

cobas[®] Cdiff Test

para uso en el sistema cobas[®] 4800

Para diagnóstico *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

TABLA DE CONTENIDO

Uso previsto	4
Resumen y explicación de la prueba/Principio del ensayo	4
Antecedentes: cribado de <i>C. difficile</i>	4
Explicación de la prueba	5
Principios del ensayo	5
Preparación de las muestras	5
Amplificación mediante PCR y detección mediante TaqMan®	6
Amplificación selectiva	6
Materiales, reactivos y muestras	7
Materiales y reactivos suministrados	7
Almacenamiento y manipulación de los reactivos	12
Material adicional necesario	13
Material opcional	13
Equipos y programas necesarios pero no suministrados	13
Precauciones y requisitos de manipulación	14
Advertencias y precauciones	14
Prácticas de laboratorio recomendadas	14
Contaminación	15
Integridad	15
Eliminación de residuos	15
Limpieza de derrames	15
Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras	16
Obtención de las muestras	16
Almacenamiento y estabilidad de las muestras durante el transporte	16
Procedimiento analítico	17
Realización de la prueba	17
Flujo de trabajo	17
Instrucciones de uso	17

Resultados.....	21
Control de calidad y validez de los resultados.....	21
Control positivo.....	21
Control negativo.....	21
Control interno.....	21
Interpretación de los resultados.....	22
Lista de avisos de resultados.....	23
Limitaciones del procedimiento.....	23
Evaluación no clínica del rendimiento	25
Sensibilidad analítica.....	25
Detección de genotipos de <i>C. difficile</i>	25
Precisión.....	27
Especificidad analítica.....	28
Interferencia.....	30
Rendimiento clínico con muestras clínicas.....	32
Información adicional.....	34
Características principales del ensayo.....	34
Símbolos.....	35
Asistencia técnica.....	36
Fabricante e importador.....	36
Marcas registradas y patentes.....	36
Copyright.....	36
Bibliografía.....	37
Revisión del documento.....	39

Uso previsto

La prueba **cobas**® Cdiff para uso en el sistema **cobas**® 4800 es una prueba cualitativa automatizada de diagnóstico *in vitro* que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección directa del gen de la toxina B (*tcdB*) de *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) toxigénico en muestras de heces (líquidas o blandas) obtenidas de pacientes con sospecha de padecer una infección por *C. difficile* (CDI). La prueba **cobas**® Cdiff está diseñada para utilizarse como ayuda para el diagnóstico de CDI en humanos junto con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos.

Resumen y explicación de la prueba/Principio del ensayo

Antecedentes: cribado de *C. difficile*

La bacteria *C. difficile* es un bacilo gram positivo anaerobio formador de esporas que fue identificado como agente etiológico de la colitis pseudomembranosa asociada al uso de antibióticos a finales de la década de los setenta.^{1,2} Se estima que es responsable del 15-20% de los casos de diarrea relacionados con el tratamiento con antibióticos y prácticamente de todos los casos de colitis pseudomembranosa por antibióticos.³ Durante la última década, la incidencia de la infección por *C. difficile* (CDI) ha aumentado de forma progresiva y es en la actualidad un problema clínico serio en los países desarrollados. Mientras que las tasas de incidencia oscilaban entre 30 y 40 casos por cada 100.000 habitantes en centros hospitalarios con unidades de cuidados intensivos de Estados Unidos, la incidencia de la infección ascendió a más de 80 casos por cada 100.000 habitantes en 2005.⁴ Se han descrito anteriormente epidemias de CDI.⁵ El coste directo asociado a la CDI es de 6.326 \$ por caso en EE.UU.⁶

En parte, este aumento de la incidencia se ha atribuido a la emergencia de una cepa supuestamente hipervirulenta, clasificada como ribotipo 027/pulsotipo norteamericano 1 (NAP1) y toxinotipo III. Las cepas toxigénicas de *C. difficile* suelen producir dos toxinas: la toxina A (una enterotoxina) y la toxina B (una citotoxina).⁷ Un porcentaje reducido de cepas únicamente produce la toxina B.⁸

Recientemente se ha descrito un aumento de la virulencia de cepas que producen otra toxina, denominada toxina binaria, y que realizan una delección en el gen regulador negativo *tcdC*.^{9,10} Se ha observado que estas cepas son más virulentas *in vitro* y que causan mayor morbilidad y mortalidad en humanos.^{11,12}

Tras la colonización con *C. difficile* toxigénico, una persona puede convertirse en portador asintomático o desarrollar una enfermedad del colon. Los síntomas clínicos de la CDI pueden variar desde diarrea moderada hasta colitis pseudomembranosa mortal caracterizada por dolor abdominal, diarrea profusa y síntomas sistémicos como fiebre, anorexia, náuseas y malestar.

