

Xpert[®] C. difficile/Epi

REF GXCDIFF/EPI-10

REF GXCDIFF/EPI-120

For Information Only - Not a Controlled Copy

Trademark, Patents and Copyright Statements

Cepheid[®], the Cepheid logo, GeneXpert[®] and Xpert[®] are trademarks of Cepheid.
Windows[®] is a trademark of Microsoft Corporation.

THE PURCHASE OF THIS PRODUCT CONVEYS TO THE BUYER THE NON-TRANSFERABLE RIGHT TO USE IT IN ACCORDANCE WITH THIS PACKAGE INSERT. NO OTHER RIGHTS ARE CONVEYED EXPRESSLY, BY IMPLICATION OR BY ESTOPPEL. FURTHERMORE, NO RIGHTS FOR RESALE ARE CONFERRED WITH THE PURCHASE OF THIS PRODUCT.

Copyright © Cepheid 2020. All rights reserved.

Declarações relativas a marcas registadas, patentes e copyright

Cepheid[®], o logótipo da Cepheid, GeneXpert[®] e Xpert[®] são marcas registadas da Cepheid.
Windows[®] é uma marca registada da Microsoft Corporation.

A AQUISIÇÃO DESTE PRODUTO ATRIBUI AO COMPRADOR O DIREITO NÃO TRANSFERÍVEL DE O UTILIZAR DE ACORDO COM ESTE FOLHETO INFORMATIVO. NENHUNS OUTROS DIREITOS SÃO ATRIBUÍDOS EXPRESSAMENTE, POR IMPLICAÇÃO OU POR PRECLUSÃO. ALÉM DISSO, NÃO SE CONFEREM NENHUNS DIREITOS DE REVENDA COM A AQUISIÇÃO DESTE PRODUTO.

Copyright © Cepheid 2020. Todos os direitos reservados.



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
EUA

Xpert[®] C. difficile/Epi

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.



1 Nome proprietário

Xpert[®] C. difficile/Epi

2 Nome comum ou usual

Ensaio Xpert C. difficile/Epi

3 Utilização prevista

O ensaio Cepheid Xpert[®] C. difficile/Epi é um teste qualitativo para diagnóstico *in vitro* concebido para a rápida detecção de sequências genéticas da toxina B e para a identificação presumível de estirpes 027/NAP1/BI de *Clostridium difficile* toxigénico a partir de amostras fecais não formadas (líquidas ou moles) colhidas em pacientes em que há suspeita de infeção por *C. difficile* (CDI). A identificação presumível de estirpes 027/NAP1/BI de *C. difficile* é realizada por detecção de sequências genéticas de toxina binária (CDT) e de deleção de um único par de bases do nucleótido 117 no gene *tcdC*. O gene *tcdC* codifica um regulador negativo na produção de toxina do *C. difficile*. O teste é realizado no sistema GeneXpert Dx da Cepheid e utiliza reação em cadeia da polimerase (PCR) automática em tempo real para detetar sequências genéticas de toxina associadas ao *C. difficile* produtor de toxina. O ensaio Xpert C. difficile/Epi destina-se a ajudar no diagnóstico de CDI. A detecção de estirpes 027/NAP1/BI de *C. difficile* pelo ensaio Xpert C. difficile/Epi é presumível e somente para fins epidemiológicos, não se destinando a orientação ou monitorização do tratamento de infeções por *C. difficile*. Apenas é necessária cultura concomitante se for necessária tipagem ou colheita de organismos suplementares.

4 Resumo e explicação

O *Clostridium difficile* (*C. difficile*) é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio, formador de esporos que foi associado a doença, pela primeira vez, em 1978.¹ A infeção por *Clostridium difficile* (CDI) varia de diarreia até colite pseudomembranosa potencialmente fatal.² A flora bacteriana madura do cólon de um adulto saudável é geralmente resistente à colonização por *C. difficile*.³ Contudo, se a flora normal do cólon estiver alterada, há perda de resistência à colonização. O fator de risco mais comum é a exposição a antibióticos.⁴ O fator de virulência primário do *C. difficile* é a citotoxina B.⁵ Os genes que codificam a toxina A (*tcdA*; a enterotoxina) e a toxina B (*tcdB*) fazem parte do locus de patogenicidade (PaLoc).^{6,7} A maioria das estirpes patogénicas é positiva para a toxina A e para a toxina B (A+B+), embora variantes de isolados negativos para a toxina A e positivos para a toxina B (A-B+) tenham sido reconhecidas como patogénicas.⁸ Algumas estirpes de *C. difficile* também produzem uma ADP-ribosiltransferase específica da actina, denominada CDT ou toxina binária. O locus da toxina binária contém dois genes (*cdtA* e *cdtB*) e está localizado fora do PaLoc.⁹⁻¹¹

Nos últimos anos, têm havido surtos de CDI atribuídos a várias estirpes “hipervirulentas” emergentes que incluem estirpes resistentes a fluoroquinolona pertencentes ao ribotipo de PCR 027, tipo NAP1 de PFGE e tipo BI de REA.^{8,12} As estirpes de 027/NAP1/BI poderão apresentar produção de toxina aumentada, que é atribuída a deleções no gene regulador *tcdC*, e poderão produzir mais esporos, levando a maior persistência no ambiente.^{13,14} Um resultado 027/NAP1/BI presumível positivo ou negativo poderá ajudar na identificação das possíveis origens de um surto de 027/NAP1/BI.

O diagnóstico do *C. difficile* tem-se baseado, tradicionalmente, na detecção das toxinas A ou B. Tanto o procedimento de cultura laborioso, seguido pelos testes de citotoxicidade celular dos isolados, como o ensaio de citotoxicidade celular em amostras fecais ainda são considerados o “padrão ouro” devido à sua elevada especificidade.^{15,16} Foram desenvolvidos vários imunoenaios enzimáticos rápidos para a detecção das toxinas A e B. Contudo, estes testes têm uma sensibilidade e especificidade reduzidas comparativamente ao ensaio de citotoxicidade celular. Recentemente, desenvolveram-se métodos de PCR para a detecção da toxina A e/ou toxina B com elevada sensibilidade e especificidade quando comparados com os ensaios de citotoxicidade celular e os imunoenaios.¹⁷

5 Princípio do procedimento

O GeneXpert Dx System automatiza e integra a purificação de amostras, a amplificação de ácidos nucleicos e a detecção da sequência-alvo em amostras simples ou complexas utilizando ensaios de PCR em tempo real e de transcriptase reversa associada a PCR (RT-PCR) em tempo real. (A RT-PCR em tempo real é utilizada para ensaios que detectam o ARN. O Xpert C. difficile/Epi Assay utiliza PCR em tempo real para detectar ADN). O sistema consiste num instrumento, computador pessoal e software pré-carregado para realizar testes e ver os resultados. O sistema requer a utilização de cartuchos descartáveis, de utilização única, que contêm os reagentes da PCR e onde decorre esse processo. Dado que os cartuchos são independentes, a contaminação cruzada entre amostras é eliminada. Para uma descrição completa do sistema, consulte o *Manual do operador do GeneXpert Dx System*.

O Xpert C. difficile/Epi Assay (Epi significa epidemiológico) inclui reagentes para a detecção de C. difficile toxigénico e a detecção presumível de sequências encontradas nas estirpes 027/NAP1/BI. Também é incluído um controlo de processamento da amostra (SPC). O SPC está presente para controlar o processamento adequado das bactérias-alvo e para monitorizar a presença de inibidores na reacção PCR. O controlo de verificação da sonda (PCC) verifica a reidratação dos reagentes, o enchimento do tubo da PCR no cartucho, a integridade da sonda e a estabilidade do corante.

O Cepheid Xpert C. difficile/Epi Assay é um teste de diagnóstico, rápido e automático, para diagnóstico *in vitro* concebido para detecção qualitativa de *Clostridium difficile* produtor de toxina directamente a partir de amostras fecais não formadas (líquidas ou moles) de doentes sob suspeita de infecção por *Clostridium difficile* (CDI). O ensaio detecta o gene da toxina B (*tcdB*), o gene de toxina binária (CDT) e a deleção de um único par de bases do nucleótido 117 no gene que codifica um regulador negativo de produção de toxina (*tcdCA117*). A combinação da presença dos genes que codificam a toxina B e a toxina binária e da deleção *tcdCA117* foi associada a uma estirpe hipervirulenta de C. difficile, conhecida como 027/NAP1/BI, que foi associada a surtos graves de doença em instalações de saúde a nível mundial.^{12,13,15} O ensaio é realizado no Cepheid GeneXpert Dx System.

6 Reagentes e instrumentos

6.1 Materiais fornecidos



O kit do ensaio Xpert C. difficile/Epi (GXCDIFF/EPI-10) contém reagentes suficientes para o processamento de 10 amostras ou amostras de controlo de qualidade. O kit do ensaio Xpert C. difficile/Epi (GXCDIFF/EPI-120) contém reagentes suficientes para o processamento de 120 amostras ou amostras de controlo de qualidade.

