

Instruções de uso

RealStar[®]

Clostridium difficile PCR Kit 2.0

03/2019 PT

RealStar®

Clostridium difficile PCR Kit 2.0

Para utilização com

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

CE

IVD

REF

172013

Σ

96

📖

03 2019

🏭

altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Conteúdo

1.	Utilização Prevista	6
2.	Componentes do Kit	6
3.	Armazenamento	6
4.	Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos.....	7
5.	Informação de Base	8
6.	Descrição do Produto.....	9
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	10
7.	Avisos e Precauções	11
8.	Procedimento	12
8.1	Preparação de Amostras.....	12
8.2	Preparação da Master Mix.....	13
8.3	Preparação da Reação	15
9.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	16
9.1	Definições	16
9.2	Detetores de fluorescência (corantes)	16
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	17
10.	Análise de Dados	17
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	18
10.1.1	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)	18
10.1.2	Processamento de Teste Inválido (qualitativo).....	18
10.2	Interpretação dos Resultados	19
10.2.1	Análise Qualitativa	19
11.	Avaliação do Desempenho.....	19

11.1	Sensibilidade Analítica	20
11.2	Especificidade Analítica	22
11.3	Precisão	23
12.	Limitações	24
13.	Controlo de Qualidade.....	25
14.	Apoio Técnico	25
15.	Bibliografia	25
16.	Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade.....	26
17.	Explicação de Símbolos	27

1. Utilização Prevista

O RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 é um teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a detecção e diferenciação qualitativas de ADN específico de *toxina A (tcdA)* e *toxina B (tcdB)* do *Clostridium difficile*.

2. Componentes do Kit

Cor cobertura	Componente	Número de frascos	Volume [µl/tubo]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Vermelho	Positive Control	1	250
Branco	Water (PCR grade)	1	500

3. Armazenamento

- O RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da receção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e -15 °C depois do momento da entrega.
- Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido de reagentes Master (mais do que duas vezes), pois isto poderá afetar o desempenho do ensaio. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se a sua utilização prevista for intermitente.
- O armazenamento entre +2 °C e +8 °C não deve exceder um período de duas horas.
- Proteger o Master A e o Master B da luz.

4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos

- Instrumento de PCR em tempo real adequado (consulte o capítulo 6.1. Instrumentos de PCR em tempo real)
- Sistema ou kit de extração de ácido nucleico adequado (ver capítulo 8.1 Preparação de amostras)
- Centrífuga de bancada com um rotor para tubos de reação de 2 ml
- Centrífuga com um rotor para placas de microtitulação, aquando da utilização de placas de reação com 96 poços
- Agitador vortex
- Placas de reação com 96 poços ou tubos de reação adequados com material de fecho (óticos) correspondente
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipeta com filtros (descartáveis)
- Luvas sem pó (descartáveis)

NOTA



Certifique-se de que todos os instrumentos utilizados foram instalados, calibrados, verificados e mantidos de acordo com as instruções e recomendações do fabricante.

NOTA



É altamente recomendada a utilização do rotor de 72 poços com tubos de reação de 0,1 ml adequados, se utilizando o Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou o Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Informação de Base

Clostridium difficile é uma bactéria anaeróbia que produz esporos no género *Clostridium*. A espécie inclui uma estrutura de população diversa com centenas de diferentes tipos de estirpes. As bactérias são gram-positivas com um genoma circular grande de cerca de 4,3 Mb. [1]

A bactéria é transmitida por via fecal-oral, muitas das vezes durante a hospitalização, em virtude do isolamento inadequado de doentes infetados e de rotinas de higiene deficitárias. Mas nem todos os doentes infetados mostram sintomas. *Clostridium difficile* não consegue desenvolver-se na flora gastrointestinal saudável normal porque outras bactérias impedem a sua proliferação. Após erradicação da flora normal, devido à administração de antibióticos, poderá ocorrer um desenvolvimento excessivo e a colonização total do cólon. [2]

Após colonização do cólon, a bactéria pode produzir uma ou duas toxinas, as toxinas A e B, que causam o efeito patogénico. Esta produção de toxinas é desencadeada por *deteção de quórum*. As toxinas produzidas perturbam a aderência das células mucosas (*tcdA*) e induzem a apoptose (*tcdB*), que pode levar a várias patologias, desde a diarreia ligeira a complicações inflamatórias potencialmente fatais como colite pseudomembranosa ou megacólon tóxico. Em 1,5% de todos os casos hospitalizados com diarreia devido a *Clostridium difficile*, a infeção é fatal, sendo que os doentes idosos são os que correm maior risco. [2, 3]