El diagnóstico de la CDI suele realizarse mediante la demostración de la presencia de las toxinas A y/o B en muestras de heces. La manifestación del efecto citopático en una monocapa celular por acción de la toxina B se ha considerado tradicionalmente como el "Gold Standard."^{13, 14} La demostración del efecto citopático puede efectuarse mediante la incubación directa de sobrenadante fecal sobre la monocapa celular; otra posibilidad consiste en cultivar aislados *C. difficile* en un medio selectivo y obtener el sobrenadante para una incubación posterior en la monocapa celular (cultivo toxigénico).¹⁵ Ambas técnicas requieren un mínimo de 48 a 72 horas para la obtención de un resultado final. Las técnicas de inmunoensayos para la detección de las toxinas A y B gozan de una aplicación amplia porque proporcionan resultados positivos en menos de 4 horas; sin embargo, sus niveles de sensibilidad son significativamente inferiores con respecto al cultivo tisular.¹⁶ En comparación con criterios clínicos que avalan la presencia de CDI, la técnica de PCR ha demostrado unos valores de sensibilidad, especificidad y predictivos positivos y negativos del 93,3%, 97,4%, 75,5% y 99,4%, respectivamente, con un tiempo de respuesta < 4 horas.¹⁵

En consecuencia, la PCR se considera una prueba única rápida y óptima para la detección de toxinas de *C. difficile*.¹⁷⁻²⁰ A pesar del dramático aumento de la incidencia y la gravedad de la CDI, el metronidazol o la vancomicina siguen siendo el tratamiento médico preferido para episodios agudos e infecciones recurrentes.²¹

Entre las medidas de control infeccioso se incluyen el uso prudente de los antimicrobianos, la prevención de la infección cruzada y una vigilancia activa de los casos.²² No se recomienda repetir el análisis denominado “prueba de curación” puesto que las toxinas pueden estar presentes durante periodos prolongados sin mostrar síntomas clínicos.

Por todo lo expuesto, existe una necesidad acuciante de un método de detección automatizado altamente sensible y rápido del *C. difficile*. Los métodos moleculares ofrecen el potencial de reducir de forma significativa el tiempo de detección. Esta ventaja permite el inicio temprano de un tratamiento antimicrobiano y la implementación inmediata de medidas de control de la infección.¹⁷⁻²⁰

Explicación de la prueba

La prueba **cobas®** Cdiff se basa en dos procesos básicos: (1) preparación automatizada de las muestras para extraer ácidos nucleicos de las muestras de heces amorfas; (2) amplificación mediante PCR de secuencias de ADN objetivo con ayuda de cebadores (primers) específicos para *C. difficile* y detección a tiempo real de sondas de detección de oligonucleótidos escindidas mediante marcadores fluorescentes específicas para *C. difficile*. Antes de la preparación automatizada de las muestras, se añade un control interno, que contiene una secuencia aleatoria no relacionada de ADN, a todas las muestras y se amplifica y detecta simultáneamente en cada muestra para supervisar el proceso completo.

Principios del ensayo

Preparación de las muestras

La preparación de las muestras para la prueba **cobas®** Cdiff se realiza de forma automática en el equipo **cobas®** x 480. Se lleva a cabo la lisis de los organismos mediante un agente caotrópico, proteinasa K y reactivos SDS. Los ácidos nucleicos liberados, junto con el ADN del control interno añadido, se unen mediante micropartículas magnéticas. A continuación, se lavan y se eluden en un volumen reducido de tampón. El equipo extrae entonces una alícuota del material eluído y prepara la reacción PCR con la mezcla maestra activada.

Amplificación mediante PCR y detección mediante TaqMan®

Los pasos de la ciclación por PCR y la detección de la señal objetivo se producen en el analizador **cobas® z 480**. El reactivo de la mezcla maestra contiene pares de cebadores y sondas para dos objetivos: la toxina B y el control interno. Si las secuencias objetivo de ácidos nucleicos están presentes, la amplificación con los cebadores correspondientes se producirá mediante ADN polimerasa termoestable que generará productos de PCR (amplicón). Estos productos se detectan mediante sondas TaqMan específicas que contienen un marcador fluorescente y un enmascarador. Por lo general, el enmascarador suprime la señal fluorescente del marcador. Sin embargo, con la presencia de un producto de PCR, la sonda se hibridiza con el producto y se escinde por la actividad de las nucleasas 5'-3' de la polimerasa. Esta reacción permite al marcador emitir la fluorescencia y el analizador **cobas® z 480** registra la señal a tiempo real durante cada ciclo de PCR. La señal se interpreta con el programa del sistema **cobas® 4800** y se comunica como resultados finales.

