



cobas[®] Cdiff Test

do użytku z systemem cobas[®] 4800

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*



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

SPIS TREŚCI

Zastosowanie	4
Podsumowanie i objaśnienie testu/zasady procedury	4
Informacje podstawowe: badanie przesiewowe pod kątem bakterii <i>C. difficile</i>	4
Objaśnienie testu	5
Zasady procedury	5
Przygotowanie próbek	5
Amplifikacja w reakcji PCR i detekcja metodą TaqMan®	6
Amplifikacja wybiórcza	6
Materiały, odczynniki i próbki	7
Dostarczane materiały i odczynniki	7
Przechowywanie i użytkowanie odczynników	7
Wymagane materiały dodatkowe	14
Materiały opcjonalne	15
Urządzenia i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane	15
Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania	15
Ostrzeżenia i środki ostrożności	15
Dobra praktyka laboratoryjna	16
Zanieczyszczenie	16
Integralność	16
Utylizacja	17
Rozlanie płynów i czyszczenie	17
Pobieranie, transport i przechowywanie próbek	17
Pobieranie próbek	17
Przechowywanie i trwałość próbek podczas transportu	17
Procedura testowa	18
Wykonywanie oznaczenia	18
Przebieg pracy	18
Instrukcja użytkowania	18

Wyniki	22
Kontrola jakości i ważność wyników	22
Kontrola dodatnia	22
Kontrola ujemna	22
Kontrola wewnętrzna	22
Interpretacja wyników	23
Lista flag wyników	24
Ograniczenia metody	24
Ocena skuteczności w badaniach nieklinicznych	26
Czułość analityczna	26
Detekcja genotypów bakterii <i>C. difficile</i>	26
Precyzja	28
Swoistość analityczna	29
Substancje wpływające na wynik testu	31
Skuteczność kliniczna z wykorzystaniem próbek klinicznych	33
Dodatkowe informacje	35
Najważniejsze cechy oznaczenia	35
Oznaczenia	36
Pomoc techniczna	37
Wytwórca i importer	37
Znaki towarowe i patenty	37
Prawo autorskie	37
Piśmiennictwo	38
Wersja dokumentu	40

Zastosowanie

Test **cobas®** Cdiff do stosowania z systemem **cobas®** 4800 to zautomatyzowany, jakościowy test diagnostyczny *in vitro*, wykorzystujący łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym do bezpośredniego wykrywania genu toksyny B (*tcdB*) szczepów toksynogennych *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) w próbkach (płynnych lub miękkich) nieufornowanego stolca pozyskanych od pacjentów, u których podejrzewa się zakażenie bakteriami *C. difficile* (CDI). Test **cobas®** Cdiff jest przeznaczony do stosowania jako wsparcie podczas diagnozowania zakażeń CDI u ludzi z uwzględnieniem klinicznych i epidemiologicznych czynników ryzyka.

Podsumowanie i objaśnienie testu/zasady procedury

Informacje podstawowe: badanie przesiewowe pod kątem bakterii *C. difficile*

C. difficile to Gram-dodatnie, beztlenowe, przetrwalnikujące laseczki, zidentyfikowane w późnych latach 70. jako czynnik etiologiczny rzekomobłoniastego zapalenia jelit związanego z antybiotykoterapią^{1,2}. Uważa się, że odpowiadają one za 15–20% przypadków biegunki wywołanej antybiotykoterapią oraz za praktycznie wszystkie przypadki rzekomobłoniastego zapalenia jelit związanego z przyjmowaniem antybiotyków³. W ciągu ostatniej dekady obserwowano stały wzrost częstości przypadków zakażeń wywołanych przez bakterie *C. difficile* (CDI), które obecnie stanowią istotny problem kliniczny w krajach rozwiniętych. Podczas gdy wskaźniki zachorowalności wynosiły 30–40 przypadków w 100 000 populacji szpitali specjalizujących się w leczeniu ostrych przypadków na terenie Stanów Zjednoczonych, częstość występowania wzrosła do ponad 80 przypadków na 100 000 osób w 2005 r.⁴. Opisywano już występowanie epidemii zakażeń CDI⁵. Bezpośredni koszt związany z zakażeniami CDI wyniósł 6326 USD na przypadek zachorowania na terenie Stanów Zjednoczonych⁶.

Za rosnącą częstość występowania odpowiada częściowo pojawienie się rzekomo hiperwirulentnego szczepu klasyfikowanego jako rybotyp 027/Amerika Północna, pulsotyp 1 (NAP1) i toksynotyp III. Toksynogenne szczepy *C. difficile* zwykle wytwarzają dwa rodzaje toksyn: toksynę A (enterotoksynę) i toksynę B (cytotoksynę)⁷. Niewielki odsetek szczepów wytwarza wyłącznie toksynę B⁸.

W ostatnich czasach opisywano rosnącą wirulencję szczepów wytwarzających inną toksynę, określaną mianem toksyny binarnej, i obciążonych delecją w genie negatywnego regulatora *tcdC*^{9,10}. Zgłaszano, że te ostatnie szczepy cechuje większa wirulencja *in vitro* i wyższa zachorowalność oraz umieralność u ludzi^{11,12}.

Po kolonizacji toksynogennym szczepem *C. difficile* pacjenci mogą pozostawać bezobjawowymi nosicielami lub zachorować na chorobę jelit. Cechy kliniczne zakażenia CDI mogą przyjmować postać od łagodnej biegunki do zagrażającego życiu rzekomobłoniastego zapalenia jelit, któremu towarzyszy ból brzucha, silna biegunka i objawy ogólnoustrojowe, takie jak gorączka, jadłowstręt, nudności i złe samopoczucie.

Rozpoznanie zakażenia CDI zwykle opiera się na wykazaniu obecności toksyny A i/lub B w próbkach stolca. Wykazanie występowania efektu cytopatycznego w monowarstwie komórek wynikającego z działania toksyny B jest uznawane przez wiele osób za „złoty standard”^{13, 14}. Wykazanie efektu cytopatycznego można osiągnąć przez bezpośrednią inkubację supernatantu stolca z monowarstwą komórek. Można również prowadzić hodowlę izolatów *C. difficile* w bulionie selektywnym, a uzyskany supernatant wykorzystać do inkubacji z monowarstwą komórek (hodowla toksynogenna)¹⁵. W przypadku obu technik końcowy wynik uzyskuje się po co najmniej 48–72 godzinach. Oznaczenia immunologiczne są powszechnie stosowane do detekcji toksyny A oraz B, ponieważ umożliwiają uzyskanie dodatniego wyniku w czasie krótszym niż 4 godziny. Jednak ich czułość jest znacząco niższa w porównaniu z hodowlą tkankową¹⁶. W porównaniu z klinicznymi kryteriami potwierdzającymi wystąpienie zakażenia CDI reakcję PCR cechuje czułość, swoistość oraz wartości predykcyjne wyników dodatnich i ujemnych wynoszące odpowiednio 93,3%, 97,4%, 75,5% oraz 99,4% z czasem oczekiwania <4 godzin¹⁵. Reakcja PCR jest uznawana za optymalny, szybki, pojedynczy test do wykrywania toksyny produkowanej przez bakterie *C. difficile*¹⁷⁻²⁰. Mimo dramatycznego wzrostu częstości zachorowań i nasilenia zakażeń CDI metronidazol lub wankomycyna pozostają leczeniem farmakologicznym z wyboru w przypadku epizodów ostrych i zakażeń nawracających²¹.

Do metod kontroli zakażeń należy rozważne stosowanie antybiotykoterapii, zapobieganie zakażeniom krzyżowym oraz aktywny nadzór nad przypadkami zachorowań²². Nie zaleca się powtarzania testu w celu potwierdzenia wyleczenia, ponieważ toksyny mogą być obecne w organizmie przez dłuższy czas bez dawania objawów klinicznych.

Z tego powodu istnieje wielka potrzeba wysoce czulej i szybkiej, zautomatyzowanej metody detekcji bakterii *C. difficile*. Metody molekularne oferują potencjał istotnego skrócenia czasu wykrywania, umożliwiając przez to szybkie rozpoczęcie leczenia przeciwbakteryjnego oraz wczesne wdrożenie metod kontroli zakażeń¹⁷⁻²⁰.

Objaśnienie testu

Test **cobas**® Cdiff obejmuje dwa główne procesy: (1) zautomatyzowane przygotowanie próbek w celu izolacji kwasów nukleinowych z próbek nieuformowanego stolca; (2) amplifikację docelowych sekwencji DNA w reakcji PCR z wykorzystaniem swoistych dla szczepów *C. difficile* primerów, a także detekcję w czasie rzeczywistym wyznakowanych fluorescencyjnie, rozszczepionych detekcyjnych sond oligonukleotydowych swoistych dla bakterii *C. difficile*. Przed rozpoczęciem zautomatyzowanego procesu przygotowania do wszystkich próbek dodawana jest kontrola wewnętrzna, zawierająca niepowiązaną, losową sekwencję DNA, poddawana amplifikacji i detekcji jednocześnie z każdą próbką w celu umożliwienia kontroli całego procesu.

Zasady procedury

Przygotowanie próbek

Przygotowanie próbek do testu **cobas**® Cdiff jest zautomatyzowane za pomocą aparatu **cobas**® x 480. Mikroorganizmy są poddawane lizie z użyciem czynnika chaotropowego, proteiny K oraz odczynnika SDS. Uwolnione kwasy nukleinowe, wraz z dodanym DNA stanowiącym kontrolę wewnętrzną, są wiązane z cząsteczkami magnetycznymi. Są one przepłukiwane, a następnie poddawane elucji w małej objętości buforu. Następnie aparat pobiera porcję materiału poddanego elucji i przygotowuje reakcję PCR z użyciem aktywowanego odczynnika Master Mix.

