras negativas. O ensaio não confirmou amostra positiva que apresentou resultado positivo no teste de cultura. O ensaio identificou 4 amostras positivas que foram negativas no teste de cultura. A análise da curva de dissociação confirmou que 4 amostras são positivos verdadeiros para *C. difficile* toxigénico.

A resolução de resultados discrepantes foi realizada por um teste molecular independente (sistema Xpert® C. difficile, Cepheid). O resultado final é comunicado na tabela seguinte.

Table 48

C. difficile ELITE MGB Kit	Métodos de referência		
	Tx C. difficile Positivo	Tx C. difficile Negativo	Total
C. difficile toxigénico positivo	33	0	33
C. difficile toxigénico negativo	0	49	49
Total da amostra válido para análise	33	49	82
Sensibilidade de diagnóstico (percentagem de concordância positiva)	100%	-	
Especificidade de diagnóstico (percentagem de concordância negativa)	-	100%	

As características de desempenho do **C. difficile ELITE MGB Kit** usado em associação com amostras de fezes e o sistema **ELITE GALAXY** foram determinadas pela análise de um painel de amostras clínicas previamente testadas com o teste de cultura de citotoxicidade como método de referência. Foram testadas 82 amostras fecais de *C. difficile*, 30 positivas e 52 negativas. Cada amostra foi usada para a realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Table 49

C. difficile ELITE MGB Kit	Método de referência		
	Tx C. difficile Positivo	Tx C. difficile Negativo	Total
C. difficile toxigénico positivo	28	4	32
C. difficile toxigénico negativo	2	48	50
Total da amostra válido para análise	30	52	82
Sensibilidade de diagnóstico (percentagem de concordância positiva)	93%	-	
Especificidade de diagnóstico (percentagem de concordância negativa)	-	92%	

Em comparação com o método de referência, o **C. difficile ELITE MGB Kit** identificou 93% de amostras positivas para *C. difficile* toxigénico e 92% de amostras negativas. O ensaio não confirmou 2 amostras positivas que apresentou resultado positivo no teste de cultura. O ensaio identificou 4 amostras positivas que foram negativas no teste de cultura. A análise da curva de dissociação confirmou que 4 amostras são positivos verdadeiros para *C. difficile* toxigénico.

A resolução de resultados discrepantes foi realizada por um teste molecular independente (sistema Xpert® C. difficile, Cepheid). Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Table 50

C. difficile ELITE MGB Kit	Métodos de referência		
	Tx C. difficile Positivo	Tx C. difficile Negativo	Total
C. difficile toxigénico positivo	32	0	32
C. difficile toxigénico negativo	1	49	50
Total da amostra válido para análise	33	49	82

Table 50 (continued)

C. difficile ELITE MGB Kit	Métodos de referência		
	Tx C. difficile Positivo	Tx C. difficile Negativo	Total
Sensibilidade de diagnóstico (percentagem de concordância positiva)	100%	-	
Especificidade de diagnóstico (percentagem de concordância negativa)	-	100%	

As características de desempenho do **C. difficile ELITE MGB Kit** foram determinadas por um estudo de investigação prospetiva comparando os resultados obtidos com o **C. difficile ELITE MGB Kit** utilizado em associação com NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux) e o instrumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR (Applied Biosystems) com um teste de cultura de citotoxicidade como método de referência.

Um total de 100 amostras fecais positivas e negativas de *C. difficile*, que foram avaliadas pelo teste de cultura, foram então testadas com o **C. difficile ELITE MGB Kit**. Em comparação com o método de referência, o **C. difficile ELITE MGB Kit** identificou 100% de amostras positivas para *C. difficile* toxigénico e 86% de amostras negativas.

Table 51

C. difficile ELITE MGB Kit	Método de referência		
	Tx C. difficile Positivo	Tx C. difficile Negativo	Total
<i>C. difficile</i> toxigénico positivo	50	7	57
<i>C. difficile</i> toxigénico negativo	0	43	43
Total da amostra válido para análise	50	50	100
Sensibilidade de diagnóstico (percentagem de concordância positiva)	100%	-	
Especificidade de diagnóstico (percentagem de concordância negativa)	-	86%	

Em comparação com o método de referência, o **C. difficile ELITE MGB Kit** identificou 100% de amostras positivas para *C. difficile* toxigénico e 86% de amostras negativas. O ensaio identificou 7 amostras positivas que foram negativas no teste de cultura.

Os testes de análise discrepantes foram realizados por PCR utilizando primers específicos para o gene da toxina B, mas não relacionados com os do **C. difficile ELITE MGB Kit**. Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Table 52

C. difficile ELITE MGB Kit	Métodos de referência		
	Tx C. difficile Positivo	Tx C. difficile Negativo	Total
<i>C. difficile</i> toxigénico positivo	50	5	55
<i>C. difficile</i> toxigénico negativo	0	45	45
Total da amostra válido para análise	50	50	100
Sensibilidade de diagnóstico (percentagem de concordância positiva)	100%	-	
Especificidade de diagnóstico (percentagem de concordância negativa)	-	90%	

15.2 Desempenhos não clínicos

15.2.1 Limite de detecção

O LdD do **C. difficile ELITE MGB Kit** foi calculado pela análise estatística de regressão de Probit. O LdD para cada estirpe foi calculado como concentração à qual a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

O LdD do **C. difficile ELITE MGB Kit** usado em associação com amostras de fezes clarificadas e o sistema **ELITE STAR** foi determinado usando duas estirpes de *C. difficile* toxigénico.

Os materiais de referência contendo *C. difficile* 027 ou *C. difficile* 017 (Qnostics Ltd, Reino Unido) foram diluídos em fezes clarificadas negativas. Foram testadas diluições múltiplas num intervalo de 1000 CFU/mL a 1 CFU/mL, realizando todo o procedimento de análise, extração e amplificação, pelos produtos ELITechGroup S.p.A.

Os valores do LdD como CFU/mL são indicados abaixo.