Amplificación selectiva

La amplificación selectiva del fragmento objetivo de ácido nucleico de la muestra se logra en la prueba **cobas® Cdiff** mediante el uso de la enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) y el trifosfato de desoxiuridina (dUTP). La enzima AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen desoxiuridina²³, pero no del ADN que contiene desoxitimidina. El ADN natural carece de desoxiuridina, que sin embargo está siempre presente en los amplicones debido al empleo de trifosfato de desoxiuridina en lugar de trifosfato de timidina como uno de los dNTP del reactivo de mezcla maestra; por lo tanto, solamente el amplicón contiene desoxiuridina. La desoxiuridina hace que la enzima AmpErase pueda destruir el amplicón contaminante antes de realizar la amplificación del ADN del fragmento objetivo. La enzima AmpErase, que se incluye en el reactivo de mezcla maestra, cataliza la escisión del ADN que contiene desoxiuridina en la posición de los residuos de desoxiuridina abriendo la cadena de desoxirribosa en la posición C1. Cuando se calienta en el primer paso del ciclo térmico para alcanzar el pH alcalino de la mezcla maestra, la cadena de ADN del amplicón se rompe en la posición de la desoxiuridina, lo que hace que el ADN ya no pueda amplificarse. La enzima AmpErase es inactiva a temperaturas superiores a los 55 °C; es decir, durante los pasos de la ciclación térmica y, por consiguiente, no destruye el amplicón objetivo. La prueba **cobas® Cdiff** ha demostrado que inactiva un mínimo de 1.000 copias del amplicón de *C. difficile* que contiene desoxiuridina por cada ciclo de PCR.

Materiales, reactivos y muestras

Materiales y reactivos suministrados

Kit/Casets	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Kit de preparación de muestras para el sistema cobas® 4800) 240 pruebas (P/N: 05235782190)	MGP (Micropartículas magnéticas para el sistema cobas® 4800) Micropartículas magnéticas 93% de isopropanol	10 × 4,5 ml	 PELIGRO H225 Líquido y vapores muy inflamables. H319 Provoca irritación ocular grave. H336 Puede provocar somnolencia o vértigo. P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. P233 Mantener el recipiente herméticamente cerrado. P261 Evitar respirar el polvo/el humo/ el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. P280 Llevar guantes/gafas/máscara de protección. P303 + P361 + P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ ducharse. P370 + P378 En caso de incendio: utilizar arena seca, polvo químico seco o espuma resistente al alcohol para apagarlo.
	EB (Tampón de elución para el sistema cobas® 4800) Buffer Tris 0,09% de azida sódica	10 × 18 ml	N/D

Kit/Casets	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Kit de preparación de muestras para el sistema cobas® 4800) 960 pruebas (P/N: 05235804190)	MGP (Micropartículas magnéticas para el sistema cobas® 4800) Micropartículas magnéticas 93% de isopropanol	10 × 13,5 ml	 PELIGRO H225 Líquido y vapores muy inflamables. H319 Provoca irritación ocular grave. H336 Puede provocar somnolencia o vértigo. P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. P233 Mantener el recipiente herméticamente cerrado. P261 Evitar respirar el polvo/el humo/ el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. P280 Llevar guantes/gafas/máscara de protección. P303 + P361 + P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ ducharse. P370 + P378 En caso de incendio: utilizar arena seca, polvo químico seco o espuma resistente al alcohol para apagarlo.
	EB (Tampón de elución para el sistema cobas® 4800) Buffer Tris 0,09% de azida sódica	10 × 18 ml	N/D

Kit/Casets	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Kit de lisis 1 para el sistema cobas® 4800) 240 pruebas (P/N: 06768253190)	LYS-1 (Tampón de lisis 1 para el sistema cobas® 4800) Citrato de sodio 5% de polidocanol 42,6% de tiocianato de guanidina Ditiotreitól	10 × 10 ml	 PELIGRO H302 + H332 Nocivo en caso de ingestión o inhalación. H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H318 Provoca lesiones oculares graves. H334 Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.
	PK (Proteinasa K para el sistema cobas® 4800) Buffer Tris EDTA Cloruro de calcio Acetato de calcio < 2,0% de proteinasa K Glicerol	10 × 0,9 ml	H412 Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. EUH032 En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. P261 Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. P280 Llevar guantes/gafas/máscara de protección. P284 Llevar equipo de protección respiratoria. P304 + P340 + P312 EN CASO DE INHALACIÓN: transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico en caso de malestar.
	SDS (Reactivo SDS para el sistema cobas® 4800) Buffer Tris Sodecilsulfato sódico 0,09% de azida sódica	10 × 3 ml	P305 + P351 + P338 + P310 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. P342 + P311 En caso de síntomas respiratorios: llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