Os kits contêm o seguinte:

Cartuchos do ensaio Xpert C. difficile/Epi com tubos de reacção integrados	10	120
• Esfera 1, Esfera 2, e Esfera 3 (secagem por congelamento)	• 1 de cada por cartucho	• 1 de cada por cartucho
• Reagente 1	• 3,0 ml por cartucho	• 3,0 ml por cartucho
• Reagente 2 (hidróxido de sódio)	• 3,0 ml por cartucho	• 3,0 ml por cartucho
Bolsa de reagente do ensaio Xpert C. difficile/Epi	1 por kit	1 por kit
• Reagente da amostra (tiocianato de guanidina)	• 10 x 2,0 ml por frasco	• 120 x 2,0 ml por frasco
CD	1 por kit	1 por kit
• Ficheiro de definição do ensaio (ADF — assay definition file)		
• Instruções para importar o ADF para o software GX		
• Instruções de utilização (folheto informativo)		

Nota

As Fichas de Dados de Segurança (FDS) estão disponíveis em www.cepheid.com ou www.cepheidinternational.com, no separador APOIO (SUPPORT).

Nota

A seroalbumina bovina (Bovine Serum Albumin, BSA) presente nas esferas deste produto foi produzida e fabricada a partir de plasma bovino proveniente exclusivamente dos EUA. Os animais não foram alimentados com nenhuma proteína de ruminante ou outra proteína animal e foram aprovados nos testes ante- e post-mortem. Durante o processamento, não houve mistura do material com outros materiais de origem animal.

7 Materiais necessários mas não fornecidos

- Sistema GeneXpert Dx (o número de catálogo varia consoante a configuração): Instrumento GeneXpert, computador com software exclusivo GeneXpert versão 4.3 ou posterior, leitor de códigos de barras de mão e *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx (GeneXpert Dx System Operator Manual)*
- Impressora: Caso necessite de uma impressora, contacte a assistência técnica da Cepheid para tratar da aquisição de uma impressora recomendada.
- Agitador de vórtice
- Zaragatoa seca para transferência da amostra fecal, dispositivo de colheita de amostras da Cepheid, número de catálogo da Cepheid 900-0370 (cultura Copan Venturi Transystem®, 139CFA), ou zaragatoa descartável de utilização-única da Cepheid, número de catálogo SDPS-120 (Copan 138CS01.PH)
- Pipetas de transferência descartáveis



8 Materiais disponíveis mas não fornecidos

KWIK-STIKs™ da MicroBioLogics, n.º de catálogo 0329 (*C. difficile* toxigénico) como controlo positivo e n.º de catálogo 0527 (*C. difficile* não toxigénico) e n.º de catálogo 0331 (*C. sordelli*) como controlos negativos.


Também estão disponíveis estirpes de *C. difficile* da ATCC n.º 9689 (*C. difficile* toxigénico de tipo selvagem), n.º BAA-1870 (*C. difficile* NAP1/027) como controlos positivos e n.º 700057 (*C. difficile* não toxigénico) como controlo negativo.

Adicionalmente, podem ser obtidas estirpes dos Centers for Disease Control and Prevention dos EUA, na divisão de promoção da qualidade dos cuidados de saúde.

9 Advertências e precauções

- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Para utilização apenas com receita médica.
- Os resultados dos ensaios Xpert *C. difficile*/Epi NÃO se destinam a guiar o tratamento de infeções por *C. difficile*.²¹
-  Trate todas as amostras biológicas, incluindo os cartuchos e reagentes usados, como sendo capazes de transmitir agentes infecciosos. Dado que é frequentemente impossível saber quais as amostras biológicas que poderão ser infecciosas, todas devem ser tratadas aplicando as precauções padrão. Orientações para o manuseamento de amostras estão disponíveis nos CDC (Centers for Disease Control and Prevention)¹⁹ dos EUA e no Clinical and Laboratory Standards Institute.²⁰
- Siga os procedimentos de segurança da sua instituição quando trabalhar com químicos e manusear amostras biológicas.
- A execução do teste Xpert *C. difficile*/Epi fora dos intervalos de tempo e temperatura de conservação recomendados pode produzir resultados erróneos ou inválidos.
- Não foram estabelecidas características de desempenho para pacientes com idade < 2 anos.
- O ensaio Xpert *C. difficile*/Epi não fornece resultados de suscetibilidade. É necessária uma alíquota de amostra separada e tempo adicional para fazer cultura e realizar testes de suscetibilidade.
- Não substitua os reagentes do ensaio Xpert *C. difficile*/Epi por outros reagentes.
- Não abra a tampa do cartucho do ensaio Xpert *C. difficile*/Epi, exceto ao adicionar a amostra e os reagentes ou ao repetir um teste.
- Não utilize um cartucho que tiver caído depois de o ter retirado da embalagem.
- Não utilize um cartucho que tenha um tubo de reação danificado.
-  Cada cartucho do ensaio Xpert *C. difficile*/Epi de utilização única é utilizado para processar um teste. Não reutilize cartuchos gastos.
- As amostras biológicas, os dispositivos de transferência e os cartuchos usados devem ser considerados como sendo capazes de transmitir agentes infecciosos, exigindo precauções padrão. Siga os procedimentos relativos a resíduos ambientais da sua instituição relativamente à eliminação correta de cartuchos usados e reagentes não usados. Estes materiais podem apresentar características de resíduos químicos perigosos que exigem procedimentos de eliminação nacionais ou regionais específicos. Se as regulamentações nacionais ou regionais não disponibilizarem uma indicação clara sobre a eliminação correta, as amostras biológicas e os cartuchos usados devem ser eliminados de acordo com as diretrizes relativas ao manuseamento e à eliminação de resíduos médicos da OMS (Organização Mundial da Saúde).

10 Perigos químicos^{23, 24}

- Pictograma de perigo GHS da ONU: 
- Palavra-sinal: ATENÇÃO
- **Advertências de perigo GHS da ONU**
 - Nocivo por ingestão
 - Provoca irritação cutânea
 - Provoca irritação ocular grave
- **Recomendações de prudência GHS da ONU**
 - **Prevenção**
 - Lavar cuidadosamente após manuseamento.
 - Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto.
 - Evitar a libertação para o ambiente.
 - Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial
 - **Resposta**
 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes.
 - Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.
 - Tratamento específico, ver informação de primeiros-socorros suplementar.
 - Em caso de irritação cutânea: procure aconselhamento/consulte um médico
 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.
 - Caso a irritação ocular persista: procure aconselhamento/consulte um médico
 - EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.
 - Enxaguar a boca.
 - **Armazenamento/Eliminação**
 - Eliminar o conteúdo e/ou recipiente de acordo com a regulamentação local, regional, nacional e/ou internacional.

11 Conservação e manuseamento



- Conserve o kit do ensaio Xpert C. difficile/Epi entre 2 °C e 28 °C.
- Não utilize reagentes ou cartuchos que tenham ultrapassado o prazo de validade.
- Não abra a tampa do cartucho até estar pronto para realizar o teste.
- Não utilize nenhum reagente que esteja turvo ou que apresente alteração da cor.

12 Colheita e transporte das amostras

1. Faça a colheita da amostra fecal não formada para um recipiente limpo. Siga as orientações da sua instituição para a colheita de amostras para testes de *C. difficile*.
2. Etiquete com a ID da amostra e envie para o laboratório.
3. Conserve a amostra entre 2 °C e 8 °C. A amostra permanece estável durante até 5 dias quando armazenada entre 2 °C e 8 °C. Como alternativa, as amostras podem ser armazenadas à temperatura ambiente (20 °C a 30 °C) durante até 24 horas.



13 Procedimento

13.1 Preparação do cartucho

Importante Iniciar o teste dentro de 30 minutos após a adição da amostra ao cartucho.

Para adicionar a amostra ao cartucho:

1. Retire o cartucho e o reagente da amostra da embalagem.
2. Coloque brevemente uma zaragatoa na amostra fecal não formada. A zaragatoa não precisa de ficar completamente saturada.
3. Insira a zaragatoa no frasco contendo o reagente da amostra.

Nota Utilize gaze estéril para minimizar os riscos de contaminação.

4. Segure na zaragatoa pela haste perto do bordo do frasco, levante a zaragatoa a alguns milímetros do fundo do tubo e empurre a haste contra o bordo do frasco para a quebrar. Certifique-se de que a zaragatoa é suficientemente curta para permitir que a tampa fique bem apertada.
5. Feche a tampa e coloque no agitador de vórtice na velocidade máxima durante 10 segundos.
6. Abra a tampa do cartucho. Utilizando uma pipeta de transferência limpa (não fornecida), transfira todo o conteúdo do reagente da amostra para a câmara da amostra do cartucho do ensaio Xpert C. *difficile*/Epi.
7. Feche a tampa do cartucho.

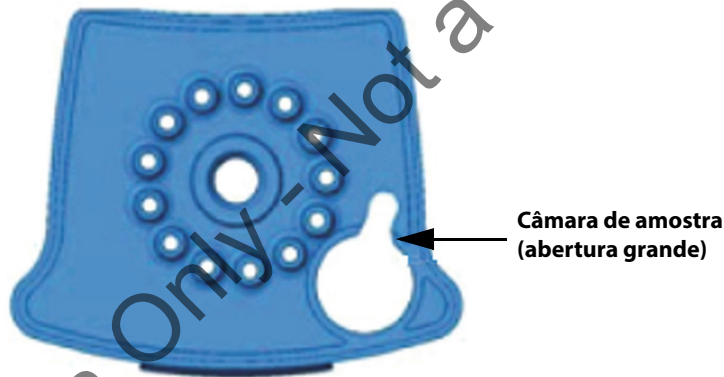


Figura 1. Cartucho do Xpert C. *difficile*/Epi (vista de cima).

13.2 Iniciar o teste

Importante Antes de iniciar o teste, certifique-se de que a definição do ensaio Xpert C. *difficile*/Epi foi importada para o software.