Table 53 Limite de detecção para amostras de fezes clarificadas e o sistema ELITE STAR

Estirpe	CFU / mL
C. difficile 027, toxina A+B+, toxinotipo III	187
C. difficile 017, toxina A-B+, toxinotipo VIII	278

O LdD do **C. difficile ELITE MGB Kit** usado em associação com amostras de fezes clarificadas e o sistema **ELITE GALAXY** foi determinado usando duas estirpes de *C. difficile* toxigénico.

Os materiais de referência contendo *C. difficile* 027 ou *C. difficile* 017 (Qnostics Ltd, Reino Unido) foram diluídos em fezes clarificadas negativas. Foram testadas diluições múltiplas num intervalo de 178 CFU/mL a 1,78 CFU/mL, realizando todo o procedimento de análise, extração, configuração de PCR e amplificação, pelos produtos ELITechGroup S.p.A.

O LdD como valores de CFU/mL é indicado abaixo.

Table 54 Limite de detecção para amostras de fezes clarificadas e o sistema ELITE GALAXY

Estirpe	CFU / mL
C. difficile 027, toxina A+B+, toxinotipo III	88
C. difficile 017, toxina A-B+, toxinotipo VIII	84

O LdD do **C. difficile ELITE MGB Kit** usado em associação com amostras de fezes clarificadas e o sistema **NucliSENS® easyMAG®** foi determinado usando duas estirpes de *C. difficile* toxigénico.

Culturas frescas da estirpe VPI 10463 de *C. difficile* e da estirpe 4118 foram quantificadas e diluídas em fezes clarificadas negativas. Múltiplas diluições foram testadas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos BioMérieux e ELITechGroup S.p.A..

Após a determinação, o LdD para cada estirpe foi então verificado testando 20 réplicas à concentração declarada. O LdD como valores de CFU/mL é indicado abaixo.

Table 55 Limite de detecção para amostras de fezes clarificadas e o sistema NucliSENS® easyMAG®

Estirpe	CFU / mL
ATCC 43255, estirpe VPI 10463, toxinotipo 0	1,121
ATCC BAA-1870, estirpe 4118, toxinotipo III	3,750

15.2.2 Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência calibrado

A reprodutibilidade dos resultados do ensaio comparada com os resultados obtidos com recurso a outros ensaios em diferentes laboratórios, foi verificada testando um painel de proficiência.

Foi realizado um teste usando como material de referência o painel QCMD 2012 *C. difficile* DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada amostra foi testada através da realização da extração com o sistema ELITE STAR e a amplificação usando produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Table 56 Testes com painel de proficiência e sistema ELITE STAR

Amostra	tipo	CFU / mL	Resultado
CD12-01	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁴	POS
CD12-02	<i>C. sordellii</i>	-	NEG
CD12-03	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ³	POS
CD12-04	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	POS
CD12-05	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	POS
CD12-06	Negativo	-	NEG
CD12-07	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁶	POS
CD12-08	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁶	POS
CD12-09	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁴	POS
CD12-10	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁵	POS

Todas as amostras foram detetadas corretamente

Foi realizado um teste adicional usando como material de referência o painel QCMD 2012 *C. difficile* DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada amostra foi testada através da realização da extração e configuração do PCR com o **sistema ELITE GALAXY** e a amplificação usando produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 57 Testes com painel de proficiência e sistema ELITE GALAXY

Amostra	tipo	CFU / mL	Resultado
CD12-01	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁴	POS
CD12-02	<i>C. sordellii</i>	-	NEG
CD12-03	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ³	POS
CD12-04	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	POS
CD12-05	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	POS
CD12-06	Negativo	-	NEG
CD12-07	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁶	POS
CD12-08	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁶	POS
CD12-09	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁴	POS
CD12-10	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁵	POS

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

Foi realizado o último teste usando como material de referência o painel QCMD 2013 C. difficile DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada amostra foi testada através da realização da extração pelo NucliSENS® easyMAG® e a amplificação usando produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 58 Testes com materiais de referência calibrados e NucliSENS® easyMAG®

Amostra	tipo	CFU/mL	Pos./ Rep.	Resultado
CD13-01	C. difficile 027	4,6 x 10 ⁵	2/2	POS
CD13-02	C. difficile 017	8 x 10 ⁶	2/2	POS
CD13-03	Negativo	-	0/2	NEG
CD13-04	C. difficile 027	4,6 x 10 ⁴	2/2	POS
CD13-05	C. difficile 027	4,6 x 10 ⁶	2/2	POS
CD13-06	C. difficile 017	8 x 10 ⁵	2/2	POS
CD13-07	C. difficile 027	4,6 x 10 ³	2/2	POS
CD13-08	C. sordellii	2,1 x 10 ⁵	0/2	NEG
CD13-09	C. difficile 027	4,6 x 10 ⁵	2/2	POS
CD13-10	C. difficile 017	8 x 10 ⁴	2/2	POS

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

15.2.3 Eficiência de detecção do genótipo (inclusividade)

Os desempenhos do **C. difficile ELITE MGB Kit** identificaram corretamente 30 isolados de C. difficile toxigénico representativos da diversidade genética global, incluindo sete toxinótipos diferentes (0, III, V, VIII, X, XII e XXII), e treze ribótipos PCR diferentes (001, 002, 010, 012, 014, 017, 020, 027, 036, 056, 087, 110 e 154). Todas as estirpes foram obtidas e quantificadas pela ATCC, US, à exceção da estirpe C. difficile CCUG 8864 (toxinótipo X, A-/B+, gentilmente cedida pela Thermo-Fisher Diagnostics). Todas as estirpes testadas foram adicionadas às fezes clarificadas negativas perto do limite de detecção e testadas com **C. difficile ELITE MGB Kit** em associação com o sistema NucliSENS® easyMAG®. Todas as estirpes testadas foram positivas.