Kit/Casets	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Kit de lisis 1 para el sistema cobas® 4800) 960 pruebas (P/N: 06768270190)	LYS-1 (Tampón de lisis 1 para el sistema cobas® 4800) Citrato de sodio 5% de polidocanol 42,6% de tiocianato de guanidina Ditiotreititol	10 × 36 ml	 PELIGRO H302 + H332 Nocivo en caso de ingestión o inhalación. H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H318 Provoca lesiones oculares graves. H334 Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. H412 Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. EUH032 En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.
	PK (Proteinasa K para el sistema cobas® 4800) Buffer Tris EDTA Cloruro de calcio Acetato de calcio < 2,0% de proteinasa K Glicerol	20 × 1,2 ml	P261 Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. P280 Llevar guantes/gafas/máscara de protección. P284 Llevar equipo de protección respiratoria. P304 + P340 + P312 EN CASO DE INHALACIÓN: transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICO-LÓGICA o a un médico en caso de malestar.
	SDS (Reactivo SDS para el sistema cobas® 4800) Buffer Tris Sodecilsulfato sódico 0,09% de azida sódica	10 × 9 ml	P305 + P351 + P338 + P310 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. P342 + P311 En caso de síntomas respiratorios: llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

Kit/Casets	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Kit de tampón de lavado para el sistema cobas® 4800) 240 pruebas (P/N: 05235863190)	WB (Tampón de lavado para el sistema cobas® 4800) Citrato de sodio dihidratado 0,05% de N-metilisotiazolona-HCl	10 × 55 ml	N/D
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Kit de tampón de lavado para el sistema cobas® 4800) 960 pruebas (P/N: 05235871190)	WB (Tampón de lavado para el sistema cobas® 4800) Citrato de sodio dihidratado 0,05% de N-metilisotiazolona-HCl	10 × 200 ml	N/D
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 (Kit de control interno 1 para el sistema cobas® 4800) 20 series (P/N: 06768318190)	IC-1 (Control interno 1 para cobas® 4800) Buffer Tris EDTA < 0,01% de ARN poli Ar (sintético) 0,05% de azida sódica < 0,01% de ADN de control interno sintético no infeccioso, encapsulado en proteína recubierta de bacteriófago Lambda	20 × 0,5 ml	N/D
cobas® 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit (Kit de amplificación/detección cobas® 4800 Cdiff) 80 pruebas (P/N: 06768237190)	Cdiff MMX (Mezcla maestra cobas® Cdiff) Tampón tricina EDTA DMSO Acetato de potasio Hidróxido potásico Tween 20 < 0,19% de dATP, dCTP, dGTP y dUTP < 0,01% de cebadores ascendentes y descendentes para <i>C. difficile</i> y control interno < 0,01% de sondas con marcador fluorescente para la detección del control interno y de <i>C. difficile</i> < 0,01% de aptámero oligonucleótido < 0,01% de ADN polimerasa Z05 (microbiana) < 0,02% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) 0,09% de azida sódica	10 × 0,3 ml	N/D

Kit/Casets	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia
cobas® 4800 Cdiff Controls and Cofactor Kit (Kit de controles y cofactor cobas® 4800 Cdiff) 10 series (P/N: 06768300190)	Cdiff (+) C (Control positivo cobas® Cdiff) Buffer Tris EDTA < 0,01% de ARN poli Ar (sintético) 0,05% de azida sódica < 0,01% de ADN plasmídico no infeccioso (microbiano) con secuencias de <i>C. difficile</i>	10 × 0,5 ml	N/D
	(-) C (Control negativo para el sistema cobas® 4800) Buffer Tris EDTA 0,05% de azida sódica < 0,01% de ARN poli Ar (sintético)	10 × 0,5 ml	N/D
	Cofactor-3 (Cofactor 3 para cobas® 4800) Acetato de manganeso Acetato de magnesio Albúmina sérica bovina procedente de plasma bovino obtenido en Estados Unidos 0,09% de azida sódica	10 × 1,7 ml	N/D

Almacenamiento y manipulación de los reactivos

Reactivo	Temperatura de almacenamiento	Periodo de almacenamiento
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Kit de preparación de muestras para el sistema cobas® 4800)	2-8 °C	Estable hasta la fecha de caducidad indicada
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Kit de lisis 1 para el sistema cobas® 4800)	2-8 °C	Estable hasta la fecha de caducidad indicada
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 (Kit de control interno 1 para el sistema cobas® 4800)	2-8 °C	Estable hasta la fecha de caducidad indicada
cobas® 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit (Kit de amplificación/detección cobas® 4800 Cdiff)	2-8 °C	Estable hasta la fecha de caducidad indicada
cobas® 4800 Cdiff Controls and Cofactor Kit (Kit de controles y cofactor cobas® 4800 Cdiff)	2-8 °C	Estable hasta la fecha de caducidad indicada
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Kit de tampón de lavado para el sistema cobas® 4800)	15-25 °C	Estable hasta la fecha de caducidad indicada

Nota: no congele los reactivos.