Esta secção enumera os passos predefinidos para utilizar o sistema do instrumento GeneXpert. Para obter instruções detalhadas, consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx (GeneXpert Dx System Operator Manual)*

Nota Os passos a seguir poderão ser diferentes se o administrador do sistema tiver alterado o fluxo de trabalho predefinido do sistema.

1. Ligue o instrumento GeneXpert Dx e depois ligue o computador. O software GeneXpert iniciará automaticamente ou pode ser necessário clicar duas vezes no ícone de atalho do software GeneXpert Dx no ambiente de trabalho do Windows®.
2. Inicie sessão no software do sistema GeneXpert Dx utilizando o seu nome de utilizador e senha.
3. Na janela do sistema GeneXpert Dx, clique em **Criar teste (Create Test)**. A janela **Criar teste (Create Test)** abre-se.
4. Leia a ID do paciente (Patient ID) (opcional). Se digitar a ID do paciente (Patient ID), assegure-se de que digita a ID do paciente (Patient ID) correta. A ID do paciente (Patient ID) é associada aos resultados do teste e é visualizada na janela **Ver resultados (View Results)**.

5. Leia ou introduza a ID da amostra (Sample ID). Se digitar a ID da amostra (Sample ID), assegure-se de que digita a ID da amostra (Sample ID) correta. A ID da amostra (Sample ID) é associada aos resultados do teste e é visualizada na janela **Ver resultados (View Results)**.
6. Realize a leitura do código de barras do cartucho do ensaio Xpert C. difficile/Epi. Utilizando a informação do código de barras, o software preenche automaticamente as caixas dos seguintes campos: Selecionar ensaio (Select Assay), ID lote de reagente (Reagent Lot ID), N/S do cartucho (Cartridge SN) e Prazo de validade (Expiration Date).

Nota

Se não for possível fazer a leitura do códigos de barras do cartucho do ensaio Xpert C. difficile/Epi, repita o teste com um cartucho novo.

CONTROL

7. Faça clique em **Iniciar teste (Start Test)**. Introduza a sua palavra-passe na caixa de diálogo que aparece.
8. Abra a porta do módulo do instrumento com a luz verde a piscar e carregue o cartucho.
9. Feche a porta. O teste começa e a luz verde para de piscar. Quando o teste termina, a luz verde desliga-se.
10. Espere até que o sistema destranque o fecho da porta antes de abrir a porta do módulo e retirar o cartucho.
11. Elimine os cartuchos usados num recipiente apropriado para resíduos de amostras, de acordo com as práticas padrão da sua instituição.

14 Visualização e impressão de resultados

Para obter instruções detalhadas sobre como visualizar e imprimir os resultados, consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx*.

15 Controlo de qualidade

Cada teste inclui um controlo de processamento da amostra (Sample Processing Control, SPC) e um controlo de verificação da sonda (Probe Check Control, PCC).

Controlo de processamento da amostra (Sample Processing Control, SPC) — Assegura que a amostra foi corretamente processada. O SPC contém esporos de *Bacillus globigii*, sob a forma de um bolo seco de esporos que está incluído em cada cartucho para verificar o processamento adequado das bactérias da amostra. O SPC verifica se ocorreu lise das bactérias de *C. difficile* e que ocorreram esporos, se os organismos estão presentes e se o processamento da amostra é adequado. Adicionalmente, este controlo deteta a inibição associada à amostra do ensaio de PCR em tempo real. O SPC deve ser positivo em amostras negativas e pode ser negativo ou positivo em amostras positivas. O SPC é aprovado se preencher os critérios de aceitação validados.

Controlo de verificação da sonda (Probe Check Control, PCC) — Antes do início da reação PCR, o sistema GeneXpert Dx mede o sinal de fluorescência das sondas para monitorizar a reidratação da esfera, o enchimento do tubo de reação, a integridade da sonda e a estabilidade do corante. A verificação da sonda é aprovada se corresponder aos critérios de aceitação atribuídos.

Controlos externos (External Controls) — De acordo com as boas práticas de laboratório, podem ser utilizados controlos externos de acordo com organizações de acreditação locais, nacionais e europeias, consoante aplicável.

16 Interpretação dos resultados

Os resultados são interpretados pelo sistema GeneXpert Dx através da medição de sinais fluorescentes e algoritmos de cálculo integrados, sendo mostrados na janela **Ver resultados (View Results)**. Os resultados possíveis são apresentados resumidamente na Tabela 1; são fornecidos detalhes adicionais a seguir à tabela.

Tabela 1. Resultados possíveis do Xpert C.difficile/Epi

Resultados				Interpretação	Exemplo ^a
Toxina B	Toxina binária	tcdC	SPC		
+	+	+	+/-	Toxigenic C.diff POSITIVO 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE POSITIVO (Toxigenic C.diff POSITIVE 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE POSITIVE)	Figura 2
+	+	-	+/-	Toxigenic C.diff POSITIVO 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVO (Toxigenic C.diff POSITIVE 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVE)	Figura 3
	-	+	+/-		
	-	-	+/-		
-	+	+	+	Toxigenic C.diff NEGATIVO 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVO (Toxigenic C.diff NEGATIVE 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVE)	Figura 4
	+	-	+		
	-	+	+		
	-	-	+		

- a. São disponibilizadas capturas de ecrã de amostra para resultados positivos e negativos no C. difficile/Epi e um resultado INVÁLIDO (INVALID). Ver Figura 2 a Figura 5. Exemplos de ERRO (ERROR) e SEM RESULTADO (NO RESULT) não são mostrados.

Tabela 2. Resultados e interpretação do Xpert C. difficile/Epi

Resultado	Interpretação
Toxigenic C.diff POSITIVO; 027 PRESUMPTIVE POSITIVO (Toxigenic C.diff POSITIVE; 027 PRESUMPTIVE POSITIVE) (Figura 2)	<p>São detetadas sequências presumíveis de ADN-alvo 027/NAP1/BI de <i>C. difficile</i> produtor de toxina.</p> <ul style="list-style-type: none"> O alvo de <i>C. difficile</i> toxigénico (toxina B) E ambos os alvos presumíveis de 027/NAP1/BI (toxina binária e <i>tcdCΔ117</i>) têm Ct (limiares de ciclo) dentro do intervalo válido e pontos finais acima da definição mínima. SPC – NA (SPC – não aplicável); o SPC é ignorado, dado que a amplificação alvo do <i>C. difficile</i> poderá competir com este controlo. Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados. <p>Nota: Isolados não 027/NAP1/BI representando o toxinotipo XIV e, ocasionalmente, os toxinotipos IV, V e X serão indicados “Toxigenic C. diff POSITIVE; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE POSITIVE” (“positivo para <i>C. diff</i> toxigénico; presumível positivo para 027-NAP1-BI”) utilizando o Xpert <i>C. difficile</i>/Epi Assay.</p>
Toxigenic C.diff POSITIVO; 027 PRESUMPTIVE NEGATIVO (Toxigenic C.diff POSITIVE; 027 PRESUMPTIVE NEGATIVE) (Figura 3)	<p>São detetadas sequências de ADN-alvo de <i>C. difficile</i> produtor de toxina.</p> <ul style="list-style-type: none"> O alvo de <i>C. difficile</i> toxigénico (toxina B) E apenas um ou nenhum dos alvos presumíveis de 027/NAP1/BI (toxina binária e <i>tcdCΔ117</i>) têm Ct (limiares de ciclo) dentro do intervalo válido e endpoints acima da definição mínima. SPC – NA (SPC – não aplicável); o SPC é ignorado, dado que a amplificação alvo do <i>C. difficile</i> poderá competir com este controlo. Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.
Toxigenic C.diff NEGATIVO; 027 PRESUMPTIVE NEGATIVO (Toxigenic C. diff NEGATIVE; 027 PRESUMPTIVE NEGATIVE) (Figura 4)	<p>Não são detetadas sequências de ADN-alvo de <i>C. difficile</i> produtor de toxina.</p> <ul style="list-style-type: none"> O alvo de <i>C. difficile</i> toxigénico (toxina B) não é detetado (independentemente de a toxina binária e/ou <i>tcdCΔ117</i> ser detetado). SPC – APROVADO (PASS); o SPC tem um Ct (limiar de ciclo) dentro do intervalo válido e um endpoint (ponto final) superior à definição mínima. Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.
INVÁLIDO (INVALID) (Figura 5)	<p>A presença ou ausência de ADN-alvo de <i>C. difficile</i> não pode ser determinada. Repita o teste de acordo com as instruções na secção do procedimento de repetição de teste abaixo.</p> <ul style="list-style-type: none"> SPC – FAIL (FALHA); o resultado do alvo do SPC é negativo, o Ct (limiar de ciclo) do SPC não está dentro do intervalo válido e o endpoint (ponto final) é inferior à definição mínima. Verificação da sonda — APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.
ERRO (ERROR)	<p>A presença ou ausência de ADN-alvo de <i>C. difficile</i> não pode ser determinada. Repita o teste de acordo com as instruções da secção abaixo.</p> <ul style="list-style-type: none"> Alvos de <i>C. difficile</i> produtor de toxina — SEM RESULTADO (NO RESULT) Toxina binária (CDT) — SEM RESULTADO (NO RESULT) <i>tcdCΔ117</i> — SEM RESULTADO (NO RESULT) <p>Verificação da sonda – FALHA (FAIL)*; um ou mais dos resultados de verificação da sonda falharam.</p> <p>*Se a verificação da sonda foi aprovada, o erro foi causado porque o limite de pressão máxima excedeu o intervalo aceitável.</p>

Tabela 2. Resultados e interpretação do Xpert C. difficile/Epi (Continuação)