Table 59

ATCC	Estirpe	Isolado	Toxina A / B	Tipo de toxina	Ribotipo PCR
9689	90556-M6S	(estirpe tipo)	A+B+	0	001
17857	870, N4	Desconhecido	A+B+	0	001
43255	VPI 10463	Ferida abdominal	A+B+	0	087
43594	W1194	Fezes humanas, Bélgica	A+B+	0	005
43596	545	Fezes humanas, Bélgica	A+B+	0	012
43597	Desconhecido	Fezes humanas, Bélgica	A+B+	0	014
43598	1470 (F)	Fezes humanas, Bélgica	A-B+	VIII	017
43599	2022	Fezes humanas, Bélgica	A+B+	0	001
43600	2149	Fezes humanas, Bélgica	A+B+	0	014

Table 59 (continued)

ATCC	Estirpe	Isolado	Toxina A / B	Tipo de toxina	Ribotipo PCR
51695	BDMS 18 AN	Desconhecido	A+B+	0	001
700792	14797-2	Michigan, fezes de mulher, 1977	A+B+	0	005
BAA-1382	630	Isolado clínico, Suíça, 1982	A+B+	0	012
BAA-1803	Desconhecido	Isolado clínico Quest	A+B+	IIIc	027
BAA-1804	Desconhecido	Isolado clínico Quest	A+B+	0	053
BAA-1805	Desconhecido	Isolado clínico Quest	A+B+	IIIb	027
BAA-1806	Desconhecido	Isolado clínico Quest	A+B+	0	220
BAA-1808	Desconhecido	Isolado clínico Quest	A+B+	0	020
BAA-1811	Desconhecido	Isolado clínico Quest	A+B+	0	057
BAA-1812	Desconhecido	Isolado clínico Quest	A+B+	XII	024
BAA-1813	Desconhecido	Isolado clínico Quest	A+B+	0	002
BAA-1814	Desconhecido	Isolado clínico Quest	A+B+	XXII	251
BAA-1870	4118	Humanas, Maine, 2004 (estirpe hipervirulenta NAP1/BI/027)	A+B+	IIIb	027
BAA-1871	4111	Humanas, Nova Jérsei	A+B+	0	001
BAA-1872	4206	Humanas, Maine	A+B+	0	207
BAA-1873	5283	Humanas, Nova Iorque	A+B+	0	053
BAA-1874	4205	Humanas, Oregon	A+B+	0	002
BAA-1875	5325	Humanas, Geórgia	A+B+	V	078
BAA-2155	LBM 0801058	Fezes humanas, Albuquerque, NM, EUA	A+B+	XXII	251
BAA-2156	LBM 0801040	Fezes humanas, Cambridge, Reino Unido 2007	A+B+	0	118
-	CCUG 8864	Prof. M. Delmee, C. U. Louvain, Bruxelas	A-B+	X	036

15.2.4 Reatividade cruzada e interferência

A especificidade analítica do **C. difficile ELITE MGB Kit** foi avaliada quanto à reatividade cruzada através do teste de *C. difficile* não toxigénico, espécie filogeneticamente relacionada com *C. difficile*, e outros microrganismos patogénicos, normalmente presentes na microflora gastrointestinal normal. As espécies testadas foram microrganismos bacterianos e fungos (testados em concentrações de 1×10^6 CFU quando possível), parasitas virais e intracelulares (testados em concentrações de 1×10^5 PFU ou IFU). Também foi testado o ADN genómico humano (em 1×10^6 células). Todos os organismos (130) testados, utilizando o **C. difficile ELITE MGB Kit** em associação com o sistema NucliSENS® easyMAG® não resultaram em reatividade cruzada, à exceção de *Clostridium nexile*, que produziu reação cruzada com a reação de amplificação do gene da toxina B.

C. nexile foi observado em aproximadamente 3% das amostras clínicas testadas. *C. nexile* não expressa a Toxina B, mas há homologia de sequência suficiente para produzir um sinal no ensaio. A especificidade analítica geral foi de 99% (129/130).

A especificidade analítica do **C. difficile ELiTe MGB Kit** também foi avaliada quanto à interferência microbiana, testando as mesmas espécies usadas para reatividade cruzada. Os microrganismos foram testados como descrito acima em testes de reatividade cruzada, mas também reforçados individualmente com cada uma das duas diferentes estirpes de *C. difficile* toxigénico (ATCC 43255, estirpe VPI 10463, Toxinotipo 0 ou ATCC BAA-1870, estirpe 4118, Toxinotipo III) perto do limite de deteção. Todos os organismos testados utilizando o **C. difficile ELiTe MGB Kit** em associação com o sistema NucliSENS® easyMAG® não resultaram em interferência microbiana.

Table 60

Géneros e espécies	Ref.	Fornecedor	Quantidade	Interfere?
<i>Abiotrophia defectiva</i>	49176	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	15309	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Aeromonas hydrophila</i>	7966	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Alcaligenes faecalis subsp. faecalis</i>	15554	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Anaerococcus tetradius</i>	35098	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Bacillus cereus</i>	13472	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Bacteroides caccae</i>	43185	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Bacteroides merdae</i>	43184	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Bacteroides stercoris</i>	43183	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	15703	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Bifidobacterium longum</i>	15707	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Campylobacter coli</i>	BAA-370	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i>	33292	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Candida albicans</i>	10231	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Cedecea davisae</i>	33431	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Chlamydia trachomatis</i>	8017775	Zeptomatrix	1×10 ⁵	Não
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	25405	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Citrobacter freundii</i>	8090	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Citrobacter koseri</i>	27028	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Citrobacter sedlakii</i>	51115	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium beijerinckii</i>	8260	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium bifermentans</i>	638	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium bolteae</i>	BAA-613	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium butyricum</i>	19398	ATCC	1,5×10 ⁵	Não
<i>Clostridium chauvoei</i>	11957	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium difficile</i> (atoxigénica)	43593	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium difficile</i> (atoxigénica)	43601	ATCC	1×10 ⁶	Não

Table 60 (continued)