Os doentes afetados recebem tratamento com antibiótico e cuidados de apoio para contrariar a desidratação e a perda de eletrólitos. Mas a forma dos esporos de *Clostridium difficile* é resistente aos antibióticos o que agrava o tratamento e pode levar à reincidência de sintomas após a retirada do tratamento com antibiótico. [2] *Clostridium difficile* é uma das principais causas de diarreia associada a antibióticos e de infeções associadas aos cuidados de saúde em países desenvolvidos, com um impacto económico considerável. Como o número de infeções graves tem continuado a aumentar ao longo das últimas décadas, intensifica-se a necessidade de deteção e tratamento rápidos e precisos no intuito de baixar a mortalidade e os custos médicos e de controlar as infeções. [4]

- [1] Knight DR, Elliot B, Chang BJ, Perkins TT, Riley TV (2015) Diversity and Evolution in the Genome of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Rev. 28: 721-741.
- [2] Tonna I and Welsby PD (2005). Pathogenesis and treatment of Clostridium difficile infection. Postgrad Med J. 81: 367-369.
- [3] Kirk JA, Banerji O, Fagan RP (2017). Characteristics of the Clostridium difficile cell envelope and its importance in therapeutics. Microb Biotechnol. 10: 76-90.
- [4] Peng Z, Ling L, Stratton CW, Li C, Polage CR, Wu B, Tang Y-W (2018). Advances in the diagnosis and treatment of Clostridium difficile infections. Emerg Microbes Infect. Doi: 10.1038/s41426-017-0019-4.

6. Descrição do Produto

O RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 é um teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a detecção e diferenciação qualitativas de ADN específico de *toxina A (tcdA)* e *toxina B (tcdB)* do *Clostridium difficile*.

O ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga (Controlo Interno) (Internal Control) para identificar possíveis inibições da PCR e para confirmar a integridade dos reagentes do kit.

A tecnologia de PCR em tempo real utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação das sequências alvo específicas e das sondas alvo específicas para a detecção do ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas do ADN de *tcdA* estão marcadas com o fluoróforo Cy⁵, enquanto as sondas específicas do ADN de *tcdB* estão marcadas com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o Controlo Interno (Internal Control, IC) está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a detecção paralela do ADN específico do *tcdA* e *tcdB*, assim como a detecção do Controlo Interno (Internal Control) nos canais de detecção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

O teste consiste em dois processos num único tubo de ensaio:

- Amplificação de PCR do ADN alvo e Controlo Interno (Internal Control)
- Detecção simultânea de amplificações de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 consiste em:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)

O Principal A e o Principal B contêm todos os componentes (tampão PCR, transcriptase reversa, sais de magnésio, primers e sondas) para permitir a amplificação mediada por PCR e para a deteção do ADN específico de *tcdA*, ADN específico de IC e um Controlo Interno (Internal Control) numa única preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 foi desenvolvido e validado para que ser utilizado com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

7. Avisos e Precauções

Leia as Instruções de Utilização cuidadosamente antes de utilizar o produto.

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a:
 - Integridade
 - Totalidade no que diz respeito ao número, tipo e conteúdos (consulte o capítulo 2. Componentes do Kit)
 - Etiquetagem correta
 - Congelado aquando o momento da entrega
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e *procedimentos de diagnósticos in vitro*.
- devem ser sempre tratados como sendo infecciosos e/ou nocivos, segundo os procedimentos laboratoriais de segurança.
- Utilize luvas protetoras descartáveis sem pó, uma bata de laboratório e proteção ocular quando manusear as amostras.
- Evite contaminação microbiana e por nuclease (DNase/RNase) dos espécimes e dos componentes do kit.
- Utilize sempre pontas de pipeta descartáveis sem DNase/RNase, com barreiras de aerossóis.
- Use sempre luvas protetoras descartáveis sem pó quando manusear os componentes do kit.
- Utilize áreas de trabalho separadas e isoladas para (i) a preparação da amostra, (ii) a preparação da reação e (iii) as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente.

- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.
- Guarde o material positivo e/ou potencialmente positivo separado de todos os outros componentes do kit.
- Não abra os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplicões.
- Os controlos adicionais poderão ser testados segundo as diretrizes ou requisitos de regulamentações estatais e/ou federais ou organizações acreditadas.
- Não utilize a autoclave para os tubos de reação após a PCR, dado que não iria degradar o ácido nucleico amplificado e iria suportar o risco de contaminar a área de laboratório.
- Não utilize componentes do kit que tenham passado do prazo de validade.
- Deite fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as regulamentações de segurança locais.