Resultado	Interpretação
SEM RESULTADO (NO RESULT)	<p>A presença ou ausência de ADN-alvo de <i>C. difficile</i> não pode ser determinada. Repita o teste de acordo com as instruções da secção abaixo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alvos de <i>C. difficile</i> produtor de toxina — SEM RESULTADO (NO RESULT) • Toxina binária (CDT) — SEM RESULTADO (NO RESULT) • <i>tcdC</i>Δ117 — SEM RESULTADO (NO RESULT) • Verificação da sonda — NA (não aplicável)

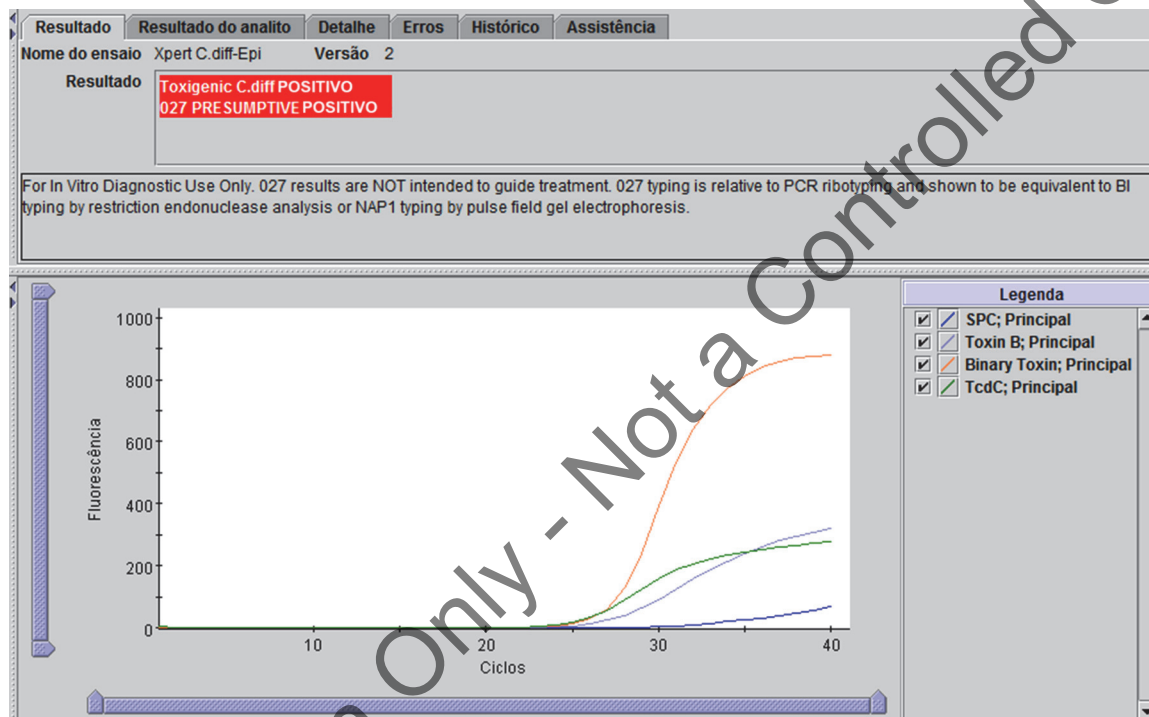


Figura 2. Exemplo de um resultado Toxigenic C.diff POSITIVO; 027 PRESUMPTIVE POSITIVO (Toxigenic C.diff POSITIVE; 027 PRESUMPTIVE POSITIVE)

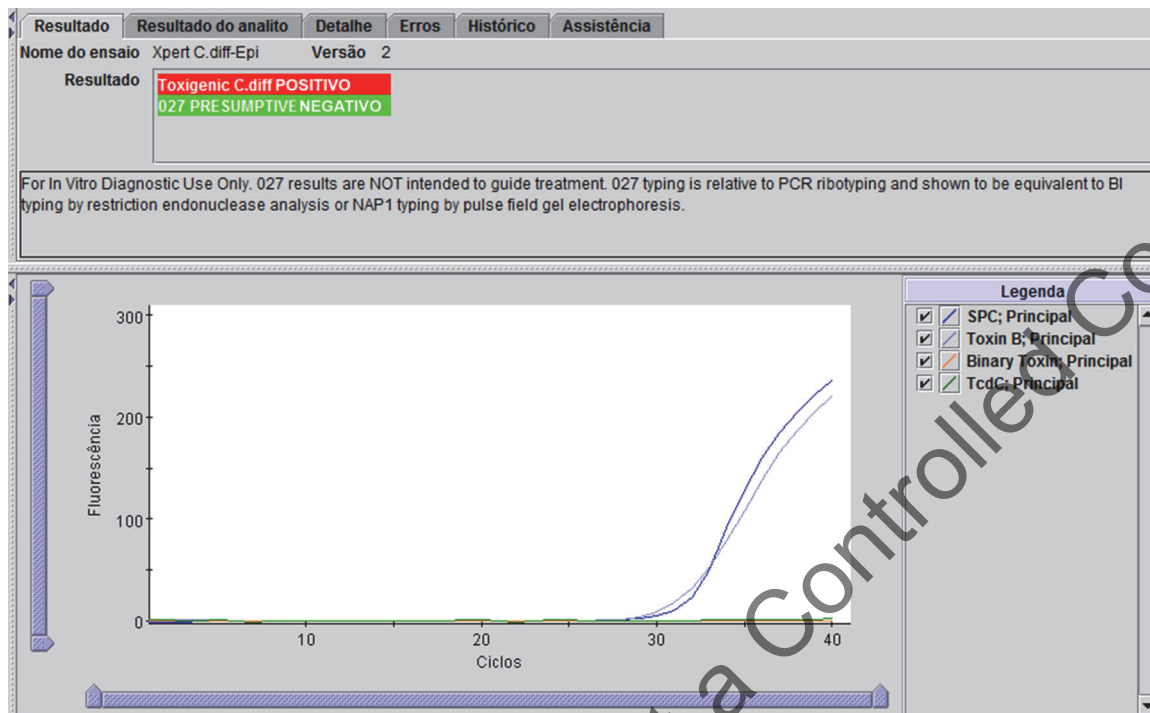


Figura 3. Exemplo de um resultado Toxigenic C.diff POSITIVO; 027 PRESUMPTIVE NEGATIVO (Toxigenic C.diff POSITIVE; 027 PRESUMPTIVE NEGATIVE)

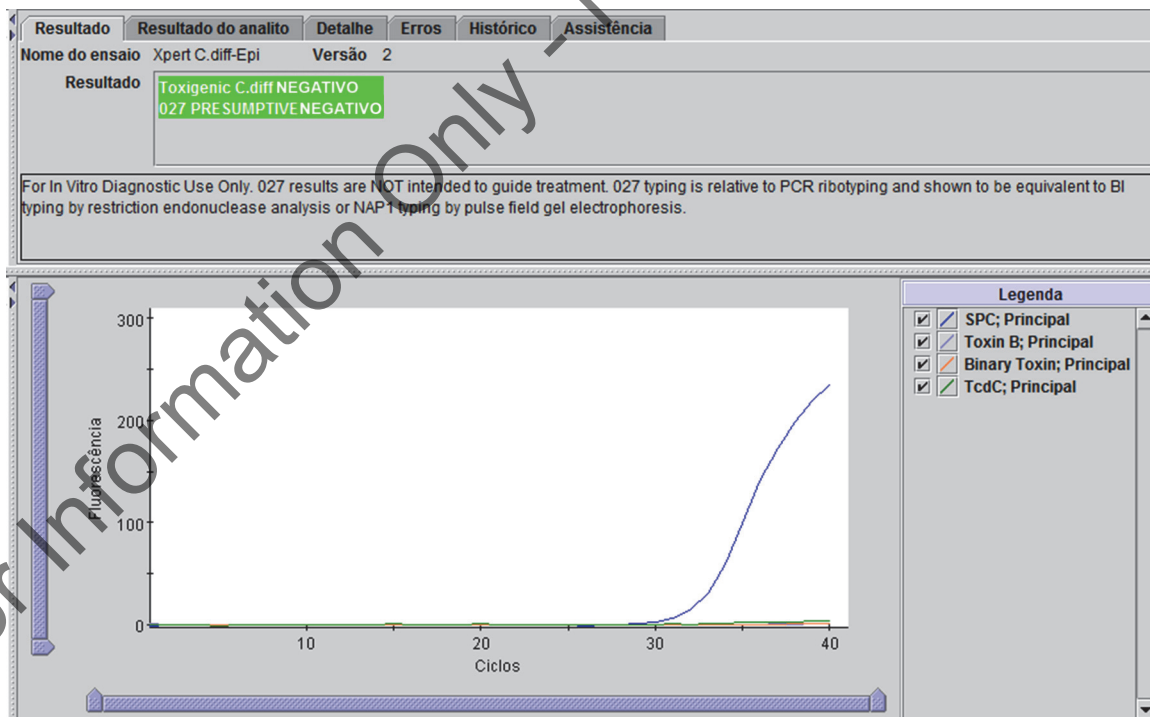


Figura 4. Exemplo de um resultado Toxigenic C.diff NEGATIVO; 027 PRESUMPTIVE NEGATIVO (Toxigenic C.diff NEGATIVE; 027 PRESUMPTIVE NEGATIVE)