Amplifikacja w reakcji PCR i detekcja metodą TaqMan®

Etapy cykli reakcji PCR oraz detekcja docelowego sygnału zachodzą w analizatorze **cobas®** z 480. Odczynnik Master Mix zawiera pary primerów i sondy swoiste dla dwóch elementów docelowych: toksyny B oraz kontroli wewnętrznej. Jeśli docelowe sekwencje kwasu nukleinowego są obecne, dojdzie do amplifikacji z użyciem odpowiednich primerów oraz termostabilnej polimerazy DNA, co będzie skutkowało utworzeniem produktów reakcji PCR (amplikonu). Te produkty są wykrywane przez swoiste sondy TaqMan zawierające barwnik fluorescencyjny oraz wygaszacz. W stanie wyjściowym wygaszacz tłumi fluorescencję barwnika. Jednak w przypadku obecności produktu PCR sonda z nim hybrydyzuje i ulega rozszczepieniu na skutek działania polimerazy, która wykazuje aktywność nukleazy w kierunku od końca 5' do końca 3'. Ta reakcja umożliwia emisję fluorescencji z barwnika, a sygnał jest rejestrowany w czasie rzeczywistym w trakcie każdego cyklu reakcji PCR przez analizator **cobas®** z 480. Sygnał jest interpretowany przez oprogramowanie systemu **cobas®** 4800 i przedstawiany w postaci końcowych wyników.

Amplifikacja wybiórcza

Amplifikację wybiórczą badanego kwasu nukleinowego z próbki klinicznej przy użyciu testu **cobas®** Cdiff uzyskuje się dzięki zastosowaniu enzymu AmpErase (uracylo-N-glikozylazy) i trójfosforanu dezoksyurydyny (dUTP). Enzym AmpErase rozpoznaje i katalizuje niszczenie nici DNA zawierających dezoksyurydynę²³, lecz nie DNA zawierającego dezoksytymidynę. Dezoksyurydyny nie stwierdza się w występującym naturalnie DNA, natomiast jest ona zawsze obecna w amplikonie z uwagi na stosowanie trójfosforanu dezoksyurydyny zamiast trójfosforanu tymidyny jako jednego spośród dNTPs w odczynniku Master Mix; dlatego też jedynie amplikon zawiera dezoksyurydynę. Dezoksyurydyna powoduje wrażliwość zanieczyszczającego amplikonu na rozkład przez enzym AmpErase przed amplifikacją docelowego DNA. Zawarty w odczynniku Master Mix enzym AmpErase katalizuje rozszczepienie DNA zawierającego dezoksyurydynę w miejscu reszt dezoksyurydynowych przez otwarcie pierścienia dezoksyrybozy w pozycji C1. Podczas ogrzewania w pierwszym cyklu termicznym w pH zasadowym odczynnika Master Mix łańcuch amplikonu DNA pęka w pozycji dezoksyurydyny, w ten sposób wykluczając dalszą amplifikację DNA. Enzym AmpErase jest nieczynny w temperaturach powyżej 55°C, tj. w czasie trwania całego cyklu termicznego, dlatego też nie niszczy on amplikonu docelowego. Wykazano, że test **cobas®** Cdiff dezaktywuje na każdą reakcję PCR co najmniej 1000 kopii zawierającego dezoksyurydynę amplikonu *C. difficile*.

Materiały, odczynniki i próbki

Dostarczane materiały i odczynniki

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Zestaw do przygotowywania próbek w systemie cobas® 4800) 240 testów (P/N: 05235782190)	MGP (Magnetyczne szklane cząstki do systemu cobas® 4800) Magnetyczne szklane cząstki 93% izopropanolu ^b	10 × 4,5 ml	 NIEBEZPIECZEŃSTWO H225: Wysoce łatwopalna ciecz i pary. H319: Działa drażniąco na oczy. H336: Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy. P210: Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić. P233: Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty. P261: Unikać wdychania mgły lub par. P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy/ochronę słuchu. P303 + P361 + P353: W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): natychmiast zdjąć całą skażoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody. P370 + P378: W przypadku pożaru: użyć suchego piasku, proszku chemicznego lub środka pianotwórczego odpornego na działanie alkoholu do gaszenia. 67-63-0 Propan-2-ol
	EB (Bufor do elucji systemu cobas® 4800) Bufor Tris 0,09% azydku sodu	10 × 18 ml	ND

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Zestaw do przygotowywania próbek w systemie cobas® 4800) 960 testów (P/N: 05235804190)	MGP (Magnetyczne szklane cząstki do systemu cobas® 4800) Magnetyczne szklane cząstki 93% izopropanolu ^b	10 × 13,5 ml	 NIEBEZPIECZENSTWO H225: Wysoce łatwopalna ciecz i pary. H319: Działa drażniąco na oczy. H336: Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy. P210: Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić. P233: Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty. P261: Unikać wdychania mgły lub par. P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. P303 + P361 + P353: W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): natychmiast zdjąć całą skażoną odzież. Splukać skórę pod strumieniem wody. P370 + P378: W przypadku pożaru: użyć suchego piasku, proszku chemicznego lub środka pianotwórczego odpornego na działanie alkoholi do gaszenia. 67-63-0 Propan-2-ol
	EB (Bufor do elucji systemu cobas® 4800) Bufor Tris 0,09% azydku sodu	10 × 18 ml	ND

* Oznakowanie bezpieczeństwa produktu jest zgodne przede wszystkim z wytycznymi GHS UE.

** Substancja niebezpieczna.

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 240 testów (P/N: 06768253190)	LYS-1 (Bufor do lizy 1 systemu cobas® 4800) Cytrynian sodu 5% polidokanol ^b 42,6% tiocyjanian guanidyny ^b Ditiotreitol ^b	10 × 10 ml	 NIEBEZPIECZEŃSTWO H302: Działa szkodliwie po połknięciu. H314: Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu. H411: Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. EUH032: W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. EUH071: Działa żrąco na drogi oddechowe. P273: Unikać uwolnienia do środowiska. P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy/ochronę słuchu. P303 + P361 + P353: W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): natychmiast zdjąć całą skażoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody. P304 + P340 + P310: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. P305 + P351 + P338 + P310: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. P391: Zebrać wyciek. 593-84-0 Tiocyjanian guanidyny 9002-92-0 Polidokanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimerkaptobutano-2,3-diol
	PK (Proteinaza K systemu cobas® 4800) Bufor Tris EDTA Chlorek wapnia Octan wapnia < 2,0% proteinazy K ^b Gliceryna	10 × 0,9 ml	 NIEBEZPIECZEŃSTWO H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. H334: Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. P261: Unikać wdychania mgły lub par. P280: Stosować rękawice ochronne. P284: Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych. P304 + P340: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P342 + P311: W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. 39450-01-6 Proteinaza serynowa, <i>Tritirachium album</i>

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
	SDS (Odczynnik SDS systemu cobas® 4800) Bufor Tris Dodecylosiarczanu sodu 0,09% azydku sodu	10 × 3 ml	ND
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 960 testów (P/N: 06768270190)	LYS-1 (Bufor do lizy 1 systemu cobas® 4800) Cytrynian sodu 5% polidokanol ^b 42,6% tiocyjanian guanidyny ^b Ditiotreitol ^b	10 × 36 ml	 NIEBEZPIECZEŃSTWO H302: Działa szkodliwie po połknięciu. H314: Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu. H411: Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. EUH032: W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. EUH071: Działa żrąco na drogi oddechowe. P273: Unikać uwolnienia do środowiska. P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy/ochronę słuchu. P303 + P361 + P353: W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): natychmiast zdjąć całą skażoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody. P304 + P340 + P310: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. P305 + P351 + P338 + P310: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. P391: Zebrać wyciek. 593-84-0 Tiocyjanian guanidyny 9002-92-0 Polidokanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimerkaptobutano-2,3-diol

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
	PK (Proteinaza K systemu cobas® 4800) Bufor Tris EDTA Chlorek wapnia Octan wapnia < 2,0% proteinazy K ^b Gliceryna	20 × 1,2 ml	 NIEBEZPIECZEŃSTWO H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. H334: Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. P261: Unikać wdychania mgły lub par. P280: Stosować rękawice ochronne. P284: Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych. P304 + P340: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P342 + P311: W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. 39450-01-6 Proteinaza serynowa, <i>Tritirachium album</i>
	SDS (Odczynnik SDS systemu cobas® 4800) Bufor Tris Dodecylosiarczanu sodu 0,09% azydku sodu	10 × 9 ml	ND

* Oznakowanie bezpieczeństwa produktu jest zgodne przede wszystkim z wytycznymi GHS UE.

** Substancja niebezpieczna.

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 240 testów (P/N: 05235863190)	WB (Bufor płuczący systemu cobas® 4800) Cytrynian sodu dwuwodny 0,05% N-metyloizotiazolon HCl	10 × 55 ml	ND
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 960 testów (P/N: 05235871190)	WB (Bufor płuczący systemu cobas® 4800) Cytrynian sodu dwuwodny 0,05% N-metyloizotiazolon HCl	10 × 200 ml	ND
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 20 przebiegów (P/N: 06768318190)	IC-1 (cobas® 4800 IC-1) Bufor Tris EDTA < 0,01% poli-rA RNA (syntetycznego) 0,05% azydru sodu < 0,01% niezakaźnego, syntetycznego DNA do kontroli wewnętrznej, opłaszczanego białkiem kapsydowym bakteriofaga Lambda	20 × 0,5 ml	ND
cobas® 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit (Zestaw do amplifikacji/detekcji systemu cobas® 4800 Cdiff) 80 testów (P/N: 06768237190)	Cdiff MMX (Odczynnik Master Mix Cdiff systemu cobas®) Bufor trycynowy EDTA DMSO Octan potasu Wodorotlenek potasu Tween 20 < 0,19% dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0,01% roztworu starterów sensownych i antysensownych dla <i>C. difficile</i> oraz kontroli wewnętrznej < 0,01% roztworu znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym sond dla <i>C. difficile</i> oraz kontroli wewnętrznej < 0,01% aptameru oligonukleotydowego < 0,01% polimeraza DNA Z05 (bakteryjnej) < 0,02% enzym AmpErase (uracylo-N-glikozylaza) (bakteryjny) 0,09% azydru sodu	10 × 0,3 ml	ND

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
cobas® 4800 Cdiff Controls and Cofactor Kit (Zestaw kontroli i kofaktora Cdiff systemu cobas® 4800) 10 przebiegów (P/N: 06768300190)	Cdiff (+) C (Kontrola dodatnia Cdiff systemu cobas®) Bufor Tris EDTA < 0,01% poli-rA RNA (syntetycznego) 0,05% azydku sodu < 0,01% niezakaźnego plazmidu DNA (bakteryjnego) zawierającego sekwencję <i>C. difficile</i>	10 × 0,5 ml	ND
	(-) C (Kontrola ujemna systemu cobas® 4800) Bufor Tris EDTA 0,05% azydku sodu < 0,01% poli-rA RNA (syntetycznego)	10 × 0,5 ml	ND
	Cofactor-3 (Kofaktor 3 systemu cobas® 4800) Octan manganu Octan magnezu Albumina surowicy wołowej z osocza wołowego, pozyskana w Stanach Zjednoczonych 0,09% azydku sodu	10 × 1,7 ml	ND

* Oznakowanie bezpieczeństwa produktu jest zgodne przede wszystkim z wytycznymi GHS UE.