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

O ADN extraído é o material inicial para o RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0.

A qualidade do ADN extraído tem um impacto profundo no desempenho de todo o sistema de teste. É recomendado assegurar que o sistema utilizado para a extração de ácido nucleico é compatível com a tecnologia de PCR em tempo real. Os seguintes kits e sistemas são adequados para a extração de ácido nucleico:

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)

- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- Sistema molecular VERSANT® kPCR SP (Siemens Healthcare)

Os seguintes kits e sistemas de extração de ácido nucleico também podem ser adequados. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 deve ser validada pelo utilizador.

No caso da utilização de um procedimento de preparação de amostras baseado numa coluna de centrifugação, incluindo tampões de lavagem contendo etanol, recomenda-se vivamente um passo de centrifugação adicional de 10 min. a aproximadamente 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando um tubo de colheita novo, antes da eluição do ácido nucleico.

ATENÇÃO



Se o seu sistema de preparação de amostras utilizar tampões de lavagem contendo etanol, certifique-se de que elimina quaisquer vestígios de etanol antes da eluição do ácido nucleico. O Etanol é um forte inibidor de PCR em tempo real.

ATENÇÃO



A utilização de ARN transportador é crucial para a eficiência da extração e estabilidade do ácido nucleico.

Para obter informações adicionais e assistência técnica relativamente ao pré-tratamento e preparação de amostras, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o 14. Apoio Técnico).

8.2 Preparação da Master Mix

Todos os reagentes e amostras devem ser completamente descongelados, misturados (através de pipetagem ou por agitação ligeira em vortex) e centrifugados brevemente antes da utilização.

O RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 contém um Controlo Interno (Internal Control, IC) heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um PCR controlo de inibição.

- ▶ Se o IC for utilizado como um controlo de inibição de PCR, mas não como um controlo para o procedimento de preparação de amostras, prepare o Master Mix de acordo com o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Reagente Principal A	5 µl	60 µl
Reagente Principal B	15 µl	180 µl
Internal Control	1 µl	12 µl
Volume Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Se o IC for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controlo de inibição de PCR, adicione o IC durante o procedimento de extração de ácido nucleico.
- ▶ Independentemente do método/sistema usado para a extração de ácido nucleico, o CI (IC) **não deve ser** adicionado diretamente ao espécime. O IC deve ser sempre acrescentado à mistura de tampão de espécime/lise. O volume do IC que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 10% do volume da eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de tampão de eluição ou água, deve ser adicionado 6 µl de IC por amostra à mistura de tampão de espécime/lise.
- ▶ Se o IC for adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, prepare o Master Mix de acordo com o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Reagente Principal A	5 µl	60 µl
Reagente Principal B	15 µl	180 µl
Volume Master Mix	20 µl	240 µl

ATENÇÃO

Se o IC (Internal Control - Controlo interno) tiver sido adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, pelo menos o controlo negativo deve incluir o IC.

ATENÇÃO

Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, nunca adicione IC diretamente ao espécime.

8.3 Preparação da Reação

- ▶ Pipete 20 µl do Master Mix para cada poço necessário de uma placa de reação ótica com 96 poços adequada ou um tubo de reação ótico adequado.
- ▶ Adicione 10 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 10 µl dos controlos (controlo positivo ou negativo).

Preparação da Reação	
Master Mix	20 µl
Controlo da Amostra	10 µl
Volume Total	30 µl

- ▶ Certifique-se de que é utilizado pelo menos um Controlo Positivo e pelo menos um Controlo Negativo por Master Mix e execute o processamento.

- ▶ Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a Master Mix através de pipetagem para cima e para baixo.
- ▶ Feche a placa de reação com 96 poços com as tampas adequadas ou uma película adesiva ótica e os tubos de reação adequados.
- ▶ Centrifugue a placa de reação com 96 poços numa centrífuga com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real

Para obter informações relativas à configuração e programação dos diferentes instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à utilização do RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 em instrumentos de PCR em tempo real específicos, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

9.1 Definições

- ▶ Configure as seguintes definições:

Definições	
Volume de Reação	30 µl
Taxa de rampa	Predefinição
Referência Passiva	Nenhuma

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- ▶ Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ADN específico de <i>tcdA</i>	<i>tcdA</i>	Cy [®] 5	(Nenhum)
ADN específico de <i>tcdB</i>	<i>tcdB</i>	FAM™	(Nenhum)
Internal Control	IC	JOE™	(Nenhum)