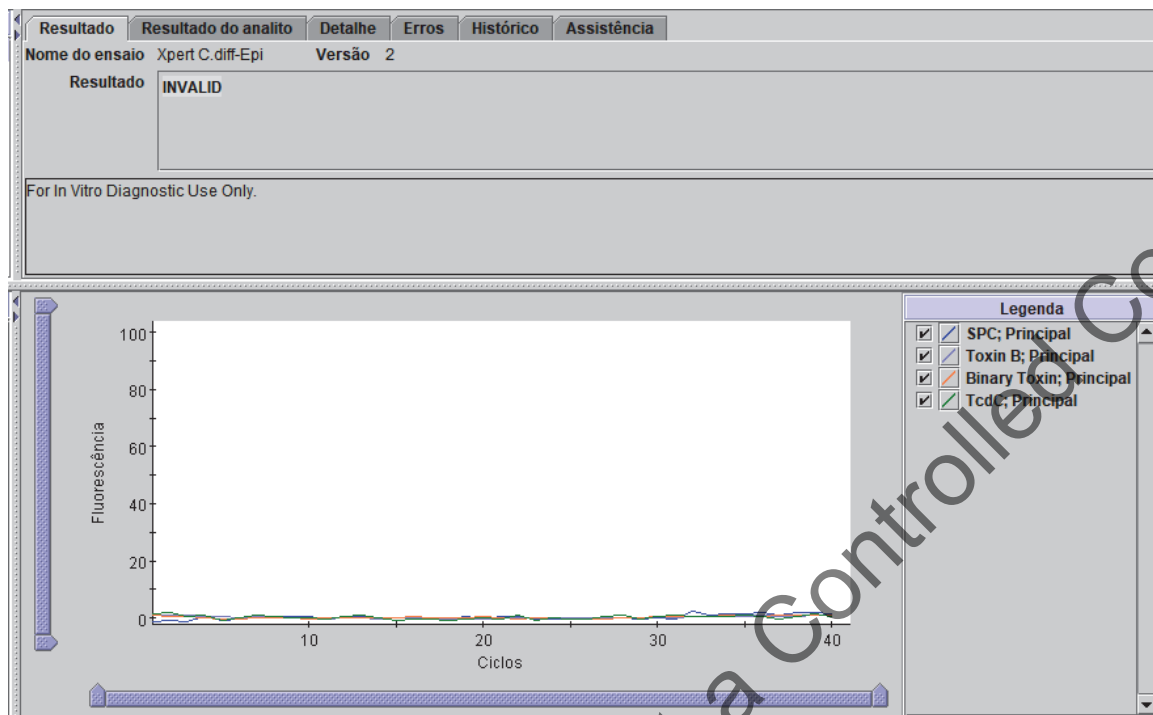


Figura 5. Exemplo de um resultado INVÁLIDO (INVALID)

17 Motivos para repetir o ensaio

Se algum dos resultados de teste mencionados abaixo ocorrer, repita o teste de acordo com as instruções na secção de procedimentos de repetição de teste abaixo.

Um resultado **INVÁLIDO (INVALID)** indica que o SPC falhou. A amostra não foi processada adequadamente ou a PCR foi inibida.

Um resultado **ERRO (ERROR)** indica que o controlo de verificação da sonda falhou e que o ensaio foi abortado. Algumas das causas possíveis são: o tubo de reação não foi adequadamente enchido, foi detetado um problema de integridade da sonda de reagente ou os limites de pressão máxima foram excedidos.

SEM RESULTADO (NO RESULT) indica que os dados colhidos foram insuficientes. Por exemplo, o utilizador parou um teste que estava a decorrer.

17.1 Procedimento de repetição do teste

Para uma repetição de teste dentro de 3 horas da obtenção de um resultado indeterminado, utilize um novo cartucho (não reutilize o cartucho) e novos reagentes.

1. Transfira o conteúdo restante da câmara de amostra para um novo frasco de reagente de amostra utilizando uma pipeta de transferência descartável.
2. Coloque no agitador de vórtice e adicione todo o conteúdo do reagente de amostra à câmara de amostra do novo cartucho do ensaio Xpert C. difficile/Epi.
3. Feche a tampa e inicie o novo teste.

Para uma repetição de teste 3 horas após a obtenção de um resultado indeterminado, repita o teste com uma nova amostra de zaragatoa.

18 Limitações

- Isolados não 027/NAP1/BI representando o toxintipo XIV serão indicados como **Toxigenic C. diff POSITIVO; 027 PRESUMPTIVE POSITIVO (Toxigenic C. diff POSITIVE; 027 PRESUMPTIVE POSITIVE)** utilizando o ensaio Xpert C. difficile/Epi.
- Ocasionalmente, isolados não 027/NAP1/BI representando os toxintipos IV, V e X serão indicados como **Toxigenic C. diff POSITIVO; 027 PRESUMPTIVE POSITIVO (Toxigenic C. diff POSITIVE; 027 PRESUMPTIVE POSITIVE)** utilizando o ensaio Xpert C. difficile/Epi.
- O desempenho do ensaio Xpert C. difficile/Epi foi validado utilizando apenas os procedimentos detalhados neste folheto informativo. Qualquer modificação destes procedimentos pode alterar o desempenho do teste.
- Resultados positivos obtidos com pacientes pediátricos imunocomprometidos podem ser sinal de que são portadores assintomáticos de C. difficile/Epi.
- A deteção de ácido nucleico de C. difficile nas fezes confirma a presença destes organismos em pacientes com diarreia, mas pode não indicar que os C. difficile são os agentes etiológicos da diarreia.
- Os resultados do ensaio Xpert C. difficile/Epi deverão ser interpretados em conjugação com outros dados laboratoriais e clínicos de que o médico disponha.
- Resultados de teste incorretos podem ser originados por uma incorreta colheita de amostras, incumprimento dos procedimentos recomendados para colheita, manuseamento e conservação de amostras, erro técnico, troca de amostras ou porque o número de organismos na amostra é demasiado baixo para ser detetado pelo teste. Para se evitarem resultados incorretos, é necessária uma cuidadosa conformidade com as instruções deste folheto.
- Devido ao fator de diluição associado ao procedimento de repetição de teste, é possível que as amostras positivas para C. difficile muito próximas do, ou equivalentes ao, limite de deteção (LoD) do ensaio C. difficile/Epi possam originar um resultado falso negativo na repetição do teste.
- Foi observada inibição do ensaio Xpert C. difficile/Epi na presença das seguintes substâncias: pasta de óxido de zinco e creme Vagisil®.
- Estirpes distintas da 027/NAP1/BI podem causar surtos de CDI.
- Podem ocorrer resultados falsos negativos quando o organismo infetante tiver mutações genómicas, inserções, deleções ou rearranjos ou quando o teste é realizado muito cedo no curso da doença.

19 Valores esperados

Foi incluído no estudo clínico do ensaio Xpert *C. difficile*/Epi um total de 2293 amostras fecais não formadas de sete centros dos EUA e Canadá. O número e a percentagem de casos positivos de *C. difficile* toxigénico por cultura, calculados por grupo etário e género, são apresentados na Tabela 3 e Tabela 4, respetivamente.

Tabela 3. Prevalência observada de *C. difficile* toxigénico por grupo etário^a

Grupos etários	N	Prevalência de <i>C. difficile</i> toxigénico (incluindo 027/NAP1/BI)	Prevalência de 027/NAP1/BI
2-5	16	37,5% (6/16)	12,5% (2/16)
6-21	105	12,4% (13/105)	0,9% (1/105)
22-59	898	16,4% (147/898)	3,3% (30/898)
>60	1274	20,7% (264/1274)	7,2% (92/1274)
Total	2293	18,8% (430/2293)	5,5% (125/2293)

a. Prevalência com base em resultados Xpert.

Tabela 4. Prevalência observada de *C. difficile* toxigénico por sexo^a

Sexo	N	Prevalência de <i>C. difficile</i> toxigénico (inclui 027/NAP1/BI)	Prevalência de 027/NAP1/BI
Masculino	1072	18,2% (195/1072)	5,0% (54/1072)
Feminino	1221	19,2% (235/1221)	5,8% (71/1221)
Total	2293	18,8% (430/2293)	5,5% (125/2293)

a. Prevalência com base em resultados Xpert.

20 Características do desempenho

20.1 Desempenho clínico

As características de desempenho do ensaio *C. difficile*/Epi foram determinadas num estudo multicêntrico de investigação prospetiva em sete instituições dos EUA e do Canadá, comparando o ensaio Xpert *C. difficile*/Epi com a cultura de referência, seguindo-se testes de citotoxicidade dos isolados e tipagem de estirpe das estirpes toxigénicas através dos métodos de ribotipagem por PCR, eletrolise de gel em campo pulsado (PFGE) e análise por endonuclease de restrição (REA).²²

Os sujeitos incluíram indivíduos cujos cuidados de rotina exigiam testes *C. difficile*. Foi obtida uma porção de cada amostra fecal não formada restante para teste no ensaio Xpert *C. difficile*/Epi. A restante amostra excedente foi enviada para um laboratório central para cultura de referência e teste de citotoxina B. Cada amostra fecal foi inoculada em placa de ágar direta pré-reduzida de cicloserina-cefoxitina-frutose (CCFA-D) e meio líquido de cicloserina-cefoxitina manitol com taurocolato lisozima cisteína (CCMB-TAL). Após 24 horas, foi realizada subcultura do CCMB-TAL numa segunda placa de CCFA-E (enriquecida com CCFA). Este método de cultura enriquecida direta é designado doravante como “cultura de referência”.