Gêneros e espécies	Ref.	Fornecedor	Quantidade	Interfere?
<i>Clostridium difficile</i> (atoxigénica)	43602	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium difficile</i> (atoxigénica)	43603	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium difficile</i> (atoxigénica)	700057	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium difficile</i> (atoxigénica)	BAA-1801	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium difficile</i> (atoxigénica)	BAA-1807	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium difficile</i> (atoxigénica)	BAA-1809	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium difficile</i> (atoxigénica)	BAA-1810	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium difficile</i> toxinotipo Xla, A-/B-	R11402	Thermo-Fisher Diagnostics	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium difficile</i> toxinotipo Xlb, A-/B-	IS58	Thermo-Fisher Diagnostics	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium fallax</i>	19400	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium haemolyticum</i>	9650	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium histolyticum</i>	19401	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium innocuum</i>	14501	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium methylpentosum</i>	43829	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium nexile</i>	27757	ATCC	1×10 ⁶	Sim
<i>Clostridium novyi</i>	19402	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium paraputrificum</i>	25780	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium perfringens</i>	13124	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium ramosum</i>	25582	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium scindens</i>	35704	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium septicum</i>	12464	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium sordellii</i>	9714	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium sphenoides</i>	19403	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium spiroforme</i>	29899	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium sporogenes</i>	15579	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium symbiosum</i>	14940	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium tertium</i>	14573	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Clostridium tetani</i>	19406	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Collinsella aerofaciens</i>	25986	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Corynebacterium genitalium</i>	33798	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Desulfovibrio piger</i>	29098	ATCC	1×10 ⁶	Não

Table 60 (continued)

Géneros e espécies	Ref.	Fornecedor	Quantidade	Interfere?
<i>Edwardsiella tarda</i>	15947	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Eggerthella lenta</i>	25559	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Enterobacter aerogenes</i>	51697	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Enterococcus casseliflavus</i> (vanC2)	25788	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Enterococcus cecorum</i>	43198	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Enterococcus dispar</i>	51266	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Enterococcus faecalis</i> (vanB)	51299	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Enterococcus faecium</i> (vanA)	700221	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Enterococcus gallinarum</i> (vanC)	700425	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Enterococcus hirae</i>	10541	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Enterococcus raffinosus</i>	49427	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Escherichia coli</i>	35218	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Escherichia fergusonii</i>	35469	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Escherichia hermannii</i>	33650	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Flavonifractor plautii</i>	49531	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Fusobacterium varium</i>	8501	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Gardnerella vaginalis</i>	14019	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Hafnia alvei</i>	13337	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Helicobacter fennelliae</i>	35683	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Helicobacter pylori</i>	43504	ATCC	1×10 ⁶	Não
Homo sapiens, células humanas	-	Instituto de Investigação do Hospital Infantil de Seattle	1×10 ⁶	Não
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8724	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	13883	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Lactobacillus reuteri</i>	23272	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Lactococcus lactis</i>	11454	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Leminorela grimontii</i>	33999	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Listeria grayi</i>	19120	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Listeria innocua</i>	33090	ATCC	1×10 ⁶	Não

Table 60 (continued)

Gêneros e espécies	Ref.	Fornecedor	Quantidade	Interfere?
<i>Listeria monocytogenes</i>	13932	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	27337	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	14029	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	25260	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Proteus penneri</i>	35198	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Providencia alcalifaciens</i>	9886	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Providencia rettgeri</i>	9250	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Providencia stuartii</i>	33672	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Ruminococcus bromii</i>	27255	ATCC	1,75×10 ⁵	Não
<i>Salmonella choleraesuis</i> (typhimurium)	14028	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Salmonella enterica</i> subsp. Arizonae	13314	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Salmonella enterica</i> subsp. Enterica	700720	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Serratia liquefaciens</i>	27592	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Serratia marcescens</i>	274	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Shigella boydii</i>	9207	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Shigella dysenteriae</i>	11835	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Shigella sonnei</i>	25931	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Staphylococcus aureus</i>	BAA-1556	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	13637	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12973	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	43078	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Streptococcus uberis</i>	19436	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Trabulsiella guamensis</i>	49490	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Veillonella parvula</i>	10790	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Vibrio cholerae</i>	25870	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17802	ATCC	1×10 ⁶	Não
<i>Yersinia bercovieri</i>	43970	ATCC	1×10 ⁶	Não

Table 60 (continued)

Gêneros e espécies	Ref.	Fornecedor	Quantidade	Interfere?
<i>Yersinia rohdei</i>	43380	ATCC	1×10 ⁶	Não
Adenovírus	VR-1516	ATCC	1×10 ⁵	Não
Coxsackievirus	VR-28	ATCC	1×10 ⁵	Não
Citomegalovírus	VR-1590	ATCC	1×10 ⁵	Não
Echovírus	VR-41	ATCC	1×10 ⁵	Não
Enterovírus	VR-836	ATCC	1×10 ⁵	Não
Norovírus tipo I	0810086CF	ZeptoMetrix	1×10 ⁵	Não
Rotavirus	VR-2018	ATCC	1×10 ⁵	Não

15.2.5 Reprodutibilidade

Um painel de 7 membros composto por uma amostra de fezes clarificadas negativas e concentrações variáveis de duas estirpes toxigênicas de *C. difficile* (ATCC 43255 e BAA-1870) foi testado em três repetições por dois operadores. Para cada estirpe de *C. difficile*, o painel incluiu uma amostra abaixo do LdD (espera-se que produza uma taxa de positividade entre 20 e 80%), pouco positiva (no LdD, espera-se que produza uma taxa de positividade de 95%) e uma positiva moderada (três vezes o LdD, espera-se que tenha uma taxa de positividade de 100%). Cada um dos dois operadores efectuou um ensaio por dia durante 12 dias com três lotes de reagentes num local (7 amostras × 3 réplicas × 12 dias × 2 ensaios). Cada amostra foi testada através da extração pelo sistema NucliSENS® easyMAG® e da amplificação pelos produtos ELITechGroup S.p.A.