Przechowywanie i użytkowanie odczynników

Odczynnik	Temperatura przechowywania	Czas przechowywania
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Zestaw do przygotowywania próbek w systemie cobas® 4800)	2–8°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Zestaw do lizy 1 w systemie cobas® 4800)	2–8°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 (Zestaw kontroli wewnętrznej 1 systemu cobas® 4800)	2–8°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.
cobas® 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit (Zestaw do amplifikacji/detekcji systemu cobas® 4800 Cdiff)	2–8°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.
cobas® 4800 Cdiff Controls and Cofactor Kit (Zestaw kontroli i kofaktora Cdiff systemu cobas® 4800)	2–8°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Zestaw buforu płuczącego do systemu cobas® 4800)	15–25°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.

Uwaga: Nie należy zamrażać odczynników.

Datę ważności odczynników określono w oparciu o skoordynowany czas uniwersalny (UTC). Lokalny czas ważności odczynników można określić, dodając lub odejmując maksymalnie 12 godzin w zależności od czasu miejscowego w odniesieniu do czasu UTC.

Wymagane materiały dodatkowe

Materiały	P/N
Końcówki CORE, 1000 µl, statyw zawierający 96 sztuk	04639642001
Pojemnik na odczynnik 50 ml	05232732001
Pojemnik na odczynnik 200 ml	05232759001
Płytki (głębokodołkowe) do ekstrakcji w systemie cobas® 4800	05232716001
Płytki AD 0,3 ml (z mikrodołkami) i folia uszczelniająca systemu cobas® 4800	05232724001
Aplikator folii uszczelniającej	04900383001
Nośnik 24-pozycyjny	04639502001
Worek na odpady stałe	05530873001 (mały) lub 04691989001 (duży)
Plastikowa zsuwnia Hamilton STAR	04639669001
cobas® PCR Media and Swab Sample Kit	07051891190
cobas® PCR Media Uni Swab Sample Kit	07958030190
Rękawice jednorazowe bezpudrowe	Akceptowalne są jakiegokolwiek bezpudrowe rękawice jednorazowe.
Mieszadło wibracyjne (do mieszania jednej próbki)	Akceptowalne jest dowolne mieszadło wibracyjne.
Wirówka laboratoryjna, wyposażona w bęben wirówki o minimalnej wartości RCF równej 1500	Akceptowalna jest dowolna wirówka spełniająca te wymagania.

W celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących materiałów sprzedawanych oddzielnie prosimy o kontakt z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche.

Materiały opcjonalne

Materiały	P/N
Maty zamykające lub pokrywa płytki głębokodołkowej	Roche 04789288001 lub Hamilton 6474-01
Korki, bezbarwne (do ponownego zamykania przetworzonych próbek pierwotnych)	Roche P/N 07958056190; do ponownego zamykania przetworzonych próbek w okrągłodennych probówkach 13 ml

W celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących materiałów opcjonalnych prosimy o kontakt z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche.

Urządzenia i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane

Wymagane urządzenia i oprogramowanie, lecz niedostarczane
System cobas ® 4800 Aparat cobas ® x 480 Analizator cobas ® z 480 Jednostka sterująca
Oprogramowanie cobas ® Cdiff AP systemu cobas ® 4800 w wersji 1.0.1 lub nowsze
Oprogramowanie aplikacyjne (podstawowe) systemu cobas ® 4800 w wersji 2.2.0 lub nowsze

W celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących materiałów sprzedawanych oddzielnie prosimy o kontakt z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche.

Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Podobnie jak w przypadku każdej procedury testowej, dla prawidłowego przeprowadzenia badania kluczowe znaczenie ma zachowanie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej. Z uwagi na wysoką czułość analityczną niniejszego testu należy przedsięwziąć wyjątkową ostrożność, używając odczynników, próbek oraz mieszanin do amplifikacji, aby zapobiec zanieczyszczeniu.

- Do stosowania wyłącznie w diagnostyce *in vitro*.
- Należy unikać mikrobiologicznego i przez DNA zanieczyszczenia odczynników i próbek.
- Karty charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) są dostępne na żądanie w miejscowym przedstawicielstwie firmy Roche.
- Odczynnik LYS-1 zawiera tiocyjanian guanidyny. Nie dopuścić do bezpośredniego kontaktu między tiocyjanianem guanidyny i podchlorynem sodu (wybielacz) ani innymi wysoce reaktywnymi odczynnikami, takimi jak kwasy lub zasady. Takie mieszaniny mogą wydzielać trujące gazy.
- Odczynnik MGP zawiera izopropanol i jest wysoce łatwopalny. Należy przechowywać go z dala od otwartego ognia i potencjalnych źródeł isker.
- Nie wolno narażać odczynnika MGP na działanie źródeł pola magnetycznego.
- Odczynniki EB, Cdiff MMX, SDS, Cofactor-3, (–)C, Cdiff (+)C oraz IC-1 zawierają azydek sodu.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności oraz procedury mające na celu zredukowanie ryzyka zakażenia, dotyczące aparatu **cobas**® x 480 lub analizatora **cobas**® z 480 można

znaleźć w podręczniku użytkownika systemu **cobas® 4800 System**. W przypadku podejrzenia wystąpienia zanieczyszczenia należy przeprowadzić czyszczenie oraz konserwację tygodniową zgodnie z opisem zamieszczonym w podręczniku użytkownika systemu **cobas® 4800 System**.

- Należy poinformować lokalny właściwy organ oraz producenta o wszelkich poważnych zdarzeniach, które mogą wystąpić podczas stosowania tego testu.

Uwaga: Szczegółowe instrukcje zamieszczono w części „Pobieranie, transport i przechowywanie próbek”.

Dobra praktyka laboratoryjna

- Nie należy pipetować za pomocą ust.
- Nie wolno jeść, pić ani palić w obszarach roboczych laboratorium.
- Po zakończeniu pracy z próbkami i odczynnikami testowymi należy dokładnie umyć ręce.
- Podczas pracy z jakimikolwiek odczynnikami należy używać osłon na oczy oraz fartuchów laboratoryjnych i rękawic jednorazowych. Należy unikać kontaktu wymienionych materiałów ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, miejsce jego wystąpienia należy natychmiast spłukać dużą ilością wody. Jeżeli nie zostaną podjęte odpowiednie działania lecznicze, może dojść do oparzeń. W razie rozlania przed wytarciem należy rozcieńczyć wodą.
- Dokładnie oczyścić i odkazić wszystkie laboratoryjne powierzchnie robocze świeżo przygotowanym roztworem 0,5% podchlorynu sodu w wodzie destylowanej lub dejonizowanej (rozcieńczyć domowy wybielacz w stosunku 1:10). Następnie należy przetrzeć powierzchnię 70% etanolem.

Zanieczyszczenie

- W celu zapobieżenia zanieczyszczeniu konieczne jest noszenie rękawic i ich zmiana pomiędzy pracą z próbkami i odczynnikami testu **cobas® Cdiff**. Podczas pracy z próbkami i kontrolami należy unikać zanieczyszczenia rękawic. Podczas obchodzenia się z próbkami i zestawem odczynników należy nosić jednorazowe rękawice, fartuchy laboratoryjne oraz osłonę oczu.
- Należy unikać mikrobiologicznego i przez rybonukleazy zanieczyszczenia odczynników.
- Jeżeli w trakcie obchodzenia się z próbkami i ich przetwarzania nie jest możliwa odpowiednia kontrola przeniesienia między próbkami, może dojść do wystąpienia wyników fałszywie dodatnich.
- Z próbkami należy obchodzić się tak jak z materiałem zakaźnym, stosując laboratoryjne procedury bezpieczeństwa, takie jak określone w dokumentach: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*²⁴ oraz CLSI Document M29-A4²⁵.

Integralność

- Nie wolno używać zestawów po upływie daty ważności.
- Nie należy poddawać odczynników pulowaniu.
- Nie wolno używać przedmiotów jednorazowego użytku po upływie daty ważności.
- Nie należy używać odczynników ani pojemników, które są widocznie uszkodzone lub wykazują oznaki wycieku.

- Wszystkie przedmioty jednorazowego użytku są przeznaczone do jednokrotnego użycia. Nie wykorzystywać ponownie.
- Całe wyposażenie powinno być odpowiednio konserwowane, zgodnie z instrukcjami producenta.

Utylizacja

- Odczynniki systemu **cobas**® 4800 oraz odczynniki swoiste dla testu **cobas**® Cdiff zawierają azydek sodu (patrz rozdział „**Ostrzeżenia i środki ostrożności**”). Azydek sodu może reagować z instalacjami wodno-kanalizacyjnymi wykonanymi z ołowiu lub miedzi, tworząc silnie wybuchowe azydki metali. Usuwając roztwory zawierające azydek sodu do zlewów laboratoryjnych, należy przepłukać rury dużą ilością zimnej wody, aby zapobiec nagromadzeniu azydków.
- Należy wyrzucić wszystkie nieużyte odczynniki, postępując zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi.