Se o *C. difficile* era isolado da placa CCFA-D e o isolado era positivo no ensaio de citotoxicidade celular, a amostra era classificada como “positiva para *C. difficile* toxigénico” e não era feita análise suplementar da placa CCFA-E. Se o *C. difficile* não era isolado da placa CCFA-D ou se o isolado era negativo no ensaio de citotoxicidade celular, era feita análise suplementar da placa CCFA-E.

Se a placa CCFA-E era positiva para *C. difficile* e o isolado era positivo no ensaio de citotoxicidade celular, a amostra era classificada como “positiva para *C. difficile* toxigénico”. A amostra era indicada como “negativa” se a CCFA-E era negativa para *C. difficile* ou se o isolado apresentava um resultado negativo no ensaio de citotoxicidade.

Depois do teste de cultura de referência, os isolados positivos para *C. difficile* toxigénico eram enviados para um segundo conjunto de laboratórios de referência para identificação da estirpe por REA, PFGE e ribotipagem por PCR.

O desempenho do ensaio Xpert *C. difficile*/Epi foi calculado em relação aos resultados da cultura direta com tipagem de estirpes, para cada um dos três métodos de tipagem de estirpes, e da cultura de referência com tipagem de estirpes, para cada um dos três métodos de tipagem de estirpes.

20.2 Resultados totais

Foi testado pelo ensaio Xpert *C. difficile*/Epi, cultura e tipagem de estirpes um total de 2293 amostras.

20.3 Desempenho vs. cultura direta

Em relação à cultura direta com tipagem de estirpes por REA, o ensaio Xpert *C. difficile*/Epi demonstrou uma sensibilidade e especificidade para *C. difficile* toxigénico de 98,72% e 90,86%, respetivamente. O ensaio Xpert *C. difficile*/Epi também demonstrou uma concordância positiva de 98,55% e uma concordância negativa de 97,65% para o BI (Tabela 5).

Tabela 5. Desempenho do Xpert *C. difficile*/Epi vs. cultura direta e REA

Cultura direta e REA					
		Toxina B+ BI +	Toxina B+ BI -	NEGAT.	Total ^a
Xpert <i>C.diff</i> /Epi ^b	Toxina B+ 027/NAP1/BI+	68	5	47	120
	Toxina B+ 027/NAP1/BI-	1	158	140	299
	NEGAT.	0	3	1860	1863
	Total	69	166	2047	2282
<i>C. difficile</i> toxigénico			<i>C. difficile</i> toxigénico / 027/NAP1/BI		
Sensibilidade: 98,72% (232/235)			Concordância pos.: 98,55% (68/69)		
Especificidade: 90,86% (1860/2047)			Concordância neg.: 97,65% (2161/2213)		
Exatidão: 91,67% (2092/2282)			Exatidão: 97,68% (2229/2282)		
VPP ^c : 55,37% (232/419)			VPP: 56,67% (68/120)		
VPN ^d : 99,84% (1860/1863)			VPN: 99,95% (2161/2162)		

- 11 amostras foram positivas em cultura, mas não foi feita a tipagem de estirpes pelas seguintes razões: digestão de endonuclease de restrição incompleta ou o isolado não foi enviado. Estas 11 amostras não estão incluídas nas características de desempenho acima.
- Os resultados Xpert mostrados referem-se à primeira ou à segunda tentativa. Aproximadamente 3,2% das amostras apresentaram resultado indeterminado na primeira tentativa.
- Valor preditivo positivo
- Valor preditivo negativo

Em relação à cultura direta com tipagem de estirpes por PFGE, o ensaio Xpert C. difficile/Epi demonstrou uma sensibilidade e especificidade para C. difficile toxigénico de 98,76% e 90,86%, respetivamente. O ensaio Xpert C. difficile/Epi também demonstrou uma concordância positiva de 100% e uma concordância negativa de 97,61% para NAP1 (Tabela 6).

Tabela 6. Desempenho do ensaio Xpert C. difficile/Epi vs. cultura direta e PFGE

Cultura direta e PFGE					
		Toxina B+ NAP1+	Toxina B+ NAP1-	NEGAT.	Total ^a
Xpert C.diff/ Epi ^b	Toxina B+ 027/NAP1/BI+	71	6	47	124
	Toxina B+ 027/NAP1/BI-	0	161	140	301
	NEGAT.	0	3	1860	1863
	Total	71	169	2047	2288
C. difficile toxigénico			C. difficile toxigénico / 027/NAP1/BI		
Sensibilidade: 98,76% (238/241)			Concordância pos.: 100% (71/71)		
Especificidade: 90,86% (1860/2047)			Concordância neg.: 97,61% (2163/2216)		
Exatidão: 91,70% (2098/2288)			Exatidão: 97,68% (2234/2288)		
VPP ^c : 56,00% (238/425)			VPP: 57,26% (71/124)		
VPN ^d : 99,84% (1860/1863)			VPN: 100% (2164/2164)		

- 5 amostras foram positivas em cultura, mas não foi feita a tipagem de estirpes pelas seguintes razões: digestão de endonuclease de restrição incompleta; sem crescimento ou contaminação. Estas 5 amostras não estão incluídas nas características de desempenho acima.
- Os resultados Xpert mostrados referem-se à primeira ou à segunda tentativa. Aproximadamente 3,2% das amostras apresentaram resultado indeterminado na primeira tentativa.
- Valor preditivo positivo
- Valor preditivo negativo

Em relação à cultura direta com ribotipagem por PCR, o ensaio Xpert *C. difficile*/Epi demonstrou uma sensibilidade e especificidade para *C. difficile* toxigénico de 98,78% e 90,86%, respetivamente. O ensaio Xpert *C. difficile*/Epi também demonstrou uma concordância positiva de 100% e uma concordância negativa de 97,70% para o 027 (Tabela 7).

Tabela 7. Desempenho do ensaio Xpert *C. difficile*/Epi vs. cultura direta e ribotipagem por PCR

Cultura direta e ribotipagem por PCR					
		Toxina B+ 027+	Toxina B+ 027-	NEGAT.	Total ^a
Xpert <i>C. diff</i> / Epi ^b	Toxina B+ 027/NAP1/BI+	74	4	47	125
	Toxina B+ 027/NAP1/BI-	0	164	140	304
	NEGAT.	0	3	1860	1863
	Total	74	171	2047	2292
<i>C. difficile</i> toxigénico			<i>C. difficile</i> toxigénico / 027/NAP1/BI		
Sensibilidade: 98,78% (242/245)			Concordância pos.: 100% (74/74)		
Especificidade: 90,86% (1860/2047)			Concordância neg.: 97,70% (2167/2218)		
Exatidão: 91,71% (2102/2292)			Exatidão: 97,77% (2241/2292)		
VPP ^c : 56,41% (242/429)			VPP: 59,20% (74/125)		
VPN ^d : 99,84% (1860/1863)			VPN: 100% (2218/2218)		

- a. Não pôde ser feita a tipagem de um isolado devido a contaminação; esta amostra não está incluída nas estatísticas de desempenho.
b. Os resultados Xpert mostrados referem-se à primeira ou à segunda tentativa. Aproximadamente 3,2% das amostras apresentaram resultado indeterminado na primeira tentativa.
c. Valor preditivo positivo
d. Valor preditivo negativo

20.4 Desempenho vs. cultura de referência

A cultura de referência (enriquecida) é um método mais sensível para detecção de *C. difficile* em pacientes sintomáticos; por exemplo, melhora a detecção de um baixo número de organismos em amostras devido a tratamento antibiótico anterior e potencial perda de viabilidade devido ao transporte das amostras.

Em relação à cultura de referência com tipagem de estirpes por REA, o ensaio Xpert *C. difficile*/Epi demonstrou uma sensibilidade e especificidade para o *C. difficile* toxigénico de 93,35% e 94,02%, respetivamente. O ensaio Xpert *C. difficile*/Epi também demonstrou uma concordância positiva de 96,51% e uma concordância negativa de 98,31% para o BI (Tabela 8).

Tabela 8. Desempenho do ensaio Xpert *C. difficile*/Epi vs. cultura de referência e REA

Cultura de referência e REA					
		Toxina B+ BI +	Toxina B+ BI -	NEGAT.	Total ^a
Xpert <i>C. diff</i> /Epi ^b	Toxina B+ 027/NAP1/BI+	83	6	31	120
	Toxina B+ 027/NAP1/BI-	2	204	86	292
	NEGAT.	1	20	1841	1862
	Total	86	230	1958	2274
<i>C. difficile</i> toxigénico			<i>C. difficile</i> toxigénico / 027/NAP1/BI		
Sensibilidade: 93,35% (295/316)			Concordância pos.: 96,51% (83/86)		
Especificidade: 94,02% (1841/1958)			Concordância neg.: 98,31% (2151/2188)		
Exatidão: 93,93% (2136/2274)			Exatidão: 98,24% (2234/2274)		
VPP ^c : 71,60% (295/412)			VPP: 69,17% (83/120)		
VPN ^d : 98,87% (1841/1862)			VPN: 99,86% (2151/2154)		

- a. 19 amostras foram positivas na cultura, mas não foi feita a tipagem de estirpes pelas seguintes razões: digestão de endonuclease de restrição incompleta ou o isolado não foi enviado. Estas 19 amostras não estão incluídas nas características de desempenho acima.
- b. Os resultados Xpert mostrados referem-se à primeira ou à segunda tentativa. Aproximadamente 3,2% das amostras apresentaram resultado indeterminado na primeira tentativa.
- c. Valor preditivo positivo
- d. Valor preditivo negativo

Em relação à cultura de referência com tipagem de estirpes por PFGE, o ensaio Xpert *C. difficile*/Epi demonstrou uma sensibilidade e especificidade para *C. difficile* toxigénico de 93,60% e 94,02%, respetivamente. O ensaio Xpert *C. difficile*/Epi também demonstrou uma concordância positiva de 97,73% e uma concordância negativa de 98,27% para NAP1 (Tabela 9).