O membro negativo do painel apresentou resultados 100% negativos, a taxa de positividade abaixo de amostras do LdD foi de 78%, a taxa de positividade de amostras positivas baixas foi de 98% e a taxa de positividade positiva dos membros do painel positivos moderados foi de 100%.

Table 61 Reprodutibilidade no dia-a-dia

Tipo de amostra	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Total % concordância
Negativo	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	72 / 72 (100%)
Abaixo do LdD	6 / 12	12 / 12	8 / 12	10 / 12	7 / 12	7 / 12	11 / 12	10 / 12	12 / 12	9 / 12	11 / 12	10 / 12	113 / 144 (78%)
Positivo baixo	10 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	11 / 12	12 / 12	12 / 12	141 / 144 (98%)
Positivo moderado	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	144 / 144 (100%)

Table 62 Reprodutibilidade entre lotes

Tipo de amostra	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Total % concordância
Negativo	30 / 30	27 / 27	15 / 15	72 / 72 (100%)
Abaixo do LdD	50 / 60	38 / 54	25 / 30	113 / 144 (78%)
Positivo baixo	57 / 60	54 / 54	30 / 30	141 / 144 (98%)
Positivo moderado	60 / 60	54 / 54	30 / 30	144 / 144 (100%)

15.2.6 Transferência / contaminação cruzada

Foi realizado um estudo analítico para avaliar o potencial de contaminação cruzada entre amostras de *C. difficile* (5×10^8 CFU/mL) altas e amostras negativas em todo o **C. difficile ELITe MGB® Kit** usado em associação com NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux) e o instrumento 7500 Fast Dx Real-Time (Applied Biosystems). Dois operadores realizaram cinco execuções de extração de 24 amostras (11 amostras de título alto de *C. difficile*, 11 amostras negativas, 1 amostra de positive control e 1 amostra de negative control por execução) numa padrão quadriculado (amostras de *C. difficile* alto interrompidas por amostras completamente negativas). As amostras processadas foram então amplificadas em cinco execuções separadas usando dois padrões quadriculados diferentes. O teste de contaminação cruzada não resultou em resultados falsos positivos entre 55 amostras negativas para *C. difficile*.

NOTE

Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto estão registados na Secção 7 do Ficheiro técnico do produto "C. difficile ELITe MGB® Kit", FTP M800358.

16 REFERÊNCIAS

Cloud J. and Kelly C. P. (2007) Cur. Opin. Gastroenterology 23: 4 - 9.

Cohen, S. H. et al. (1998) Clin. Infect. Diseases 26: 410 - 412.

Kuijper, E. J. et al. (2006) Clin. Microb. and Infection 12: 2 - 18.

Article about LoB and LoD statistics: K. Linnet and M. Kondratovich (2004) Clin. Chem. 50: 732 - 740.

CLSI EP37, Ed1E: "Supplemental Tables for interference Testing in Clinical Chemistry"

17 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto apenas com as seguintes amostras clínicas: amostras de fezes humanas não formadas ou líquidas.

Os resultados obtidos com este produto dependem da identificação, colheita, transporte, armazenamento e processamento corretos das amostras. Para evitar resultados incorretos, é por isso necessário ter cuidado durante estes passos e seguir cuidadosamente as instruções de utilização fornecidas com o produto.

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de PCR em tempo real usado neste produto é sensível a contaminação a partir de amostras clínicas positivas, dos controlos positivos e dos produtos de PCR. A contaminação cruzada causa resultados falsos positivos. O formato do produto foi concebido para limitar a contaminação cruzada. No entanto, as contaminações cruzadas podem ser evitadas simplesmente através de boas práticas laboratoriais e do cumprimento destas instruções de utilização.

Este produto deve ser manuseado por pessoal qualificado e com formação no processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de equipamento de proteção individual que seja adequado para o processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de equipamento de proteção individual e instrumentos específicos para preparação da sessão de trabalho, para evitar falsos resultados positivos.

Para evitar resultados incorretos, este produto deve ser manuseado por profissionais, qualificado e com formação em técnicas de biologia molecular, como extração, PCR e deteção de ácidos nucleicos

É necessário ter áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação para evitar falsos resultados positivos.

Este produto requer o uso de vestuário e instrumentos especiais para extração/preparação de reações de amplificação e para amplificação/deteção de produtos de amplificação, para evitar falsos resultados positivos.

Devido a diferenças inerentes entre tecnologias, é recomendado que os utilizadores realizem estudos de correlação do método para calcular diferenças tecnológicas antes de mudar para uma nova tecnologia.

Um resultado obtido com este produto não indica a presença de *C. difficile* viável mas é indicativo da presença de *C. difficile* toxigénico. Por conseguinte, um resultado positivo não indica necessariamente a falha da erradicação da intervenção, uma vez que pode persistir ADN inviável.

Um resultado negativo obtido com este produto indica que o ADN da toxina A ou da toxina B não foi detetado no ADN extraído da amostra; no entanto, não pode negligenciar-se o facto de o ADN de *C. difficile* toxigénico tenha um título inferior ao limite de deteção (ver características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

No caso de co-infecções, a sensibilidade de um alvo pode ser afetada pela amplificação de um segundo alvo (ver Características de desempenho).

Os resultados obtidos com este produto podem, por vezes, ser inválidos devido a uma falha do controlo interno. Neste caso, a amostra deve ser novamente testada, começando pela extração, o que pode originar um atraso na obtenção dos resultados finais.

Possíveis polimorfismos, inserções ou eliminações na região do ADN visado pelos primers e sondas de produto podem prejudicar a deteção do ADN do alvo.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, os resultados obtidos com este produto têm de ser interpretados em combinação com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, existe um risco residual de obter resultados inválidos ou errados com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou ainda mais reduzido. Nalguns casos, este risco residual pode contribuir para decisões erradas com potenciais efeitos perigosos para o doente. No entanto, este risco residual associado à utilização prevista do produto foi ponderado em relação aos potenciais benefícios para o paciente e foi considerado aceitável.