Uwaga: Informacje dotyczące usuwania odpadów płynnych zamieszczono w podręczniku użytkownika systemu **cobas® 4800 System.**

Rozlanie płynów i czyszczenie

- Odczynnik LYS-1 zawiera tiocyjanian guanidyny. Jeśli płyn zawierający tiocyjanian guanidyny ulegnie rozlaniu, do czyszczenia należy używać odpowiedniego detergentu laboratoryjnego i wody. Jeśli rozlany płyn zawiera potencjalne czynniki zakaźne, do czyszczenia należy **NAJPIERW** używać detergentu laboratoryjnego i wody, a następnie 0,5% roztworu podchlorynu sodu.
- Jeśli do rozlania płynu dojdzie na powierzchni aparatu **cobas**® 4800, należy postępować zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w Podręczniku użytkownika systemu **cobas**® 4800.
- Do czyszczenia aparatu **cobas**® x 480 lub analizatora **cobas**® z 480 nie wolno używać roztworu podchlorynu sodu (wybielacz). Czyszczenia aparatu **cobas**® x 480 lub analizatora **cobas**® z 480 należy dokonywać zgodnie z procedurami opisanymi w odpowiednim podręczniku użytkownika systemu **cobas**® 4800 System.

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

Uwaga: Ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się jak z materiałem potencjalnie zakaźnym.

Pobieranie próbek

Próbkę nieuformowanego stolca należy pobrać do jałowego pojemnika. Próbkę należy pobierać zgodnie z procedurą określoną w standardowych procedurach roboczych placówki.

Przechowywanie i trwałość próbek podczas transportu

Próbki nieuformowanego stolca zachowują trwałość w temperaturze 2–30°C przez 2 dni lub w temperaturze 2–8°C przez 7 dni bądź –20°C przez 60 dni przed przeprowadzeniem oznaczenia w systemie **cobas**® 4800 (wykazano to przez oznaczanie próbek po przechowywaniu kolejno w temp. 30°C ±1°C przez 2 dni, w temp. 2–8°C przez 5 dni, a następnie w temp. –20°C przez 60 dni).

Próbki stolca wymieszane z podłożem PCR **cobas**® zachowują trwałość w temperaturze 2–8°C przez 60 dni lub w temperaturze 30°C przez 7 dni przed wykonaniem oznaczenia w systemie **cobas**® 4800.

Próbki bakterii *C. difficile* muszą być transportowane zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi dotyczącymi transportu czynników etiologicznych.

Procedura testowa

Wykonywanie oznaczenia

Przebieg pracy

Rysunek 1: Przebieg pracy z użyciem testu cobas® Cdiff

1	Uruchomienie systemu.
2	Wykonanie czynności konserwacyjnych w odniesieniu do aparatu.
3	Wyjęcie próbek i odczynników z miejsca przechowywania.
4	Rozpoczęcie przebiegu: Umieszczenie nośników z próbkami.
5	W przypadku korzystania z systemu LIS: potwierdzenie zlecenia pracy. W przypadku braku systemu LIS: utworzenie zlecenia pracy.
6	Umieszczenie materiałów eksploatacyjnych (płytki głębokodołkowej, płytki mikrodołkowej, statywów na końcówki) i odczynników.
7	Rozpoczęcie przebiegu przygotowania próbek.
8	Wyjęcie i uszczelnienie płytki mikrodołkowej.
9	Wyjęcie próbek, zużytych odczynników i płytki głębokodołkowej.
10	Umieszczenie płytki mikrodołkowej w analizatorze.
11	Przeanalizowanie wyników.
12	W przypadku korzystania z systemu LIS: przesłanie wyników do systemu LIS.
13	Wyjęcie płytki z analizatora.

Instrukcja użytkowania

Wszystkie odczynniki, poza odczynnikami Cdiff MMX i Cofactor-3, przed załadowaniem do aparatu cobas® x 480 muszą znajdować się w temperaturze pokojowej. Odczynniki Cdiff MMX i Cofactor-3 można umieszczać w aparacie bezpośrednio z temperatury przechowywania 2–8°C, ponieważ ich temperatura zostanie wyrównana do temperatury otoczenia wewnątrz aparatu cobas® x 480 podczas procesu przetwarzania.

Uwaga: Szczegółowe instrukcje obsługi można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu cobas® 4800 System.

Wielkość przebiegu

W systemie cobas® 4800 można prowadzić jednocześnie testy cobas® MRSA/SA, cobas® Cdiff oraz cobas® HSV 1 i 2 w ramach połączenia różnych partii w tym samym przebiegu. Ogólny zestaw do przygotowywania próbek w systemie cobas® 4800, ogólny zestaw do lizy 1 w systemie cobas® 4800 oraz ogólny zestaw buforu płuczącego do systemu cobas® 4800 są dostępne w dwóch wielkościach, z których każda wystarcza na 10 przebiegów zawierających do 24 lub 96 próbek włączając kontrole

i próbki dla wszystkich oznaczeń do przeprowadzenia. Zestaw do amplifikacji/detekcji Cdiff w systemie **cobas® 4800** wystarcza do przeprowadzenia analizy maksymalnie 80 próbek obejmujących kontrolę Cdiff oraz próbki do oznaczenia. Zależnie od potrzeb w jednym przebiegu można wykorzystać kilka fiolek odczynnika **cobas® 4800 Cdiff Master Mix** pod warunkiem, że pochodzą one z zestawów o tym samym rozmiarze. Ogólny zestaw kontroli wewnętrznej 1 systemu **cobas® 4800** oraz zestaw kontroli i kofaktora Cdiff systemu **cobas® 4800** są dostępne w zestawie o jednym rozmiarze, który może zostać wykorzystany we wszystkich konfiguracjach przebiegu. Na każdy przebieg zawierający próbki *C. difficile* należy użyć jedną dodatnią kontrolę Cdiff systemu **cobas® 4800** i jedną kontrolę ujemną systemu **cobas® 4800** (patrz rozdział „**Kontrola jakości**”). W przypadku przebiegu z jednym testem maksymalna dopuszczalna liczba próbek to 94 próbki pacjentów i 2 kontrole.

Uwaga: Chociaż nie stanowi to optymalnego użycia odczynników, w przebiegu zawierającym łącznie 1–22 próbek można użyć odczynnika ogólnego zestawu 96 testów. Jednak nie można łączyć ze sobą różnych wielkości zestawu buforu płuczącego (WB) systemu **cobas® 4800**, zestawu do przygotowywania próbek w systemie **cobas® 4800** oraz zestawu do lizy 1 w systemie **cobas® 4800**. Przykładowo, jeśli na początku przebiegu skanowana jest butelka z odczynnikiem WB z zestawu 96 testów, należy użyć odczynników z pozostałych dwóch zestawów również o rozmiarze 96 testów.

Przebieg pracy

Test **cobas® Cdiff** to oznaczenie prowadzone z wykorzystaniem przebiegu pracy Full Workflow w ramach oprogramowania **cobas® 4800**. Obejmuje on przygotowanie próbek w aparacie **cobas® x 480** oraz amplifikację/detekcję w analizatorze **cobas® z 480**. Przebieg może obejmować tylko oznaczenie Cdiff lub dodatkowo testy **cobas® MRSA/SA** i/lub **cobas® HSV 1** oraz 2 w ramach połączenia różnych partii. Szczegóły można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu **cobas® 4800 System**.

Przenoszenie próbek do probówek z podłożem **cobas® PCR**

1. Użyj **jednej** poliestrowej wymazówki do przeniesienia stolca do probówki z podłożem **cobas® PCR**. Wyrzuć drugą wymazówkę znajdującą się w opakowaniu (jeśli dotyczy). Nie dotykając ścianek pojemnika ze stolcem, zanurz całkowicie końcówkę wymazówki w próbce stolca, aż do końca stożkowej części, a następnie szybko ją wyjmij i umieść wymazówkę z inokulatem w probówce z podłożem **cobas® PCR**. Nie należy wykonywać oznaczenia, jeśli ilość próbki stolca nie umożliwi całkowitego zanurzenia końcówki wymazówki.

2. Przyciskając trzonek wymazówki do ściany probówki, przełam go w miejscu szarego oznaczenia nacięcia. Zamknij probówkę korkiem i zworteksuj przez co najmniej 5 sekund. Zdejmij korek i umieść probówkę (probówki) w 24-pozycyjnym nośniku próbek w celu przetworzenia. Wyrzuć korki.

Uwaga: Test **cobas® Cdiff** został zatwierdzony do stosowania w połączeniu z zestawem **cobas® PCR Media Kit**, z zestawem do pobierania próbek z wymazówką pojedynczą i podłożem **cobas® PCR Media Uni Swab Sample Kit** oraz z zestawem do pobierania próbek z dwiema wymazówkami i podłożem **cobas® PCR Media Dual Swab Sample Kit**. Nie należy korzystać z innych rodzajów urządzeń i podłoży.

Uwaga: Do przenoszenia stolca należy korzystać wyłącznie z jednej poliestrowej wymazówki. Przeniesienie do probówki z podłożem **cobas® PCR** nadmiaru stolca może spowodować powstanie grudek i/lub uzyskanie nieważnych wyników.

Uwaga: Próbkę stolca należy przenieść do probówek z podłożem cobas® PCR oznakowanych odpowiednim kodem kreskowym umożliwiającym przetwarzanie w aparacie cobas® x 480. W celu uzyskania informacji na temat procedur właściwego kodowania kreskowego należy zapoznać się z podręcznikiem użytkownika systemu cobas® 4800 oraz listą kodów kreskowych dopuszczalnych dla systemu cobas® 4800.

Uwaga: Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego zawiesziny próbek stolca w podłożu cobas® PCR, do ponownego zamykania probówek po przetworzeniu należy używać dodatkowych korków do pojemników na próbki w podłożu cobas® PCR w innym kolorze (bezbarnych; patrz rozdział „Materiały opcjonalne”).

Uwaga: Objętość podłoża cobas® PCR wystarcza do przeprowadzenia kilkakrotnych oznaczeń próbek zawiesziny stolca w systemie cobas® 4800. Minimalna objętość zawiesziny stolca konieczna do przeprowadzenia przebiegu testu cobas® Cdiff to 3 ml w probówce z pożywką cobas® PCR.

Wykonywanie testu cobas® Cdiff

Uwaga: Możliwe jest przeprowadzenie testów cobas® MRSA/SA oraz cobas® Cdiff i/lub cobas® HSV 1 oraz 2 w ramach połączenia różnych partii w tym samym przebiegu. Dodatkowe informacje, patrz podręcznik użytkownika systemu cobas® 4800 System.