La fecha de caducidad de los reactivos se basa en el tiempo universal coordinado (UTC). La hora local para la caducidad de los reactivos puede variar en ± 12 horas, en función de la zona horaria local con relación al UTC.

Material adicional necesario

Material	P/N
Puntas CORE, 1.000 µl, bandeja de 96	04639642001
Depósito de reactivo de 50 ml	05232732001
Depósito de reactivo de 200 ml	05232759001
Placa de extracción (plasmoteca) para el sistema cobas ® 4800	05232716001
Placa de amplificación y detección (PCR) de 0,3 ml y plástico de sellado para el sistema cobas ® 4800	05232724001
Sellador	04900383001
Transportador de 24 posiciones	04639502001
Bolsa para residuos sólidos	05530873001 (pequeña) o 04691989001 (grande)
Salida de plástico Hamilton STAR	04639669001
cobas ® PCR Media and Swab Sample Kit	07051891190
cobas ® PCR Media Uni Swab Sample Kit	07958030190
Guantes desechables, sin polvo	Se aceptan todos los tipos de guantes desechables sin polvo.
Agitador (un solo tubo)	Se aceptan todos los tipos de agitadores.
Centrífuga equipada con un rotor para placas basculante con una FCR mínima de 1.500	Se aceptan todos los tipos de centrífugas con características similares.

Para obtener más información sobre el material de venta independiente, póngase en contacto con su representante local de Roche.

Material opcional

Material	P/N
Lámina de sellado o tapa para placa de plasmoteca	Roche 04789288001 o Hamilton 6474-01
Tapones de color neutro (para volver a tapar las muestras después del análisis)	Roche P/N 07958056190 para volver a tapar las muestras ya procesadas en tubos de 13 ml de base redonda

Para obtener más información sobre el material opcional, póngase en contacto con su representante local de Roche.

Equipos y programas necesarios pero no suministrados

Equipos y programas necesarios, no suministrados
Sistema cobas ® 4800 Equipo cobas ® x 480 Analizador cobas ® z 480 Unidad de control
Programa cobas ® Cdiff AP para el sistema cobas ® 4800 versión 1.0.1 o superior
Programa de aplicaciones (Core) para el sistema cobas ® 4800 versión 2.2.0 o superior

Para obtener más información sobre el material de venta independiente, póngase en contacto con su representante local de Roche.

Precauciones y requisitos de manipulación

Advertencias y precauciones

Como sucede con cualquier procedimiento analítico, resulta esencial utilizar las prácticas de laboratorio recomendadas para obtener un rendimiento correcto del ensayo. Debido a la elevada sensibilidad analítica de esta prueba, deben extremarse las precauciones para evitar cualquier tipo de contaminación de los reactivos, las muestras y las mezclas de amplificación.

- Para diagnóstico *in vitro* exclusivamente.
- Evite la contaminación microbiana y del ADN de los reactivos y las muestras.
- Puede solicitar Hojas de Datos de Seguridad (Safety Data Sheets, SDS) en las oficinas locales de Roche.
- El reactivo LYS-1 contiene tiocianato de guanidina. Evite el contacto directo entre el tiocianato de guanidina y el hipoclorito de sodio (lejía) u otros reactivos altamente reactivos como ácidos o bases. Tales mezclas pueden producir gases nocivos.
- MGP contiene isopropanol y es altamente inflamable. Mantenga el producto lejos de las llamas y lugares donde puedan producirse chispas.
- Evite la exposición del reactivo MGP a fuentes de campos magnéticos.
- Las soluciones EB, Cdiff MMX, SDS, Cofactor-3, (-)C, Cdiff (+)C e IC-1 contienen azida sódica.
- Si desea conocer las advertencias, precauciones y procedimientos adicionales para reducir el riesgo de contaminación del **cobas® x 480 instrument** o el **cobas® z 480 analyzer**, consulte la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**. Si se sospecha de la existencia de contaminación, efectúe una limpieza y el mantenimiento semanal que se describe en la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**.
- Informe a la autoridad competente local y al fabricante de cualquier incidente grave que pueda tener lugar durante la realización del ensayo.

Nota: para obtener instrucciones específicas, consulte el apartado “Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras”.