18 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius

Table 63

Reação de Positive Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix e do Positive Control (Controlo positivo). Verifique os volumes da PCR Mix e do Positive Control.
Degradação da PCR Mix.	Não use a PCR Mix durante mais de 5 sessões independentes (3 horas cada no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não utilize a PCR Mix durante mais de 5 sessões consecutivas (no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não deixe a PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Degradação da Positive Control.	Não use o Positive Control para mais de 4 sessões independentes (3 horas cada na área de extração ou na Cooler Unit). Utilize uma nova alíquota da Positive Control.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELiTechGroup.

Table 64

Reação de Negative Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix e do Negative Control. Verifique os volumes da PCR Mix e do Negative Control.
Contaminação do Negative Control.	Não use o Negative Control para mais do que 1 sessão. Utilize uma nova alíquota de água de grau de biologia molecular.
Contaminação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Contaminação da área de extração, dos Racks, do Inventory Block (Gestor do reagente) ou da Cooler Unit	Limpe as superfícies com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos e as pontas utilizadas.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 65

Reação da amostra inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix, do Controlo Interno e da amostra. Verifique os volumes da PCR Mix, do Controlo Interno e da amostra.
Degradação da PCR Mix.	Não use a PCR Mix para mais de 5 sessões independentes (3 horas cada na Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não utilize a PCR Mix durante mais de 5 sessões consecutivas (no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não deixe a PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Degradação do modelo do Controlo Interno.	Utilize uma nova alíquota de Controlo Interno.
Inibição devido a substâncias interferentes na amostra.	Repita a amplificação com uma diluição de 1:2 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR only". Repita a extração com uma diluição 1:2 em água de grau de biologia molecular da amostra numa sessão "Extract + PCR" (Extrair + PCR).
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 66

Curva de dissociação anómala	
Causas possíveis	Soluções
Ausência de um pico definido. Pico definido mas Tm diferente do de outras amostras e do Positive Control.	Verifique a presença de Ct do alvo inferior a 30. A elevada quantidade de produto de amplificação no final da reação pode interferir com a análise da curva de fusão. Repita a amplificação da amostra para confirmar a presença do alvo com uma possível mutação. O alvo da amostra deve ser sequenciado para confirmar a mutação.

Table 67

Erro no cálculo de Ct	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra ou amostra com sinal de fluorescência anómalo.	Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR, selecione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado como sendo positivo. Se não for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR, selecione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado como sendo negativo, ou deixe-o como inválido. Se for necessário um valor de Ct: - repita a amplificação de amostra eluída com uma diluição 1:10 em água de grau de biologia molecular numa sessão "PCR Only" (apenas PCR). - repita a extração da amostra com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular numa sessão "Extract + PCR" (Extrair + PCR).

Table 68

Elevada taxa anómala de resultados positivos na mesma sessão (reações com valores de Ct recentes semelhantes)	
Causas possíveis	Soluções
Contaminação entre amostras durante os passos pré-analíticos.	Limpe a micropipeta com uma solução de hipoclorito de sódio (lixívia) a 3% nova ou detergente de ADN/ARN após usar a pipeta em cada amostra. Não use pipetas Pasteur. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. Introduza as amostras nas últimas posições dos instrumentos, tal como indicado nas GUI. Siga a sequência de carregamento indicada pelo software.
Contaminação pelo ambiente laboratorial.	Limpe todas as superfícies em contacto com o operador e as amostras (incluindo as pipetas) com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% (lixívia) nova ou produto de limpeza de ADN/ARN. Realize um ciclo de descontaminação U.V. Utilize um novo tubo da PCR Mix e/ou CPE.

Plataforma aberta:

Table 69

ADN alvo não detetado na reação de Positive Control	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Tenha cuidado quando distribuir reações para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho. Verifique os volumes de PCR Mix distribuídos. Verifique os volumes do positive control dispensados.
Degradação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Degradação da Positive Control.	Utilize uma nova alíquota da Positive Control.
Erro na configuração do instrumento.	Verifique as definições de posição para a reação de Positive Control no instrumento. Verifique as definições do ciclo térmico no instrumento.

Table 70

ADN do alvo detetado na reação de Negative Control	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Evite derramar o conteúdo do tubo de teste da amostra. Mude sempre as pontas entre uma amostra e a outra. Tenha cuidado quando distribuir amostras, Negative Controls e positive controls para os poços da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.
Erro durante a definição do instrumento	Verifique as definições de posição das amostras, Negative Controls, Positive Controls e dos standards no instrumento
Microplaca mal vedada.	Tenha cuidado quando vedar a microplaca.
Contaminação da água de qualidade para biologia molecular.	Use uma nova alíquota de água esterilizada.
Contaminação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Contaminação da área de extração/preparação para reações de amplificação.	Limpe as superfícies e instrumentos com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.

Table 71

Fluorescência de fundo irregular ou elevada nas reações	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta ou mistura inadequada da amostra.	Tenha cuidado, inserindo a pipeta três vezes, quando misturar amostras, Negative Controls and Positive Controls e standards na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
Erro na configuração da linha de base.	Defina o intervalo de cálculo da linha de base dentro dos ciclos onde a fluorescência de fundo já estabilizou (verifique os dados "Resultados", "Componente") e a fluorescência do sinal ainda não tenha começado a aumentar, por ex. do ciclo 6 para o ciclo 15. Utilize o cálculo automático da linha de base configurando a opção "Linha de base auto".

Table 72

Curva de dissociação anômala	
Causas possíveis	Soluções
Ausência de um pico definido. Pico definido mas diferente do de outras amostras e dos Standards ou Positive Control.	Procure um detetor FAM Ct inferior a 30. A elevada quantidade de produto de amplificação no final da reação pode interferir com a análise da curva de fusão. Repita a amplificação da amostra para confirmar a presença do ADN alvo com uma possível mutação. O ADN alvo da amostra deve ser sequenciado para confirmar a mutação.