1. Uruchom system i wykonaj procedury konserwacyjne, postępując zgodnie z instrukcjami opisanymi w podręczniku użytkownika systemu **cobas® 4800 System**.
2. Zgromadź wszystkie wymagane odczynniki i materiały eksploatacyjne. W momencie rozpoczęcia przebiegu odczynniki, z wyjątkiem odczynników **cobas® Cdiff MMX** oraz Cofactor-3, muszą mieć temperaturę pokojową.

Uwaga: Wszystkie odczynniki i pojemniki na odczynniki są opatrzone kodem kreskowym i są przeznaczone do jednokrotnego użycia. Oprogramowanie cobas® 4800 śledzi użycie odczynników oraz pojemników na odczynniki i odrzuca wcześniej używane odczynniki lub pojemniki na odczynniki.

3. Rozpocznij nowy przebieg i zdefiniuj dla niego zlecenie pracy. Zlecenie pracy można utworzyć na trzy sposoby:
 - Korzystając z edytora próbki przed umieszczeniem statywu z próbkami w aparacie **cobas® x 480** (przycisk „Editor” po prawej stronie menu głównego). Zlecenia pracy można zapisać, edytować i wczytać ponownie w razie potrzeby.
 - Przez skorzystanie z kreatora oprogramowania dla nowego przebiegu i umieszczenie próbek w aparacie **cobas® x 480** po wyświetleniu takiego polecenia. Kody kreskowe próbek zostaną automatycznie zeskanowane i konieczne będzie zdefiniowanie żądanych wyników dla każdej próbki.
 - Przez skorzystanie z systemu LIS placówki.

Dodatkowe szczegóły można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu **cobas® 4800 System**. Podczas wybierania żądanych wyników należy zaznaczyć opcję „Cdiff”.

4. Umieść próbki i zdefiniuj/wybierz zlecenie pracy lub skorzystaj z systemu LIS, zależnie od tego co będzie właściwe. Domyślnie zaznaczona jest opcja „Unload sample carriers after transferring to deep well plate”. Umożliwia to operatorowi pozyskanie pozostałych próbek zawiesziny stolca tak szybko jak to możliwe po pobraniu z nich porcji na potrzeby przetwarzania w aparacie **cobas® x 480**. Jeśli konieczne jest przechowywanie, pojemniki z zawiesiną stolca należy zamknąć nowym korkiem (patrz rozdział „Materiały opcjonalne”).

5. Postępuj zgodnie ze wskazówkami kreatora oprogramowania i załaduj materiały eksploatacyjne. Nie należy umieszczać pojedynczych końcówek ani ich wyjmować z częściowo wykorzystanego statywu, gdyż oprogramowanie śledzi liczbę pozostałych końcówek. Jeśli liczba końcówek będzie niewystarczająca do przeprowadzenia przebiegu, oprogramowanie poinformuje o tym fakcie użytkownika.
6. Załaduj odczynniki do przygotowywania próbek do pojemników na odczynniki opatrzonych kodem kreskowym. Pojemniki na odczynniki są dostępne w dwóch rozmiarach: 200 ml i 50 ml. Postępuj zgodnie ze wskazówkami kreatora oprogramowania w celu wybrania pojemnika na odczynniki odpowiednich rozmiarów. Kody kreskowe pojemnika na odczynniki muszą znajdować się po prawej stronie nośnika. Załaduj odczynniki do przygotowywania próbek, stosując metodę „zeskanuj, zeskanuj, włóż, umieść”:
 - Zeskanuj kod kreskowy butelki odczynnika.
 - Zeskanuj kod kreskowy pojemnika na odczynniki.
 - Włóż odczynnik do pojemnika.
 - Umieść wypełniony pojemnik na odczynniki w przypisanej mu pozycji w nośniku na odczynniki.

Uwaga: System cobas® 4800 ma wewnętrzny zegar, kontrolujący czas, przez jaki odczynniki znajdują się w systemie. Od momentu zeskanowania WB jest 1 godzina do zakończenia procesu ładowania i kliknięcia przycisku „Start”. Na zakładce „Workplace” wyświetlany jest zegar odliczający czas. System nie zezwoli na rozpoczęcie przebiegu, jeżeli czas wyświetlany przez zegar aparatu upływał.

Uwaga: Aby zapewnić właściwe przeniesienie odczynnika MGP, zworteksuj lub energicznie wstrząśnij fiolkę odczynnika MGP niezwłocznie przed umieszczeniem jej w pojemniku na odczynniki.

7. Umieść odczynniki do amplifikacji/detekcji (Cdiff MMX oraz Cofactor-3), proteinazę K (PK) i kontrole [Cdiff (+) C, IC oraz (–) C] bezpośrednio w nośniku na odczynniki. W celu zapobieżenia zanieczyszczeniu konieczna jest zmiana rękawiczek po pracy z kontrolami dodatkimi.

Uwaga: Kreator oprogramowania obliczy optymalną ilość i wielkość zestawu odczynnika MMX cobas® Cdiff do użycia. Zostanie to odzwierciedlone w kolumnie „Kit size” na ekranie umieszczania odczynników MMX i Cofactor. Aby użyć odczynnika MMX cobas® Cdiff z zestawu o innym rozmiarze, kliknij przycisk „Change kit size”.

8. Rozpocznij przygotowanie próbek, klikając przycisk „Start Run”.
9. Po pomyślnym przebiegu przygotowania próbek przyciski „Sample Preparation results” oraz „Unload” staną się dostępne. W razie potrzeby wybierz przycisk „Sample Preparation results” w celu przeanalizowania wyników, a następnie wybierz przycisk „Unload”, aby wyładować nośniki na płytki. Można również wybrać przycisk „Unload” w celu wyładowania nośnika na płytki bez przeglądania wyników. Patrz podręcznik użytkownika systemu cobas® 4800 System.
10. Aby uszczelnić płytkę z mikrodołkami, przenieść płytkę do analizatora cobas® z 480 i rozpocząć cykl pracy amplifikacji i detekcji, postępuj zgodnie z instrukcją opisaną w podręczniku użytkownika systemu cobas® 4800.

Uwaga: System cobas® 4800 ma wewnętrzny zegar, kontrolujący czas, jaki upływa od momentu dodania przygotowanych próbek do aktywowanego odczynnika Master Mix. Amplifikację i detekcję należy rozpocząć jak najszybciej, jednak nie później niż 90 minut od zakończenia przebiegu w aparacie cobas® x 480. Na zakładce „Workplace” wyświetlany jest zegar odliczający czas. System przerwie przebieg, jeżeli ten czas zostanie przekroczony.

11. Po zakończeniu procesu amplifikacji i detekcji wyładuj płytkę mikrodołkową z analizatora **cobas®** z 480.
12. Aby przeglądać i akceptować poszczególne wyniki, postępuj zgodnie z instrukcją opisaną w podręczniku użytkownika systemu **cobas®** 4800.

Wyniki

Kontrola jakości i ważność wyników

Każdy przebieg obejmuje jeden zestaw kontroli dodatniej i ujemnej testu **cobas®** Cdiff. W przypadku każdego przebiegu, aby przez oprogramowanie **cobas®** 4800 zostały wyświetlone możliwe do zaraportowania wyniki testu **cobas®** Cdiff, muszą zostać uzyskane ważne wyniki zarówno dla kontroli dodatniej, jak i ujemnej.

Kontrola dodatnia

Kontrola dodatnia Cdiff (+) zawiera niezakaźny DNA plazmidowy bakterii *C. difficile*. Użycie kontroli Cdiff (+) umożliwia monitorowanie etapów izolacji kwasu nukleinowego, amplifikacji i detekcji w danym przebiegu. Wynik kontroli Cdiff (+) musi być oznaczony jako „Valid”. Jeżeli wyniki kontroli Cdiff (+) są stale nieważne, skontaktuj się z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche w celu uzyskania pomocy technicznej.

Kontrola ujemna

Wynik kontroli (–) musi być oznaczony jako „Valid”. Jeżeli wyniki kontroli (–) są stale nieważne, skontaktuj się z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche w celu uzyskania pomocy technicznej.

Kontrola wewnętrzna

Kontrola wewnętrzna to rekombinowany fag lambda zawierający sekwencje losowe oraz docelowe dla swoistych dla kontroli wewnętrznej primerów i sondy. Kontrola wewnętrzna jest dodawana do wszystkich próbek oraz kontroli dodatniej i ujemnej podczas przygotowywania próbek w aparacie **cobas®** x 480. Użycie kontroli wewnętrznej umożliwia monitorowanie etapów izolacji kwasu nukleinowego, amplifikacji i detekcji dla danej próbki. Kontrola wewnętrzna jest również wymagana do określania ważności kontroli danego przebiegu.

Interpretacja wyników

Uwaga: Cały proces walidacji testu i przebiegu jest realizowany przez oprogramowanie cobas® 4800.

Uwaga: Ważny przebieg może obejmować zarówno ważne, jak i nieważne wyniki próbek.

W przypadku ważnego przebiegu wyniki badania próbek interpretuje się w sposób, który przedstawia Tabela 1.

Tabela 1 Interpretacja wyników testu cobas® Cdiff

Test cobas® Cdiff	Raport wyniku i jego interpretacja
POS Cdiff	Wynik dodatni dla Cdiff Wynik badania próbki na obecność DNA <i>C. difficile</i> jest dodatni.
NEG Cdiff	Wynik ujemny dla Cdiff* DNA <i>C. difficile</i> , jeśli jest obecne, mogło nie zostać wykryte.
Invalid	Wynik nieważny Wynik testu jest nieważny. W celu otrzymania ważnego wyniku ponownie przeprowadź test oryginalnej próbki. Umieść nowy korek na probówce z zawiesiną stolca, w przypadku której uzyskano nieważny wynik, i zworteksuj przez co najmniej 5 sekund. Dodaj 0,5 ml wymieszanej zawiesiny stolca do nowej probówki z pożywką cobas® PCR. Zamknij probówkę z rozcieńczoną zawiesiną i zworteksuj przez co najmniej 5 sekund. Zdejmij korek i umieść probówkę z rozcieńczoną zawiesiną w 24-pozycyjnym nośniku próbek w celu przetworzenia.
Failed	Brak wyników dla próbki Instrukcje dotyczące przeglądania znaczników cyklu pracy i zalecanych czynności można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu cobas® 4800. W rzadkich przypadkach wystąpienia błędu podczas pipetowania (np. z powodu grudki lub innej niedrożności) należy oryginalną probówkę z zawiesiną stolca zamknąć nowym korkiem i umieścić w wirówce. Rozpędź wirówkę do 1800 RCF (lub 1800 × g) i zatrzymaj. Dopilnuj, aby probówka nie była wstrząsana ani nie została wymieszana po wirowaniu. Zdejmij korek i umieść probówkę z zawiesiną w 24-pozycyjnym nośniku próbek w celu przetworzenia.