9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

► Defina o perfil de temperatura e a aquisição de corante:

	Fase	Repetições do Ciclo	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplificação	Realização de Ciclo	45	-	95	00:15
			sim	58	00:45
			-	72	00:15

10. Análise de Dados

Para obter informações básicas relativas à análise de dados em instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 em diferentes instrumentos de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico

10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)

Um teste de diagnóstico **qualitativo** é considerado **válido** se as seguintes condições de controlo forem cumpridas:

ID do Controlo	Canal de Detecção		
	Cy ⁵	FAM™	JOE™
Controlo positivo [<i>tcdA</i> e <i>tcdB</i>]	+	+	+/-*
Controlo Negativo	-	-	+

* A presença ou ausência de um sinal no canal JOE™ não é relevante para a validade da análise processada.

10.1.2 Processamento de Teste Inválido (qualitativo)

Um ensaio de diagnóstico **qualitativo** é **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se alguma das condições para um ensaio de diagnóstico **válido** não existir.

No caso de um ensaio de diagnóstico **inválido**, repita o teste usando os restantes ácidos nucleicos purificados ou comece a partir das amostras originais novamente.

10.2 Interpretação dos Resultados

10.2.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção			Interpretação de Resultados
Cy [®] 5	FAM™	JOE™	
+	+	+*	ADN específico de <i>tcdA</i> e <i>tcdB</i> detetado.
+	-	+*	ADN específico de <i>tcdA</i> detetado.
-	+	+*	ADN específico de <i>tcdB</i> detetado.
-	-	+	Não foi detetado ADN específico de <i>tcdA</i> ou de <i>tcdB</i> . A amostra não contém quantidades detetáveis de ADN específico de <i>tcdA</i> ou de <i>tcdB</i> .
-	-	-	Inibição de PCR ou falha de reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra.

* Não é necessária a deteção do Controlo interno (Internal control) no canal de deteção JOE™ para resultados positivos no canal de deteção Cy[®]5 nem no canal de deteção FAM™. Uma carga elevada de ADN de *tcdA* e/ou de *tcdB* na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo Interno (Internal Control).

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação de desempenho de RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 foi feita usando ADN quantificado da estirpe *Clostridium difficile* ATCC®BAA-1804™ da American Type Culture contendo ambos os alvos (toxina A (*tcdA*) e toxina B (*tcdB*)).

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 define-se como a concentração (cópias/μl do eluato) de moléculas de ADN específico de *tcdA* ou de *tcdB* que podem ser detetadas com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada por análise de séries de diluição de ADN de *tcdA* e ADN de *tcdB* quantificados.

Tabela 1: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ADN específico de *tcdA*

Concentração inserida [cópias/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
100,000	24	24	100,000
31,620	24	24	100,000
10,000	24	24	100,000
3,162	24	24	100,000
1,000	24	24	100,000
0,316	24	23	95,833
0,200	24	21	87,500
0,100	24	14	58,333
0,032	24	7	29,167
0,010	24	4	16,667
0,0032	24	1	4,167

Tabela 2: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ADN específico de *tcdB*

Concentração inserida [cópias/ μ l]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
100,00	24	24	100,000
31,62	24	24	100,000
10,00	24	24	100,000
3,162	24	24	100,000
1,000	24	24	100,000
0,316	24	24	100,000
0,200	24	21	100,000
0,100	24	10	41,667
0,032	24	5	20,833
0,010	24	2	8,333
0,0032	24	1	4,167

A sensibilidade analítica do RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 foi determinada por análise Probit:

- Para a deteção do ADN específico de *tcdA*, a sensibilidade analítica é de 0,46 cópias/ μ l [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,28 – 0,96 cópias/ μ l]
- Para a deteção do ADN específico de *tcdB*, a sensibilidade analítica é de 0,47 cópias/ μ l [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,30 – 0,93 cópias/ μ l]

11.2 Especificidade Analítica

Reatividade

A especificidade analítica com respeito à reatividade do RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 foi avaliada por um painel de ADN genómico extraído de estirpes de *C. difficile* que produzem diferentes toxinas.

O RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 é capaz de detetar e diferenciar ADN das seguintes estirpes de *C. difficile* que produzem diferentes toxinas:

- ATCC® BAA-1875™ *Clostridium difficile* (presença de genes *tcdB* confirmada por PCR)
- ATCC® BAA-1875™ *Clostridium difficile* (presença de genes *tcdA* e *tcdB* confirmada por PCR)
- ATCC® BAA-1801™ *Clostridium difficile* (ausência de genes *tcdA* e *tcdB* confirmada por PCR)

Especificidade

A especificidade analítica do RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 foi avaliada através do teste a um painel de ARN/ADN genómico extraído de diferentes agentes patogénicos gastrointestinais e flora comensal encontrados no intestino e nas fezes.

O RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- Astrovírus
- *Campylobacter coli*
- *Campylobacter jejuni*
- *Campylobacter lari*
- *Clostridium sordellii*
- *Cryptococcus neoformans*
- *Entamoeba histolytica*
- *Enterococcus faecalis*
- *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC)
- *Escherichia coli*
- *Giardia lamblia*
- *Norovírus GI*
- *Norovírus GII*

- *Rotavírus*
- *Proteus mirabilis*
- *Proteus vulgaris*
- *Salmonella enterica*
- *Sapovírus*
- *Shigella flexneri*
- *Yersinia enterocolitica*

11.3 Precisão

A precisão do RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 foi determinada com base na variabilidade intraensaio (variabilidade dentro de um ensaio), na variabilidade inter-ensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e na variabilidade interlote (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada através da combinação das três análises.

Os dados de variabilidade são expressos em termos do desvio padrão e do coeficiente de variação baseado no ciclo limiar (C_t) – valores. Pelo menos 6 réplicas por amostra foram analisadas quanto a variabilidade intraensaio, variabilidade interensaio e variabilidade interlote.

Tabela 3: Dados de precisão para a detecção de ADN específico de *tcdA* e de *tcdB*

<i>tcdA</i> e <i>tcdB</i>		Ciclo limiar médio (C_t)	Desvio padrão	Coefficiente de Variação (%)
Variabilidade Intraensaio	<i>tcdA</i>	30,91	0,15	0,49
	<i>tcdB</i>	30,59	0,15	0,47
Variabilidade Inter-Ensaio	<i>tcdA</i>	30,77	0,18	0,58
	<i>tcdB</i>	30,82	0,20	0,64
Variabilidade Entre Lotes	<i>tcdA</i>	30,57	0,13	0,41
	<i>tcdB</i>	30,63	0,12	0,39
Variabilidade Total	<i>tcdA</i>	30,68	0,12	0,39
	<i>tcdB</i>	30,75	0,21	0,68

Tabela 4: Dados de precisão para a detecção do Controlo Interno

Internal Control	Ciclo limiar médio (C _t)	Desvio padrão	Coefficiente de Variação (%)
Variabilidade Intraensaio	26,37	0,08	0,30
Variabilidade Inter-Ensaio	26,28	0,12	0,47
Variabilidade Entre Lotes	26,17	0,06	0,23
Variabilidade Total	26,24	0,12	0,45

12. Limitações

- A rigorosa conformidade com as Instruções de utilização é necessária para resultados otimizados.
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- A boa prática laboratorial é essencial para que este ensaio tenha um desempenho adequado. Deve-se ter um cuidado extremo para preservar a pureza dos componentes do kit e as configurações da reação. Todos os reagentes devem ser vigiados de perto para evitar impurezas e contaminação. Qualquer reagente duvidoso deve ser rejeitado.
- São necessários procedimentos de recolha, transporte, armazenamento e processamento adequados para o desempenho ideal deste teste.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente no espécime. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A presença de inibidores PCR de (por ex., heparina) poderá causar resultados inválidos ou sub falsos negativos em .
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma dos *tcdAe tcdB* abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar em na incapacidade de detecção da presença do agente patogénico.

- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 têm de ser interpretados tendo em consideração todas as conclusões clínicas e laboratoriais.

13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

14. Apoio Técnico

Para apoio ao cliente, contacte o nosso Apoio Técnico através do

E-mail: support@altona-diagnostics.com
Telefone: +49-(0)40-5480676-0

15. Bibliografia

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

RealStar® (Altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Os nomes registados, marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, mesmo onde não estão especificamente marcados como tal, não devem ser considerados como estando desprotegidos pela legislação.

O RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 é um kit de diagnóstico com a marcação CE de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/EC relativa ao diagnóstico *in vitro*.

Produto não licenciado junto da Health Canada e não autorizado ou aprovado pela FDA.

Não disponível em todos os países.

© 2019 Altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

17. Explicação de Símbolos

Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>In vitro</i>
	Código do lote
	Cor cap
	Número de catálogo
	Conteúdo
	Número
	Componente
	Número de identificação de comércio internacional
	Consulte as instruções de utilização
	Contém o suficiente para “n” testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Atenção
	Nota
	Versão

Notas:

Notas:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