19 SÍMBOLOS

	Número de catálogo.
	Limite máximo da temperatura.
	Código de lote.
	Prazo de validade (último dia do mês).
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Cumprimento dos requisitos da Diretiva Europeia 98/79/CE relativa a dispositivos médicos de diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Identificação única de dispositivo
	Contém suficiente para "N" testes.
	Atenção, consulte as instruções de utilização.
	Conteúdo.
	Manter afastado da luz solar.
	Fabricante.

20 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

Este produto contém reagentes produzidos pela Thermo Fisher Scientific e são vendidos ao abrigo de contratos de licenciamento celebrados entre a ELITechGroup S.p.A. e respetivas sucursais e a Thermo Fisher Scientific. O preço de compra deste produto inclui direitos exclusivos, não transmissíveis, de utilização apenas desta quantidade do produto exclusivamente para atividades do comprador que estejam diretamente relacionadas com diagnósticos em humanos. Para obter mais informações sobre a aquisição de uma licença deste produto para outros fins que não os acima indicados, contacte o Licensing Department, Thermo Fisher Scientific. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

ELITe MGB® detection reagents are covered by one or more of U. S. Patent numbers 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, and EP patent numbers 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 as well as applications that are currently pending.

As tecnologias ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® estão cobertas por patentes e candidaturas pendentes.

Esta licença limitada permite à pessoa ou entidade legal à qual este produto foi fornecido, usar o produto e os dados gerados pela utilização do produto, unicamente para diagnóstico humano. Nem o ELITechGroup S.p.A. nem os respetivos licenciantes concedem quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, para quaisquer outros fins.

Appendix A C. difficile ELITE MGB Kit usado em associação com as plataformas Genius series®



CAUTION

Este documento é uma versão simplificada das instruções de utilização oficiais. Consulte o documento completo antes da utilização: www.elitechgroup.com

Utilização prevista

O produto **C. difficile ELITE MGB® Kit** é um dispositivo médico de diagnóstico in vitro destinado a ser utilizado por profissionais de saúde como um ensaio de PCR em tempo real de ácidos nucleicos multiplexado e qualitativo para a **deteção de genes da toxina A e toxina B de *Clostridium difficile* toxigénico (*C. difficile*)**, incluindo a estirpe NAP1/BI/027 epidémica hipervirulenta, em amostras de ADN extraídas de amostras de fezes líquidas ou não formadas.

O ensaio foi validado em associação com os instrumentos **ELITE InGenius®** e **ELITE BeGenius®**, sistemas automatizados e integrados para a extração, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, usando amostras humanas de fezes.

O ensaio é também validado em associação com o **7500 Real-Time PCR System**, usando amostras humanas de fezes.

O produto destina-se a ser utilizado como auxiliar no diagnóstico de **C. difficile** toxigénico em contextos de saúde em conjunto com outros resultados de análises laboratoriais e dados clínicos.

Os resultados devem ser interpretados em conjunto com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

Sequência amplificada

Sequência	Gene	Fluoróforo	Canal
Alvo 1	Gene da toxina A específico de <i>C. difficile</i>	AP525	Toxina A
Alvo 2	Gene da toxina B específico de <i>C. difficile</i>	FAM	Toxina B
Alvo 3	IC2	AP642	CI

Matriz validada

- Fezes nativas colhidas sem conservantes

Conteúdo do Kit e produtos relacionados

C. difficile ELITE MGB Kit (M800358)	C. difficile - ELITE Positive Control (M800373)
 X 4	 X 2
C. difficile PCR Mix 4 tubos de 540 µL 24 reações por tubo 96 reações por kit 5 ciclos de congelamento-descongelamento por tubo	C. difficile Positive Control 2 tubos de 160 µL 4 reações por tubo 8 reações por kit 4 ciclos de congelamento-descongelamento por tubo

C. difficile ELITE MGB Kit (M800358)		C. difficile - ELITE Positive Control (M800373)	
Prazo de conservação máximo:	24 meses	Prazo de conservação máximo	24 meses
Temperatura de armazenamento	≤ -20°C	Temperatura de armazenamento	≤ -20°C

Outros produtos necessários não fornecidos no kit

- Instrumento ELITE InGenius: INT030. - Instrumento ELITE BeGenius: INT040. - ELITE InGenius SP 200: INT032SP200. - ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS. - ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR. - ELITE InGenius Waste Box: F2102-000. - Pontas de filtro Axigen de 300 µL: TF-350-L-R-S. - Pontas de filtro Tecan de 1000 µL: 30180118.	- CPE - Controlo interno: CTCPE - InhibitEX Buffer (QIAGEN GmbH, Alemanha, ref. 19593), ou S. T. A. R. buffer (Roche Diagnostics GmbH, ref. 3 335 208) ou um tampão equivalente - Minitip Flocked Swab® (COPAN Italia S.p.A., Itália, ref. 518CS01) ou um dispositivo equivalente.
--	--

Protocolo ELITE InGenius e ELITE BeGenius

- Volume da amostra - Volume CPE - Volume de eluição total	200 µL 10 µL 100 µL	- Volume de entrada de PCR eluato - Volume de PCR Mix - Frequência dos controlos	10 µL 20 µL 15 dias
--	---------------------------	--	---------------------------

Desempenhos ELITE InGenius e ELITE BeGenius

Matriz	Limite de deteção	Sensibilidade	Especificidade
Fezes nativas	500 CFU/mL	100% (30/30)	97,8% (44/45)

Preparação da amostra

Este produto destina-se a ser usado no instrumento **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** com o ácido nucleico extraído das seguintes amostras clínicas identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, e colhidas, transportadas e armazenadas sob as condições seguintes.

Table 73

Amostra	Requisitos de colheita	Condições de transporte/armazenamento			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2° / +8°C*	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
Fezes nativas	colhidas sem conservantes	≤ 24 horas	≤ 48 horas	≤ 1 mês	> 1 mês

Procedimentos ELITE InGenius

O utilizador é guiado passo a passo pela interface gráfica do utilizador (GUI) do software ELITE InGenius para configurar a execução. Todos os passos: extração, PCR em tempo real e a interpretação dos resultados são realizados automaticamente. Estão disponíveis dois modos operacionais: execução completa (Extract + PCR (Extrair+PCR)) ou PCR Only (Apenas PCR).