* Wynik ujemny nie wyklucza obecności DNA *C. difficile*, ponieważ wyniki są zależne od odpowiedniego pobrania próbki, braku inhibitorów oraz obecności DNA w ilości umożliwiającej wykrycie.

Nieważne wyniki mogą zostać uzyskane, jeśli próbka zawiera nadmiar stolca lub substancje hamujące, które uniemożliwiają izolację docelowego kwasu nukleinowego i/lub amplifikację oraz detekcję. Znane substancje wpływające na wynik testu zamieszczono w rozdziale „Ograniczenia metody”.

Uwaga: Minimalna objętość zawiesiny stolca wymagana do przeprowadzenia testu cobas® Cdiff to 3 ml.

Lista flag wyników

Tabela poniżej wymienia flagi dotyczące interpretacji wyniku.

Tabela 2 Lista flag dla testów **cobas® Cdiff**

Test cobas® Cdiff	Test cobas® Cdiff	Raport wyniku i jego interpretacja
R20	Wynik dla kontroli dodatniej jest błędny.	Kontrola zewnętrzna jest nieważna. 1. Powtórz cały przebieg ze świeżymi odczynnikami. 2. Jeżeli problem powtarza się, skontaktuj się z serwisem firmy Roche.
R21	Wynik dla kontroli ujemnej jest błędny.	Kontrola zewnętrzna jest nieważna. 1. Powtórz cały przebieg ze świeżymi odczynnikami. 2. Jeżeli problem powtarza się, skontaktuj się z serwisem firmy Roche.
X3	Błąd: Wykryto skrzep. Próbka nie została przetworzona.	Upewnij się, że próbki obsługiwano zgodnie z opisem przebiegu pracy. 1. Sprawdź próbkę pod kątem skrzepów. 2. Ponownie oznacz próbkę.
X4	Błąd: Wystąpił błąd pipetowania. Próbka nie została przetworzona.	Najbardziej prawdopodobną przyczyną jest niewystarczająca objętość próbki lub błąd mechaniczny podczas pipetowania. 1. Upewnij się, że jest dostępna wystarczająca objętość próbki. 2. Sprawdź, czy płytka zrzucająca końcówkę jest umieszczona prawidłowo. 3. Ponownie oznacz próbkę.

Ograniczenia metody

1. Test **cobas® Cdiff** został zatwierdzony do użycia wyłącznie z próbkami nieuformowanego stolca przeniesionymi do podłoża **cobas® PCR** zgodnie z informacjami zamieszczonymi w niniejszej instrukcji.
2. Uzyskanie wiarygodnych wyników zależy od właściwego pobrania próbki, transportu, przechowywania oraz przetwarzania. Należy postępować zgodnie z procedurami opisanymi w niniejszej instrukcji użytkownika (określonej również mianem ulotki dołączonej do opakowania) oraz w podręczniku użytkownika systemu **cobas® 4800 System**.
3. Możliwość wykrycia DNA *C. difficile* zależy od liczby mikroorganizmów znajdujących się w próbce i mogą na nią wpływać metody pobierania/przetwarzania próbek, hospitalizacje w wywiadzie, schemat antybiotykoterapii i szczepy *C. difficile*.
4. Wyniki fałszywie ujemne lub nieważne mogą wynikać z wpływu różnych substancji. Do testu **cobas® Cdiff** dołączona jest kontrola wewnętrzna, aby pomóc w identyfikacji próbek zawierających substancje mogące zakłócać izolację kwasu nukleinowego i amplifikację w trakcie reakcji PCR. Niektóre czynniki wpływające na wyniki testu są następujące:
 - Probki zawierające powyżej 25% (udział wagowo-objętościowy) śluzu mogą dawać wyniki fałszywie ujemne.
5. Wynik dodatni wskazuje na obecność DNA *C. difficile*, jednak niekoniecznie potwierdza występowanie żywych mikroorganizmów. Z tego powodu wynik dodatni niekoniecznie musi wskazywać na niepowodzenie leczenia zakażenia.
6. Mutacje lub zmiany polimorficzne w obszarach wiązania primerów lub sond mogą wpływać na wykrywanie nowych lub nieznanych wariantów, co może skutkować uzyskaniem fałszywie ujemnego wyniku testu **cobas® Cdiff**.

7. Wartość predykcyjna oznaczenia zależy do częstości występowania choroby w danej populacji.
8. Dodanie do odczynnika Master Mix **cobas**® 4800 Cdiff enzymu AmpErase umożliwia selektywną amplifikację docelowego DNA; jednak aby uniknąć zanieczyszczenia odczynników i mieszanin amplifikacyjnych, konieczne jest stosowanie dobrej praktyki laboratoryjnej i dokładne przestrzeganie procedur wyszczególnionych w niniejszej instrukcji.
9. Tego produktu mogą używać wyłącznie osoby przeszkolone w zakresie technik PCR i używania systemu **cobas**® 4800.
10. Zatwierdzono użycie tego produktu tylko z aparatem **cobas**® x 480 i analizatorem **cobas**® z 480. Z tym produktem nie można stosować żadnych innych urządzeń do przygotowania próbek ani systemów do PCR.
11. Z uwagi na różnice między technologiami zaleca się, aby przed rozpoczęciem korzystania z innej technologii użytkownik przeprowadził w laboratorium badania korelacji stosowanych metod w celu zidentyfikowania występujących między nimi różnic technologicznych i sprawdzenia nowej procedury. Ze względu na wspomniane wyżej różnice w technologiach, nie należy oczekiwać stuprocentowej zgodności między wynikami.
12. Zanieczyszczenie krzyżowe próbek może spowodować wyniki fałszywie dodatnie. System **cobas**® 4800 to zautomatyzowany aparat do PCR w czasie rzeczywistym opracowany w celu minimalizacji ryzyka zanieczyszczenia krzyżowego podczas przetwarzania próbki oraz ekstrakcji, amplifikacji i detekcji kwasu nukleinowego. W celu sprawdzenia niezawodności systemu przeprowadzono symulowane, niekliniczne badanie naprzemienne na panelu zawierającym spreparowane próbki wysoko dodatnie i ujemne, aby ocenić teoretyczny współczynnik zanieczyszczenia krzyżowego systemu. Próbki wysoko dodatnie miały wartości Ct niższe niż obserwowane w przypadku 95% pacjentów zakażonych w grupie docelowej. Współczynnik zanieczyszczenia krzyżowego w tym badaniu naprzemiennym został określony jako 0,24% (1/423). Współczynniki zanieczyszczenia krzyżowego w warunkach klinicznych zależą od odsetka próbek wysoko dodatnich oraz częstości występowania choroby. Rutynowe kliniczne współczynniki zanieczyszczenia krzyżowego powinny być znacznie niższe niż obserwowane w tym badaniu i należy je ocenić w warunkach użytkownika.

Ocena skuteczności w badaniach nieklinicznych

Czułość analityczna

Czułość analityczną (granice wykrywalności [ang. Limit of Detection, LOD]) dla testu **cobas® Cdiff** określono, prowadząc analizy ocenionych ilościowo hodowli *C. difficile* rozcieńczonych do kilku poziomów stężeń w stanowiących tło ujemnych próbkach zawiesiny stolca w podłożu **cobas® PCR**. Wszystkie poziomy przebadano z użyciem testu **cobas® Cdiff**, korzystając z trzech niepowtarzalnych serii odczynników testu **cobas® Cdiff**. W przypadku każdego poziomu przebadano co najmniej 21 powtórzeń na serię odczynnika. Granica wykrywalności (LOD) dla tego testu została określona jako docelowe stężenie, które może zostać wykryte jako dodatnie w $\geq 95\%$ testowanych powtórzeń na podstawie wyników uzyskanych z użyciem serii odczynników o najniższej wydajności.

Informacje dotyczące siedmiu szczepów *C. difficile* wykorzystanych w badaniu czułości analitycznej zawiera Tabela 3.

Tabela 3 Granica wykrywalności (LOD) dla testu **cobas® Cdiff**

Identyfikator szczepu	Toksynotyp	Typ REA*	Typ PFG†	Rybotyp	Fenotyp	LOD (CFU/wymaz)	
						Według odsetka wyników dodatnich	Według analizy Probit
ATCC 43255 (VPI 10463)	0	Nie dotyczy	Nie dotyczy	087	A+B+CDT-	113	90
ATCC BAA-1382 (630)	0	R 23	Nie dotyczy	012	A+B+CDT-	81	83
CDC 204118	III	BI 8	NAP1	027	A+B+CDT+	54	42
R12087 (CD196)	III	BI	NAP1	027	A+B+CDT+	54	54
2748-06	V	Nie dotyczy	Nie dotyczy	078	Nie dotyczy	54	45
ATCC 43598 (1470)	VIII	Nie dotyczy	Nie dotyczy	017	A-B+	225	130
F15	XII	Nie dotyczy	Nie dotyczy	Nie dotyczy	Nie dotyczy	54	59

* Analiza z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych. † Elektroforeza żelowa w polu pulsacyjnym.

Detekcja genotypów bakterii *C. difficile*

Granice wykrywalności testu **cobas® Cdiff** dla 28 szczepów toksynogennych reprezentujących dodatkowe toksynotypy zweryfikowano przez oznaczenie 40 powtórzeń na poziom przy kilku poziomach. Rozcieńczenia i próbki testowe przygotowano w podobny sposób, jak w przypadku opisanego powyżej badania granicy wykrywalności (LOD). Najniższy poziom, w przypadku którego odsetek trafień wynosił co najmniej 95%, zawiera Tabela 4.