Tabela 9. Desempenho do ensaio Xpert *C. difficile*/Epi vs. cultura de referência e PFGE

Cultura de referência e PFGE					
		Toxina B+ NAP1 +	Toxina B+ NAP1 -	NEGAT.	Total ^a
Xpert <i>C. diff</i> /Epi ^b	Toxina B+ 027/NAP1/BI+	86	7	31	124
	Toxina B+ 027/NAP1/BI-	1	213	86	300
	NEGAT.	1	20	1841	1862
	Total	88	240	1958	2286
		<i>C. difficile</i> toxigénico		<i>C. difficile</i> toxigénico / 027/NAP1/BI	
		Sensibilidade:	93,60% (307/328)	Concordância pos.:	97,73% (86/88)
		Especificidade:	94,02% (1841/1958)	Concordância neg.:	98,27% (2160/2198)
		Exatidão:	93,96% (2148/2286)	Exatidão:	98,25% (2246/2286)
		VPP ^c :	72,41% (307/424)	VPP:	69,35% (86/124)
		VPN ^d :	98,87% (1841/1862)	VPN:	99,91% (2160/2162)

- a. 7 amostras foram positivas na cultura, mas não foi feita a tipagem de estirpes pelas seguintes razões: digestão de endonuclease de restrição incompleta; sem crescimento ou contaminação. Estas 7 amostras não estão incluídas nas características de desempenho acima.
- b. Os resultados Xpert mostrados referem-se à primeira ou à segunda tentativa. Aproximadamente 3,2% das amostras apresentaram resultado indeterminado na primeira tentativa.
- c. Valor preditivo positivo
- d. Valor preditivo negativo

Em relação à cultura de referência com ribotipagem por PCR, o ensaio Xpert C. difficile/Epi demonstrou uma sensibilidade e especificidade para C. difficile toxigénico de 93,39% e 94,02%, respetivamente. O ensaio Xpert C. difficile/Epi também demonstrou uma concordância positiva de 98,89% e uma concordância negativa de 98,36% para o 027 (Tabela 10).

Tabela 10. Desempenho do ensaio Xpert C. difficile/Epi vs. cultura de referência e ribotipagem por PCR

Cultura de referência e ribotipagem por PCR					
		Toxina B+ 027 +	Toxina B+ 027 -	NEGAT.	Total ^a
Xpert C. diff/Epi ^b	Toxina B+ 027/NAP1/BI+	89	5	31	125
	Toxina B+ 027/NAP1/BI-	0	217	86	303
	NEGAT.	1	21	1841	1863
	Total	90	243	1958	2291
C. difficile toxigénico			C. difficile toxigénico / 027/NAP1/BI		
Sensibilidade: 93,39% (311/333)			Concordância pos.: 98,89% (89/90)		
Especificidade: 94,02% (1841/1958)			Concordância neg.: 98,36% (2165/2201)		
Exatidão: 93,93% (2152/2291)			Exatidão: 98,38% (2254/2291)		
VPP ^c : 72,66% (311/428)			VPP: 71,20% (89/125)		
VPN ^d : 98,82% (1841/1863)			VPN: 99,95% (2165/2166)		

- 2 amostras foram positivas na cultura, mas não foi feita a tipagem de estirpe devido a contaminação, não sendo incluídas nas características de desempenho acima descritas.
- Os resultados Xpert mostrados referem-se à primeira ou à segunda tentativa. Aproximadamente 3,2% das amostras apresentaram resultado indeterminado na primeira tentativa.
- Valor preditivo positivo
- Valor preditivo negativo

21 Utilização de antibióticos

Dos 2293 casos incluídos no conjunto de dados principal, a utilização de antibióticos nos 2 meses anteriores à colheita da amostra foi relatada em 1630, tendo a não-utilização de antibióticos sido confirmada em 570; desconhece-se o estado da toma de antibióticos em 93 casos. A utilização de antibióticos não provocou nenhuma diferença estatisticamente significativa no desempenho do ensaio.

22 Especificidade analítica

Foram recolhidas, quantificadas e testadas cinquenta e cinco (55) estirpes utilizando o ensaio Xpert C. difficile/Epi. As estirpes foram obtidas através da American Type Culture Collection (ATCC), da Coleção de Culturas da Universidade de Gotemburgo (CCUG), da Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas Celulares (DSMZ), dos Centers for Disease Control and Prevention (CDC) dos EUA, do Instituto de Saúde Pública (Maribor, Eslovénia) e do Instituto Sueco para Controlo de Doenças Infecciosas (SMI).

Das espécies testadas, foram incluídas dez (10) estirpes de C. difficile não toxigénico e onze (11) espécies de Clostridium não C. difficile. Os organismos testados foram identificados como Gram-positivos (37) ou Gram-negativos (18). Os organismos foram ainda classificados como aeróbios (24), anaeróbios (29) ou microaeróbios (2).

Cada estirpe foi testada em triplicado em concentrações que variaram entre $1,1 \times 10^8$ e $2,2 \times 10^{10}$ UFC/zaragatoa. Incluíram-se no estudo controlos positivos e negativos. Nas condições do estudo, todos os isolados foram indicados como **Toxigenic C.diff NEGATIVO; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVO (Toxigenic C.diff NEGATIVE; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVE)**.

A especificidade analítica foi de 100%.

23 Sensibilidade analítica

Realizaram-se estudos para determinar os intervalos de confiança de 95% para o limite de detecção analítico (LoD) de *C. difficile* diluído numa matriz fecal de origem humana que pode ser detetada pelo ensaio Xpert *C. difficile/Epi*. A matriz fecal consistiu em fezes humanas líquidas (negativas para *C. difficile* no ensaio Xpert *C. difficile/Epi*) diluídas em PBS com 15% de glicerol. O LoD é definido como o número mais baixo de unidades formadoras de colónias (UFC) por zaragatoa que pode ser continuamente reproduzido e distinguido de amostras negativas com 95% de confiança.

Réplicas de 20 foram avaliadas em cada concentração de *C. difficile* testada (UFC/zaragatoa) para 7 estirpes diferentes de *C. difficile* representando os toxinotipos 0 (duas estirpes), III (duas estirpes), IV, V e VIII (um de cada estirpe).

A estimativa e os intervalos de confiança foram determinados utilizando regressão logística com dados (número de resultados positivos por número de réplicas em cada nível) da gama de UFC testadas. Os intervalos de confiança foram determinados utilizando estimativas de probabilidade máxima nos parâmetros do modelo logístico, utilizando a matriz de variância-covariância para amostras grandes. As estimativas do ponto do LoD e dos intervalos de confiança de 95% superior e inferior para cada toxinotipo de *C. difficile* testado são apresentadas resumidamente na Tabela 11.

Tabela 11. Intervalos de confiança de 95% para o LoD analítico - *C. difficile*

ID da estirpe	Toxinotipo	LoD _{95%} (UFC/zaragatoa)	IC de 95% inferior	IC de 95% superior
VPI 10463 (CCUG19126)	0	255	190	632
90556-M6S (ATCC9689)	0	460	419	587
LUMC-1 (027/NAP1/BI) ^a	III	23	19	31
LUMC-5 (027/NAP1/BI) ^a	III	75	45	176
LUMC-7	V	45	34	104
LUMC-6	VIII	60	50	74
9101	XII	41	34	49

^aPor ribotipagem por PCR/eletroforese de gel em campo pulsado/análise por endonuclease de restrição

Os resultados deste estudo indicam que o ensaio Xpert *C. difficile/Epi* produz um resultado positivo para *C. difficile* 95% das vezes para uma amostra fecal contendo 460 UFC/zaragatoa e um resultado presumível positivo para 027/NAP1/BI 95% das vezes para uma zaragatoa contendo 75 UFC.

Para além da determinação do LoD, foram testadas com o ensaio Xpert *C. difficile/Epi* dezoito estirpes de *C. difficile* representando os toxinotipos 0 e 12 toxinotipos variantes, incluindo 4 isolados 027/NAP1/BI de toxinotipo III. As estirpes de *C. difficile* foram selecionadas para representar, em geral, a maioria dos toxinotipos de *C. difficile* encontrados na prática. Foram preparadas culturas de stock através da suspensão do crescimento bacteriano de placas de ágar em tampão PBS contendo 15% de glicerol. A concentração de cada stock foi ajustada para 1,4 a 5,9 unidades McFarland. Todas as estirpes foram diluídas serialmente a aproximadamente 900 UFC/zaragatoa e testadas em triplicado.

Nas condições deste estudo, o ensaio Xpert *C. difficile/Epi* identificou corretamente todas as 18 estirpes testadas como **Toxigenic C. diff POSITIVO (Toxigenic C. diff POSITIVE)**. Também estiveram incluídos no painel 8 toxinotipos indicados como positivos para produção de toxina binária (CDT). Todos apresentaram resultado positivo para CDT utilizando o ensaio Xpert *C. difficile*. Todos os quatro isolados 027/NAP1/BI representando o toxinotipo III foram corretamente identificados como **Toxigenic C.diff POSITIVO; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE POSITIVO (Toxigenic C.diff POSITIVE; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE POSITIVE)**.