Antes da análise

1. Ligue o ELITE InGenius. Inicie sessão com o nome de utilizador e a palavra-passe. Selecione o modo " CLOSED " (Fechado).	2. Verifique os controlos: Positive Control e Negative Control no menu "Controls" (Controlos). Nota: Ambos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.	3. Descongele a PCR Mix e os tubos de CTRCPE . Submeta a vórtice suave. Centrifugue durante 5 s.
--	--	--

Procedimento 1 - Execução completa: Extract + PCR (Extrair+PCR) (p. ex., amostras)

1. Selecione "Perform Run" (Executar) no ecrã tátil	2. Verifique os volumes de extração: Entrada: "200 µL", eluição: "100 µL"	3. Leia os códigos de barras das amostras com um leitor de códigos de barras manual ou escreva a identificação da amostra
4. Selecione o "Assay protocol" (Protocolo de ensaio) de interesse: C. diff ELITE_ST_200_100	5. Selecione o método "Extract + PCR" (Extrair+PCR) e a posição da amostra: Extraction Tube (Tubo de extração)	6. Carregue a PCR Mix e o Controlo Interno no Inventory Block (Gestor do reagente)
7. Carregar: PCR Cassette, Cartucho de extração, Tubo de eluição, Cassete de pontas, Racks do tubo de extração	8. Feche a porta. Iniciar a execução	9. Visualize, aprove e guarde os resultados

NOTE

Se for necessário um modo Apenas extração, consulte o manual do utilizador do instrumento para obter informações sobre o procedimento.

Procedimento 2: PCR Only (Apenas PCR) (p. ex., eluatos, controlos)

1. Selecione "Perform Run" (Executar) no ecrã tátil	2. Verifique os volumes de extração: Entrada: "200 µL", eluição: "100 µL"	3. Leia os códigos de barras das amostras com um leitor de códigos de barras manual ou escreva a identificação da amostra
4. Selecione o "Assay protocol" (Protocolo de ensaio) de interesse: C. diff ELITE_ST_200_100 ou C. diff ELITE_PC ou C. diff ELITE_NC	5. Selecione o método "PCR Only" (Apenas PCR) e a posição da amostra "Elution Tube" (Tubo de eluição)	6. Carregue a PCR Mix no Inventory Block (Gestor do reagente)
7. Carregar: Rack de PCR Cassette e suporte de tubos de eluição com o ácido nucleico extraído	8. Feche a porta. Iniciar a execução	9. Visualize, aprove e guarde os resultados

Procedimentos ELITE BeGenius

O utilizador é guiado passo a passo pela interface gráfica do utilizador (GUI) do software ELITE BeGenius para configurar a execução. Todos os passos: extração, PCR em tempo real e a interpretação dos resultados são realizados automaticamente. Estão disponíveis dois modos operacionais: execução completa (Extract + PCR (Extrair+PCR)) ou PCR Only (Apenas PCR).

Antes da análise

1. Ligue o ELITE BeGenius. Inicie sessão com o nome de utilizador e a palavra-passe. Selecione o modo " CLOSED " (Fechado).	2. Verifique os controlos: Positive Control e Negative Control no menu "Controls" (Controlos). Nota: Ambos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.	3. Descongele a PCR Mix e os tubos de CTRCPE . Submeta a vórtice suave. Centrifugue durante 5 s.
--	--	--

Procedimento 1 - Execução completa: Extract + PCR (Extrair+PCR) (p. ex., amostras)

1. Selecione "Perform Run" (Executar) no ecrã tátil e, a seguir, clique no modo de execução "Extract + PCR" (Extrair + PCR)	2. Insira o rack de amostras com as amostras com código de barras na Cooler Unit. A leitura do código de barras já se encontra ativada	3. Verifique os volumes de extração: Entrada: "200 µL", eluato: "100 µL"
4. Selecione o "Assay protocol" (Protocolo de ensaio) de interesse: C. diff ELITE_Be_ST_200_100 Nota: Se for realizada uma segunda extração, repita os passos 2 a 4	5. Imprima as etiquetas para colocar um código de barras nos tubos de eluição vazios. Carregue os tubos no rack de eluição e insira-o na Cooler Unit	6. Carregue a PCR Mix e o Controlo Interno no rack de reagente/eluição e insira-o na Cooler Unit
7. Carregue o "PCR Rack" (Suporte de PCR) com a PCR Cassette e o "Extraction Basket" (Cesto de extração) com os cartuchos de extração "ELITE InGenius SP 200" e os consumíveis de extração necessários	8. Feche a porta. Iniciar a execução	9. Visualize, aprove e guarde os resultados

NOTE

Se for necessário um modo Apenas extração, consulte o manual do utilizador do instrumento para obter informações sobre o procedimento.

Procedimento 2: PCR Only (Apenas PCR) (p. ex., eluatos, controlos)

1. Selecione "Perform Run" (Executar) no ecrã tátil e, a seguir, clique no modo de execução "PCR Only" (Apenas PCR)	2. Carregue os tubos com código de barras do ácido nucleico extraído ou dos controlos no rack de eluição e insira-o na Cooler Unit	3. Verifique os volumes de extração: Entrada: "200 µL", eluato: "100 µL"
4. Selecione o "Assay protocol" (Protocolo de ensaio) de interesse: C. diff ELITE_Be_ST_200_100 ou C.diff ELITE_Be_PC ou C.diff ELITE_Be_NC	5. Carregue a PCR Mix no rack de reagente/eluição e insira-o na Cooler Unit	6. Carregue o "PCR Rack" (suporte de PCR) com a "PCR Cassette"
7. Feche a porta. Iniciar a execução	8. Visualize, aprove e guarde os resultados	

ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185, 10149 Torino ITÁLIA
Tel. +39-011 976 191
Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
WEB site: www.elitechgroup.com