Wszystkie 28 szczepów toksynogennych (Tabela 4) zostało wykrytych jako dodatnie w $\geq 95\%$ powtórzeń badanych przy stężeniach mieszczących się w zakresie od 77,9 CFU/wymaz do 460 CFU/wymaz.

Tabela 4 Podsumowanie wyników weryfikacji toksynogennych szczepów *C. difficile*

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

Precyzja

Wewnętrzne badanie precyzji zostało przeprowadzone z użyciem panelu składającego się z hodowli *C. difficile* rozcieńczonych w ujemnych próbkach zawiesiny stolca w podłożu cobas® PCR do stężeń poniżej granicy wykrywalności (LOD), w pobliżu wartości LOD oraz powyżej wartości LOD testu cobas® Cdiff. Przebadany został również poziom ujemny składający się wyłącznie z zawiesiny stolca w podłożu cobas® PCR. W badaniu wykorzystano trzy niepowtarzalne serie odczynników testu cobas® Cdiff oraz trzy aparaty, wykonując w sumie 36 przebiegów w ciągu 12 dni. Opis paneli precyzji oraz podsumowanie badania zawiera Tabela 5. Analiza czynników zmienności (Tabela 6) sugerowała, że największa zmienność docelowych wartości Ct jest przypisywana zmienności w ramach przebiegu (losowej) i czynnikom zależnym od serii (odpowiednio 60,0% oraz 25,3%) dla stężeń równych lub zbliżonych do wartości LOD. W przypadku stężeń przekraczających wartość LOD, większość zmienności wartości Ct jest przypisywana zmienności w ramach przebiegu (losowej) oraz czynnikom zależnym od aparatu (odpowiednio 72,5% oraz 24,7%). Wyniki (Tabela 7) pokazują, że docelowe wartości Ct miały ogólną wartość CV (%) równą 1,5% dla stężeń równych wartości LOD oraz 1,1% dla stężeń powyżej wartości LOD.

Tabela 5 Wewnętrzne badanie dokładności: analiza wyników dodatnich

Człon panelu	Liczba testowanych	Liczba wyników dodatnich	Odsetek wyników dodatnich	95% CL	
				Dolny	Górny
Ujemne	72	0	0,0%	0,0%	5,0%
< 1 x LOD	72	21	29,2%	19,0%	41,1%
~ 1 x LOD	72	72	100,0%	95,0%	100,0%
~ 3 x LOD	72	72	100,0%	95,0%	100,0%

LOD = granica wykrywalności

Tabela 6 Analiza czynników zmienności dla członów panelu precyzji

Poziom	Średnia	Czynniki zmienności/procent udziału w wyniku całkowitym					Razem
		Seria	Aparat	Wielkość zestawu	Dzień	Losowe	
~ 1 x LOD	38,5	0,0789	0,0189	0,0001	0,0270	0,1875	0,3123
		25,25%	6,04%	0,03%	8,65%	60,03%	100,00%
~ 3 x LOD	37,5	0,0047	0,0404	0,0000	0,0000	0,1188	0,1638
		2,84%	24,65%	0,00%	0,00%	72,51%	100,00%

LOD = granica wykrywalności

Tabela 7 Odchylenia standardowe oraz współczynniki zmienności (%) analizy dla członów panelu precyzji

Poziom	Średnia	Czynniki SD/CV (%)					Razem
		Seria	Aparat	Wielkość zestawu	Dzień	Losowe	
~ 1 x LOD	38,5	0,28	0,14	0,01	0,16	0,43	0,56
		0,73%	0,36%	0,03%	0,43%	1,12%	1,45%
~ 3 x LOD	37,5	0,07	0,20	0,00	0,00	0,34	0,40
		0,18%	0,54%	0,00%	0,00%	0,92%	1,08%

LOD = granica wykrywalności

Swoistość analityczna

W celu przeprowadzenia oceny swoistości analitycznej testu **cobas®** Cdiff wykonano testy z użyciem następujących paneli mikroorganizmów: 1) 103 bakterii, grzybów i wirusów, które mogą występować w próbkach kału oraz jednej komórki ludzkiej (Tabela 8); 2) 28 mikroorganizmów z rodziny *Clostridiaceae*, w tym nietoksynogennych szczepów *C. difficile* (* na potrzeby badania dodano cytomegalowirusa (HHV5) w ilości umożliwiającej uzyskanie stężenia $2,0 \times 10^3$ PFU/ml, ludzkiego adenowirusa typu 40 w ilości umożliwiającej uzyskanie stężenia $2,2 \times 10^3$ PFU/ml oraz ludzkiego rotawirusa w ilości umożliwiającej uzyskanie stężenia $9,8 \times 10^3$ PFU/ml — Tabela 9).

Wszystkie bakterie i komórki ludzkie zostały dodane w ilości umożliwiającej uzyskanie stężenia 1×10^6 j./ml, natomiast wszystkie wirusy zostały dodane w ilości umożliwiającej uzyskanie stężenia 1×10^5 j./ml, z wyjątkiem cytomegalowirusa (HHV5), ludzkiego adenowirusa typu 40 oraz ludzkiego rotawirusa, które zostały dodane w celu uzyskania niższych stężeń z powodu ograniczeń związanych ze stężeniem roztworu podstawowego. Testy zostały przeprowadzone z użyciem samych mikroorganizmów lub przy obecności jednego z dwóch izolatów szczepów *C. difficile* w stężeniu wynoszącym 3-krotność granicy wykrywalności (LOD) testu **cobas®** Cdiff. Wyniki wskazują, że żaden z tych mikroorganizmów nie zakłócał wykrywania docelowych typów Cdiff. W przypadku żadnego z nich nie uzyskano fałszywie dodatniego wyniku przy braku docelowego typu *C. difficile*.

Swoistość analityczną *Clostridium botulinum* potwierdzono z użyciem programu BLAST w porównaniu z bazą danych sekwencji nukleotydowych GenBank w celu symulacji etapu tworzenia ampliconu PCR.

* Ilość bakterii była określana jako liczba jednostek tworzących kolonię (CFU)/ml, ilość ludzkich komórek była podawana jako liczba komórek/ml, a ilość wirusów definiowano jako liczbę jednostek tworzących łysinkę (PFU)/ml, z wyjątkiem następujących mikroorganizmów. *Chlamydia trachomatis* oznaczono ilościowo jedynie jako ciało podstawowe (EB)/ml. Cytomegalowirus, ludzki echowirus oraz ludzki enterowirus oznaczono ilościowo jako IU/ml.

Tabela 8 Mikroorganizmy i komórki ludzkie

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

* Na potrzeby badania cytomegalowirus (HHV5) został dodany w ilości umożliwiającej uzyskanie stężenia $2,0 \times 10^3$ PFU/ml, ludzki adenowirus typu 40 w ilości umożliwiającej uzyskanie stężenia $2,2 \times 10^3$ PFU/ml, a ludzki rotawirus w ilości umożliwiającej uzyskanie stężenia $9,8 \times 10^3$ PFU/ml.

Tabela 9 Mikroorganizmy z rodzaju *Clostridiaceae*, w tym nietoksynogenne szczepy *C. difficile*

<i>Clostridium beijerinckii</i>	<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Clostridium bolteae</i>
<i>Clostridium botulinum</i> *	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium chauvoei</i>
<i>Clostridioides difficile</i> serogrupa B (nietoksynogenne)	<i>Clostridioides difficile</i> serogrupa I (nietoksynogenne)	<i>Clostridium fallax</i>
<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Clostridium innocuum</i>
<i>Clostridium methylpentosum</i>	<i>Clostridium nexile</i>	<i>Clostridium novyi</i>
<i>Clostridium orbiscindens</i> (<i>Flavonifractor plautii</i> po zmianie nazwy)	<i>Clostridium paraputrificum</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Clostridium ramosum</i>	<i>Clostridium scindens</i>	<i>Clostridium septicum</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Clostridium sphenoides</i>	<i>Clostridium spiroforme</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Clostridium symbiosum</i>	<i>Clostridium tertium</i>
<i>Clostridium tetani</i>	-	-

* Na podstawie programu BLAST.

Substancje wpływające na wynik testu

Pod kątem potencjalnego wpływu na wyniki testu **cobas**® Cdiff przebadano 26 często stosowanych leków, a także tłuszcz wydalany ze kałem, krew pełną i śluz. Wszystkie substancje przebadano przy stężeniach wyższych niż oczekiwane w przypadku ich pobierania na wymazówce wraz z próbką stolca. Ilość substancji wpływającej na wynik testu jest wyrażana w postaci stężenia w pierwotnej próbce stolca. Dwa izolaty szczepów *C. difficile* zostały dodane w ilości umożliwiającej uzyskanie 3-krotności granicy wykrywalności (LOD) testu **cobas**® Cdiff i wykorzystane jako typy docelowe w tych testach. Nie stwierdzono wpływu na wyniki testu w przypadku substancji egzogennych. W przypadku tłuszczu wydalanego z kałem nie obserwowano wpływu do stężenia 28%, w przypadku krwi pełnej do poziomu 50%, a w przypadku śluzu — do wartości 25%. Podsumowanie tych wyników zawiera Tabela 10.