24 Substâncias que interferem

Foram testadas para interferência com o ensaio Xpert *C. difficile*/Epi vinte e uma (21) substâncias biológicas e químicas ocasionalmente usadas ou encontradas em amostras fecais. Substâncias potencialmente interferentes incluem, entre outras, creme Vagisil e pasta de óxido de zinco (ver Secção 18, Limitações). As 19 substâncias listadas na Tabela 12 não mostraram nenhuma interferência detetável com o ensaio Xpert *C. difficile*/Epi.

Tabela 12. Substâncias testadas e que não mostraram interferência com o ensaio

Substância	Substância
Sangue total Hospital universitário Karolinska	K-Y Jelly/Gelée® McNeil-PPC
Mucina (porcina) Sigma	Vaselina Unilever
Kaopectate® Chattem	Dulcolax® Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals
Imodium® McNeil-PPC	Preparation H em toalhetes individuais Wyeth Consumer Healthcare
Pepto-Bismol® Procter & Gamble	Vaginal Contraceptive Film (VCF) Apothecus Pharmaceutical
Preparation H® Wyeth Consumer Healthcare	Vancomicina Fluka
Fleet® CB Fleet Company	Metronidazol Actavis
Gorduras fecais Hospital universitário Karolinska	Anusol® Plus TM Warner-Lambert Company
Monistat® McNeil-PPC	Sulfato de bário E-Z-HDTM de elevada densidade para suspensão E-Z-EM Canada
Creme de hidrocortisona Longs Drugs	

25 Reprodutibilidade

Foi testado um painel de 7 amostras com concentrações variáveis de *C. difficile* toxigénico e *C. difficile*, 027/NAP1/BI, em 10 dias diferentes, por dois operadores diferentes, em cada um dos três locais (7 amostras x 2 operadores/dia x 10 dias x 3 locais). Foi utilizado um lote do ensaio Xpert *C. difficile*/Epi em cada um dos 3 locais de teste. Os ensaios Xpert *C. difficile*/Epi foram realizados de acordo com o procedimento do ensaio Xpert *C. difficile*/Epi. Os resultados são apresentados resumidamente nas Tabela 13 e Tabela 14.

Tabela 13. Sumário dos resultados de reprodutibilidade (todos)

ID da amostra	% de concordância ^a			% de concordância total por amostra
	Local 1	Local 2	Local 3	
Negativo	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
<i>C. difficile</i> toxigénico negativo elevado	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
<i>C. difficile</i> toxigénico positivo baixo	100% (20/20)	85% (17/20)	85% (17/20)	90,0% (54/60)
<i>C. difficile</i> toxigénico positivo moderado	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
027/NAP1/BI negativo elevado	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
027/NAP1/BI positivo baixo	100% (20/20)	95% (19/20)	95% (19/20)	96,7% (58/60)
027/NAP1/BI positivo moderado	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
% de concordância total por local	100% (140/140)	97,1% (136/140)	97,1% (136/140)	98,1% (412/420)

- a. Para amostras negativas e negativas elevadas, a % de concordância = (n.º de resultados negativos/total de amostras processadas); para amostras positivas baixas e moderadas, a % de concordância = (n.º de resultados positivos/total de amostras processadas).

Tabela 14. Sumário de resultados do valor Ct por nível de amostra e sonda

SPC			
Nível	Méd.	Desv. pad.	CV
<i>C. difficile</i> toxigénico neg. elevado	32,17	0,59	1,83%
<i>C. difficile</i> toxigénico pos. baixo	32,14	0,53	1,66%
<i>C. difficile</i> toxigénico pos. moderado	31,98	0,47	1,47%
027/NAP1/BI neg. elevado	32,11	0,65	2,03%
027/NAP1/BI pos. baixo	31,93	0,72	2,26%
027/NAP1/BI pos. moderado	31,96	0,61	1,90%
Neg	32,26	0,72	2,22%
tcdB (toxina B)			
Nível	Méd.	Desv. pad.	CV
<i>C. difficile</i> toxigénico neg. elevado	39,59	0,70	1,77%
<i>C. difficile</i> toxigénico pos. baixo	35,88	0,81	2,24%
<i>C. difficile</i> toxigénico pos. moderado	32,17	0,45	1,39%
027/NAP1/BI neg. elevado	39,11	0,98	2,50%
027/NAP1/BI pos. baixo	35,49	0,58	1,65%
027/NAP1/BI pos. moderado	32,10	0,63	1,97%

Foi testado um painel adicional de 6 amostras, três negativas e três negativas elevadas para *C. difficile* toxigénico, em 5 dias diferentes, por dois operadores diferentes, em cada um dos três locais (6 amostras x 2 operadores/dia x 5 dias x 3 locais). As amostras negativas elevadas foram preparadas numa concentração inferior ao LoD, esperando-se obter um resultado negativo 20 a 80% das vezes. Foi utilizado um lote do ensaio Xpert *C. difficile*/Epi em cada um dos 3 locais de teste. Os ensaios Xpert *C. difficile*/Epi foram realizados de acordo com o procedimento do ensaio Xpert *C. difficile*/Epi. Os resultados são apresentados resumidamente na Tabela 15.

Tabela 15. Sumário dos resultados adicionais de reprodutibilidade das amostras

ID da amostra	% de concordância ^a			% de concordância total por amostra
	Local 1	Local 2	Local 3	
Negativo	100% (30/30)	100% (30/30)	100% (30/30)	100% (90/90)
<i>C. difficile</i> toxigénico negativo elevado ^b	60,0% (18/30) ^b	60,0% (18/30) ^b	53,3% (16/30) ^b	57,8% (52/90) ^b

a. (n.º de resultados negativos/total de amostras negativas elevadas processadas)

b. 20% a 80% de concordância esperada para uma amostra negativa elevada

26 Referências

1. Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet* 1978;1:1063-1066.
2. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002; 31:334-339
3. Borriello SP. The influence of the normal flora on *Clostridium difficile* colonization of the gut. *Ann Med* 1990;22:61-67.
4. Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect.* 1998; 40:1-15.
5. Kelly CP, Pothoulakis C, Lamont JT. *Clostridium difficile* colitis. *N Engl J Med* 1994; 330:257-262.
6. Braun V, Hundsberger T, Leukel P, et al. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. 1996; *Gene.* 181:29-38.
7. Hammond GA, Johnson JL. The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. *Microb Pathog.* 1995;19:203-213.
8. Sambol SP, Merrigan MM, Lyerly D, et al. Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease. *Infect. Immun.* 2000;68:5480-5487.
9. Gonçalves C, Decré D, Barbut F, et al. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1933-1939
10. Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, et al. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;186:307-312.
11. Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P. Action-specific ADP-ribotransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun.* 1988;56:2299-2306.
12. Kuijper EJ, Coignard B, Tull P. ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*; EU Member States; European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12 Suppl 6:2-18.
13. Curry SR, Marsh JW, Muto CA, et al. *tcdC* genotypes associated with severe *TcdC* truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 2007 Jan;45:215-221. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 2007 Jun;45(6):2103.
14. Weiss K, Boisvert A, Chagnon M, et al. Multipronged Intervention Strategy to Control an Outbreak of *Clostridium difficile* Infection (CDI) and Its Impact on the Rates of CDI from 2002 to 2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30(2):156-162.
15. MacCannell DR, Louie TJ, Gregson DB, et al. Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2147-2152.
16. Wilkins TD, Lyerly DM. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. *Clin Microbiol.* 2003 Feb;41:531-534.
17. Delmee M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7:411-416.
18. Poutanen SM, Simor AE. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ.* 2004;171:51-58.
19. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
21. Cohen SH, Gerding D, Johnson S, et al. SHEA-IDSA Guideline: Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:431-455.
22. Killgore G, Thompson A, Johnson S, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol* 2008;46:431-437.
23. REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on the classification labeling and packaging of substances and mixtures amending and repealing, List of Precautionary Statements, Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC (amending Regulation (EC) No 1907/2007).
24. Occupational Safety and Health Standards, Hazard Communication, Toxic and Hazard Substances (March 26, 2012) (29 C.F.R., pt. 1910, subpt. Z).

27 Locais das sedes da Cepheid

Sede corporativa

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
EUA
Telefone: + 1 408 541 4191
Fax: + 1 408 541 4192
www.cepheid.com

Sede europeia

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
França
Telefone: + 33 563 825 300
Fax: + 33 563 825 301
www.cepheidinternational.com

28 Assistência Técnica

Antes de contactar a Assistência Técnica da Cepheid, reúna as seguintes informações:

- Nome do produto
- Número de lote
- Número de série do instrumento
- Mensagens de erro (se houver alguma)
- Versão de software e, caso se aplique, número de Service Tag (etiqueta de serviço) do Computador

Informações de Contato
















EUA
Telefone: + 1 888 838 3222
Email: techsupport@cepheid.com

França
Telefone: + 33 563 825 319
Email: support@cepheideurope.com

As informações de contacto para outros escritórios da assistência técnica da Cepheid estão disponíveis no nosso website:
www.cepheid.com/en/CustomerSupport

Termos e Condições da Cepheid podem ser encontrados em <http://www.cepheid.com/en/support/support/order-management>.

29 Tabela de símbolos

Símbolo	Significado
	Número de catálogo
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Não reutilizar
	Código do lote
	Consulte as instruções de utilização
	Cuidado
	Fabricante
	País de fabrico
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Controlo
	Prazo de validade
	Para utilização apenas com receita médica
	Limites de temperatura
	Riscos biológicos
	Atenção



Cepheid
 904 Caribbean Drive
 Sunnyvale, CA 94089
 EUA