Prácticas de laboratorio recomendadas

- No pipetee con la boca.
- No se debe comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo del laboratorio.
- Lávese a conciencia las manos después de manipular las muestras y los reactivos del kit.
- Utilice guantes desechables, batas de laboratorio y protección ocular cuando manipule los reactivos. Evite el contacto de estos materiales con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua. Pueden producirse quemaduras si no se actúa adecuadamente. Si se producen derrames, diluya las manchas con agua antes de secarlas con un paño.
- Limpie y desinfecte minuciosamente todas las superficies de trabajo del laboratorio usando una solución recién preparada de hipoclorito de sodio al 0,5% en agua destilada o desionizada (lejía doméstica diluida a 1:10). A continuación, límpielas con un trapo impregnado de etanol al 70%.

Contaminación

- A fin de evitar la contaminación, es obligatorio el uso de guantes durante la manipulación de las muestras y los reactivos **cobas®** Cdiff, así como cambiarse los guantes entre un proceso y otro. Evite la contaminación de los guantes durante la manipulación de las muestras y de los controles. Utilice guantes y bata de laboratorio junto con protección ocular cuando manipule las muestras y los reactivos del kit.
- Evite la contaminación microbiana y con ribonucleasa de los reactivos.
- Podrían obtenerse falsos positivos si no se evita la contaminación por arrastre de las muestras durante su manipulación.
- Las muestras deben tratarse como material infeccioso, por lo que deben utilizarse procedimientos de seguridad de laboratorio como los descritos en la publicación *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*²⁴ y en el documento M29-A4 del CLSI.²⁵

Integridad

- No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- No haga pooles con los reactivos.
- No utilice elementos desechables caducados.
- No utilice reactivos ni contenedores que estén visiblemente dañados o muestren signos de fuga.
- Los elementos desechables son de un solo uso. No deben reutilizarse.
- Debe realizarse un correcto mantenimiento del equipo, de acuerdo con lo establecido en las instrucciones del fabricante.

Eliminación de residuos

- Los reactivos del sistema **cobas®** 4800 y los reactivos específicos de la prueba **cobas®** Cdiff contienen azida sódica (consulte el apartado “**Advertencias y precauciones**”). La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Cuando elimine soluciones que contengan azida sódica vertiéndolas en fregaderos de laboratorio, deje correr abundante agua fría para evitar la formación de depósitos de azida.
- Deseche los reactivos no utilizados y los residuos según la reglamentación nacional, federal, estatal y local.

Nota: para la eliminación de residuos líquidos, consulte la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**.

Limpieza de derrames

- El reactivo LYS-1 contiene tiocianato de guanidina. Si se derrama líquido que contenga tiocianato de guanidina, límpielo con un detergente apto para laboratorio y agua. Si el líquido vertido contiene agentes potencialmente infecciosos, limpie PRIMERO el área afectada con detergente para laboratorio y agua y, a continuación, con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Si el derrame se produce sobre el **cobas®** 4800 instrument, siga las instrucciones de limpieza que se detallan en la Asistencia al usuario del **cobas®** 4800 System.
- No utilice soluciones de hipoclorito de sodio (lejía) para limpiar el equipo **cobas® x** 480 o el analizador **cobas® z** 480. Limpie el **cobas® x** 480 instrument o el **cobas® z** 480 analyzer según los procedimientos descritos en la Asistencia al usuario correspondiente del **cobas®** 4800 System.

Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras

Nota: manipule todas las muestras como si pudieran transmitir agentes infecciosos.

Obtención de las muestras

Recoja las muestras de heces amorfas en un recipiente estéril. Las muestras deben obtenerse de acuerdo con el procedimiento documentado en las prácticas normalizadas de trabajo de su centro.

Almacenamiento y estabilidad de las muestras durante el transporte

Las muestras de heces amorfas permanecen estables a una temperatura de 2-30 °C durante 2 días o bien a 2-8 °C durante 7 días o a -20 °C durante 60 días antes de proceder a su análisis en el sistema **cobas**® 4800 (datos comprobados con el análisis de muestras después de un almacenamiento consecutivo a 30 °C ± 1 °C durante 2 días, seguido de un almacenamiento a 2-8 °C durante 5 días y, finalmente, un almacenamiento a -20 °C durante 60 días).

Una muestra de heces mezclada con **cobas**® PCR Media se mantiene estable a 2-8 °C durante 60 días o a 30 °C durante 7 días antes de analizarla en el sistema **cobas**® 4800.

El transporte de las muestras de *C. difficile* debe cumplir la reglamentación nacional, federal, estatal y local para el transporte de agentes etiológicos.