Tabela 10 Wyniki badania substancji wpływających na wynik testu

Substancja	Stężenie	Wyniki
Tłuszcz wydalany z kałem	4–28% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Krew pełna	25, 50% (udział objętościowy)	Brak wpływu
Śluz	25, 50% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu do 25% (udział wagowo-obj.)
Tums	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Wankomycyna	1% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
metronidazol	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Imodium AD®	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Środek zmiękczejący stolec	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Pepto-Bismol® (Procter & Gamble)	10% (udział objętościowy)	Brak wpływu
Maść z nystatyną USP	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Krem Preparation H® with Bio-Dyne® (Wyeth)	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
GYNOL II	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Krem przeciwko świądowi Vagisil®	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Anusol® Plus	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Filtr przeciwsłoneczny	1% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Monistat® 7	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Vaseline™	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Czopki SAB-Dimenhidrate® (SABEX®)	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Olej mineralny	10% (udział objętościowy)	Brak wpływu
Naturalny środek przeczyszczający pochodzenia roślinnego Equate	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Dulcolax®	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Fleet® (CB Fleet Company)	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
K-Y Jelly/Gelée® (McNeil-PPC)	1% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Aerozol donosowy Afrin Original	10% (udział objętościowy)	Brak wpływu
Wyciąg wodny z oczaru wirginijskiego	Płyn z 1 przetarcia/wymazówki	Brak wpływu
Siarczan baru o wysokiej gęstości E-Z-HD™ do sporządzania zawiesiny (E-Z-EM Canada)	20% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Kwas palmitynowy	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Kwas stearynowy	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu
Aleve	10% (udział wagowo-obj.)	Brak wpływu

Skuteczność kliniczna z wykorzystaniem próbek klinicznych

Skuteczność testu **cobas**® Cdiff porównano z zatwierdzonym przez FDA i posiadającym oznakowanie CE najnowocześniejszym testem referencyjnym NAT, korzystając z oznaczeń cytotoksyczności hodowli tkankowej izolatów *C. difficile* z hodowli bezpośrednich jako metody referencyjnej. Próbkę stolca zgromadzone w 3 szpitalach/ośrodkach medycznych zostały przebadane z użyciem testu **cobas**® Cdiff oraz referencyjnego testu NAT, a także przesłane do laboratorium referencyjnego w celu przeprowadzenia badań z użyciem hodowli tkankowej z oceną cytotoksyczności.

Test **cobas**® Cdiff i najnowocześniejszy test referencyjny NAT zostały wykonane zgodnie z instrukcjami producentów. Test cytotoksyczności w hodowli tkankowej został przeprowadzony z wykorzystaniem procedury hodowli bezpośredniej. Z każdej próbki stolca pobrano inokulat umieszczany w zredukowanym wstępnie agarze zawierającym cykloserynę, cefoksytynę i fruktozę (CCFA-HT). Podejrzewane kolonie identyfikowano jako bakterie *C. difficile* za pomocą barwienia metodą Grama, na podstawie nietolerancji warunków tlenowych i z użyciem testu Pro-Disk, a następnie inokulowano w bulionie mięsny do hodowli w warunkach beztlenowych. Supernatant pozyskany z hodowli w bulionie mięsny w warunkach beztlenowych zostanie następnie przetworzony w celu wykrycia toksyny B bakterii *C. difficile* z wykorzystaniem testu cytotoksyczności w hodowli tkankowej (test C. DIFFICILE TOX-B, Techlab).

Do udziału w badaniu zakwalifikowano w sumie 1434 pacjentów z pięciu ośrodków. Z powodu niekompletnych wyników wykluczono 156 pacjentów. W hodowli bezpośredniej wykryto 152 dodatnie próbki *C. difficile* (częstość występowania: 11,9%). Dane dotyczące skuteczności testu **cobas**® Cdiff i referencyjnego testu NAT w przypadku hodowli bezpośredniej zawiera Tabela 11 oraz Tabela 12.

Tabela 11 Test **cobas**® Cdiff a hodowla bezpośrednia

		Hodowla bezpośrednia		
		Dodatni	Ujemny	Razem
Test cobas ® Cdiff	Dodatni	147	30	177
	Ujemny	5	1 096	1 101
	Razem	152	1 126	1 278

Czułość i swoistość

Czułość i swoistość testu **cobas**® Cdiff w porównaniu z hodowlą bezpośrednią wyniosły odpowiednio 96,7% (95% dwustronny przedział ufności: 92,5–98,6%) oraz 97,3% (95% dwustronny przedział ufności: 96,2–98,1%).

Wartość predykcyjna wyniku dodatniego i ujemnego

Obserwowane wartości predykcyjne wyniku dodatniego i ujemnego testu **cobas®** Cdiff dla próbek w badaniu wyniosły odpowiednio 83,1% (95% dwustronny przedział ufności: 76,7–88,3%) oraz 99,5% (95% dwustronny przedział ufności: 98,9–99,9%).

Tabela 12 Referencyjny test Nucleic Acid Test (NAT) w przypadku hodowli bezpośredniej

		Hodowla bezpośrednia		
		Dodatni	Ujemny	Razem
Test referencyjny NAT	Dodatni	147	29	176
	Ujemny	5	1 097	1 102
	Razem	152	1 126	1 278

Czułość i swoistość

Czułość i swoistość testu referencyjnego NAT w porównaniu z hodowlą bezpośrednią wyniosły odpowiednio 96,7% (95% dwustronny przedział ufności: 92,5–98,6%) oraz 97,4% (95% dwustronny przedział ufności: 96,3–98,2%).

Korelacja z testem referencyjnym NAT

Dane dotyczące skuteczności testu **cobas®** Cdiff w porównaniu z zatwierdzonym przez FDA i posiadającym oznakowanie CE najnowocześniejszym testem referencyjnym NAT zawiera Tabela 13.

Tabela 13 Test **cobas®** Cdiff w porównaniu z testem referencyjnym Nucleic Acid Test (NAT)

		Referencyjny test NAT		
		Dodatni	Ujemny	Razem
Test cobas® Cdiff	Dodatni	167	10	177
	Ujemny	9	1 092	1 101
	Razem	176	1 102	1 278

Odsetek zgodności wyników dodatnich i ujemnych

Odsetek zgodności wyników dodatnich i ujemnych testu **cobas®** Cdiff w porównaniu z referencyjnym testem NAT wyniósł odpowiednio 94,9% (95% dwustronny przedział ufności: 90,6–97,3%) oraz 99,1% (95% dwustronny przedział ufności: 98,3–99,5%).

Dodatkowe informacje

Najważniejsze cechy oznaczenia

Rodzaj próbki	Próbki nieufornowanego stolca
Wymagana ilość próbki	4,3 ml pożywki cobas ® PCR w fiolce pierwotnej, do wykonania testu cobas ® Cdiff wymagane są co najmniej 3 ml próbki.
Czas trwania testu	Wyniki są dostępne w ciągu 2,5 godziny po umieszczeniu próbki w systemie (1–22 próbek).
Czułość analityczna	Od 54 do 460 CFU/wymaz w zależności od izolatu.
Swoistość	Nie stwierdzono reaktywności krzyżowej ze 125 blisko spokrewnionymi mikroorganizmami lub mikroorganizmami występującymi typowo w próbkach stolca.
Reprezentatywność	Wszystkie znane szczepy <i>C. difficile</i> (toksynotypy 0–XXXI, z wyjątkiem nietoksynogennych toksynotypów XI), w tym odpowiedzialny za wybuchy epidemii hiperwirulentny szczep BI/NAP1/027.

Oznaczenia

Na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR stosuje się następujące oznaczenia.

Tabela 14 Oznaczenia stosowane na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR

Age/DOB Wiek lub data urodzenia	 Wyrób nieprzeznaczony do testów przy pacjencie	QS IU/PCR IU QS na reakcję PCR, użyć jednostek międzynarodowych (IU) QS na reakcję PCR w obliczeniach wyników.
 Oprogramowanie pomocnicze	 Wyrób nieprzeznaczony do samodzielnego testowania	SN Numer seryjny
Assigned Range [copies/mL] Przypisany zakres (kopie/ml)	 Dystrybutor (Uwaga: pod symbolem może być wskazany właściwy kraj/region.)	Site Ośrodek
Assigned Range [IU/mL] Przypisany zakres (IU/ml)	 Nie używać powtórnie	Procedure Standard Procedura standardowa
EC REP Autoryzowany Przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej	 Kobieta	STERILE EO Produkt sterylizowany tlenkiem etylenu
 Arkusz kodów kreskowych	 Wyłącznie do oceny działania w badaniach IVD	 Przechowywać z dala od światła
LOT Kod partii	GTIN Numer globalny jednostki handlowej	 Przestrzegać zakresu temperatury
 Zagrożenie biologiczne	 Importer	 Plik definicji testów
REF Numer katalogowy	IVD Wyrób do diagnostyki <i>in vitro</i>	 Tą stroną do góry
 Oznaczenie zgodności CE — wyrób ten jest zgodny z obowiązującymi wymogami dotyczącymi oznaczenia CE dla wyrobu medycznego do diagnostyki <i>in vitro</i>	LLR Dolna granica przypisanego zakresu	Procedure UltraSensitive Procedura ultraczulą
Collect Date Data pobrania	 Mężczyzna	UDI Niepowtarzalny kod identyfikacyjny wyrobu
 Sprawdź w instrukcji użytkowania	 Wytwórca	ULR Górna granica przypisanego zakresu
 Zawartość wystarczająca na <n> testów	CONTROL - Kontrola ujemna	Urine Fill Line Linia napełniania moczem
CONTENT Zawartość zestawu	 Wyrób niejałowy	Rx Only Tylko Stany Zjednoczone: prawo federalne zezwala na sprzedaż tego wyrobu wyłącznie lekarzowi lub na zamówienie takiego lekarza.
CONTROL Próba kontrolna	 Nazwisko pacjenta	 Termin przydatności
 Data produkcji	 Numer pacjenta	
 Wyrób do testów przy pacjencie	 Rozerwać tutaj	
 Wyrób do samodzielnego testowania	CONTROL + Kontrola dodatnia	
	QS copies / PCR Kopie QS na reakcję PCR, użyć kopii QS na reakcję PCR w obliczeniach wyników.	

Pomoc techniczna

W celu uzyskania wsparcia (pomocy) technicznego należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem: https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Wytwórca i importer

Tabela 15 Wytwórca i importer



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

Wyprodukowano w Stanach Zjednoczonych



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

Znaki towarowe i patenty

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

Prawo autorskie

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Piśmiennictwo

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

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

Wersja dokumentu

Informacje dotyczące wersji dokumentu	
Doc Rev 8.0 02/2024	Informacje dotyczące zagrożeń związanych z zestawami Lysis Kit 1 zostały zaktualizowane. Zaktualizowano zapis marki cobas® . W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielem Roche.
Doc Rev 9.0 06/2024	Zaktualizowano informacje dotyczące zagrożeń ze strony zestawów do przygotowywania próbek. Usunięto symbol „Rx Only” z pierwszej strony. Zaktualizowano stronę z ujednoliconymi symbolami. W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielem Roche.

Podsumowanie sprawozdania na temat bezpieczeństwa i parametrów działania można znaleźć pod następującym linkiem: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>