Procedimiento analítico

Realización de la prueba

Flujo de trabajo

Ilustración 1: Flujo de trabajo de cobas® Cdiff

1	Inicie el sistema.
2	Efectúe el mantenimiento del equipo.
3	Extraiga las muestras y los reactivos del almacenamiento.
4	Inicie la serie analítica: • Cargue los transportadores con las muestras.
5	Con LIS: confirme la petición de trabajo. Sin LIS: cree la petición de trabajo.
6	Cargue los consumibles (placa de plasmoteca, placa de PCR, bandejas de puntas) y los reactivos.
7	Inicie la serie de preparación de las muestras.
8	Descargue y selle la placa de PCR.
9	Retire las muestras, los reactivos utilizados y la placa de plasmoteca.
10	Cargue la placa de PCR en el analizador.
11	Revise los resultados.
12	Con LIS: envíe los resultados al LIS.
13	Descargue el analizador.

Instrucciones de uso

Todos los reactivos, excepto Cdiff MMX y Cofactor-3, deben estar a temperatura ambiente antes de introducirlos en el equipo **cobas® x 480**. Los reactivos Cdiff MMX y Cofactor-3 pueden obtenerse directamente del almacenamiento a 2-8 °C, puesto que alcanzarán la temperatura ambiente para cuando vayan a ser utilizados después de cargarse en el equipo **cobas® x 480**.

Nota: consulte la **Asistencia al usuario del cobas® 4800 System** para obtener información detallada sobre el funcionamiento.

Tamaño de la serie

El sistema **cobas® 4800** admite la modalidad de lote mixto entre las pruebas **cobas® MRSA/SA**, **cobas® Cdiff** y **cobas® HSV 1 y 2**. El kit de preparación de muestras genérico para el sistema **cobas® 4800**, el kit de lisis 1 genérico para el sistema **cobas® 4800** y el kit de tampón de lavado genérico para el sistema **cobas® 4800** se encuentran disponibles en dos tamaños de kit, ambos suficientes para 10 series de hasta 24 o 96 muestras, y que incluyen controles y muestras para el análisis de todos los ensayos. El kit de amplificación/detección **cobas® 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit** es suficiente para analizar un máximo de 80 muestras e incluye controles y muestras de Cdiff para el análisis. Pueden utilizarse varios viales de reactivo de mezcla maestra **cobas® 4800 Cdiff** tal como sea necesario en una serie, siempre y cuando sean del mismo tamaño de kit. El kit de control interno 1 genérico para el sistema **cobas® 4800** y el kit de controles y cofactor **cobas® 4800 Cdiff** se encuentran disponibles en un único tamaño de kit y admiten todas las configuraciones de series de análisis. Para cada serie con muestras de *C. difficile*,

se deben utilizar un control positivo **cobas® 4800 Cdiff** y un control negativo para el sistema **cobas® 4800** (consulte el apartado “**Control de calidad**”). Para una serie de análisis individual, el número máximo de muestras permitido es 94 muestras y 2 controles.

Nota: se puede utilizar un reactivo genérico para 96 pruebas para una serie de 1-22 muestras, si bien no supone una utilización óptima de los reactivos. Sin embargo, no es posible mezclar tamaños distintos del kit de tampón de lavado para el sistema **cobas® 4800 (WB)**, del kit de preparación de muestras para el sistema **cobas® 4800** ni del kit de lisis 1 para el sistema **cobas® 4800**. Por ejemplo, si se escanea una botella de reactivo WB para 96 pruebas en el momento de iniciar la serie analítica, es preciso utilizar reactivos con un tamaño para 96 pruebas de los otros dos kits.

Flujo de trabajo

La prueba **cobas® Cdiff** se realiza mediante el flujo de trabajo completo del programa **cobas® 4800**. Consta de la preparación de las muestras en el **cobas® x 480 instrument** y la posterior fase de amplificación/detección en el **cobas® z 480 analyzer**. La serie puede analizarse únicamente para la prueba Cdiff o bien en la modalidad de lote mixto con las pruebas **cobas® MRSA/SA** y/o **cobas® HSV 1 y 2**. Consulte la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System** para obtener información detallada.

Transferencia de las muestras a un tubo **cobas® PCR Media**

1. Utilice una torunda de poliéster para transferir las heces al tubo **cobas® PCR Media**. Si corresponde, descarte la segunda torunda incluida en el paquete. Sin tocar el lateral del recipiente de las heces, sumerja la punta de la torunda completamente en la muestra fecal, hasta el final de la sección cónica. A continuación, extráigala inmediatamente e introduzca la torunda inoculada dentro del tubo **cobas® PCR Media**. No analice la muestra si no hay heces suficientes para sumergir por completo la punta de la torunda.

2. Rompa el mango de la torunda por la marca de muesca gris aplicando presión contra el lateral del tubo. Tape el tubo y agite durante un mínimo de 5 segundos. Quite el tapón y coloque el tubo en una bandeja de transporte de muestras de 24 posiciones para su procesamiento. Deseche el tapón.

Nota: se ha validado el uso de la prueba **cobas® Cdiff** con el **cobas® PCR Media Kit**, **cobas® PCR Media Uni Swab Sample Kit** y el **cobas® PCR Media Dual Swab Sample Kit**. No utilice otros tipos de dispositivos o medios de recogida.

Nota: utilice únicamente una torunda de poliéster para transferir las heces. Un exceso de heces transferidas al tubo **cobas® PCR Media** puede causar coágulos y/o resultados no válidos.

Nota: las muestras fecales deben transferirse a tubos **cobas® PCR Media** etiquetados con un código de barras adecuado para su procesamiento en el equipo **cobas® x 480**. Consulte la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System** para conocer los procedimientos adecuados referentes a los códigos de barras y la lista de códigos de barras compatibles con el **cobas® 4800 System**.

Nota: para evitar la contaminación cruzada de las suspensiones de muestras de heces en **cobas® PCR Media**, utilice tapones adicionales para el recipiente de **cobas® PCR Media** de un color distinto (neutro, consulte el apartado “Material opcional”) para volver a tapar las muestras después de procesarlas.

Nota: **cobas® PCR Media** contiene volumen suficiente para analizar la suspensión de heces varias veces en el sistema **cobas® 4800**. El volumen mínimo de suspensión de heces para realizar la prueba **cobas® Cdiff** es de 3 ml en el tubo **cobas® PCR Media**.

Realización de la prueba cobas® Cdiff

Nota: es posible realizar series de lote mixto entre las pruebas cobas® MRSA/SA y cobas® Cdiff y/o cobas® HSV 1 y 2. Consulte la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System para obtener más información.

1. Inicie el sistema y lleve a cabo los procedimientos de mantenimiento con ayuda de las instrucciones que aparecen en la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**.
2. Reúna todos los reactivos y consumibles necesarios. Los reactivos deben encontrarse a temperatura ambiente en el momento de iniciar la serie, a excepción de los reactivos MMX y Cofactor-3 para **cobas® Cdiff**.

Nota: todos los reactivos y los depósitos de reactivos tienen códigos de barras y están diseñados para un solo uso. El programa cobas® 4800 realiza un seguimiento del uso de los reactivos y de los depósitos de reactivos y rechaza los reactivos o depósitos de reactivos usados previamente.

3. Inicie una serie nueva y defina una petición de trabajo para la misma. Existen tres formas de crear una petición:
 - Mediante el editor de muestras antes de cargar la bandeja de muestras en el equipo **cobas® x 480** (botón “Editor” a la derecha del menú principal). Las peticiones de trabajo pueden guardarse, editarse y recargarse en caso necesario.
 - Mediante las instrucciones del asistente del programa para realizar una serie nueva y la carga de las muestras en el equipo **cobas® x 480** cuando se le solicite. Los códigos de barras de las muestras se escanean automáticamente y deben definirse los resultados solicitados para cada muestra.
 - Mediante el sistema LIS de su centro.

Consulte la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System** para obtener información detallada. Elija “Cdiff” cuando seleccione los resultados solicitados.

4. Cargue las muestras y defina/seleccione la petición de trabajo o utilice el LIS, según corresponda. La opción “Unload sample carriers after transferring to deep well plate” está seleccionada de forma predeterminada. Esta opción permite al usuario recuperar las muestras de suspensiones de heces restantes tan pronto como sea posible después de extraer alícuotas para su procesamiento en el equipo **cobas® x 480**. Los recipientes de suspensiones de heces deben volverse a tapar con un dispositivo de cierre nuevo (consulte el apartado “**Material opcional**”) si precisan almacenamiento.
5. Siga las instrucciones del asistente del programa y cargue los consumibles. No cargue ni extraiga puntas individuales en una bandeja para puntas parcialmente utilizada puesto que el programa controla el número de puntas que quedan. En el caso de no haber puntas suficientes para realizar la serie, el programa emitirá una alerta para el usuario.
6. Cargue los reactivos para la preparación de las muestras en los depósitos de reactivos con código de barras. Los depósitos de reactivos están disponibles en dos tamaños: 200 ml y 50 ml. Siga las instrucciones del asistente del programa para seleccionar el tamaño correcto de depósito de reactivo. Los códigos de barras de los depósitos de reactivos deben estar colocados frente al lateral derecho de la bandeja. Utilice el método de doble identificación y llenado para cargar los reactivos para la preparación de las muestras:
 - Leer el código de barras de la botella de reactivo
 - Leer el código de barras del depósito de reactivo
 - Verter el reactivo en el depósito

- Colocar el depósito lleno de reactivo en la posición indicada de la bandeja de reactivos

Nota: el sistema cobas® 4800 posee un reloj interno que supervisa el tiempo que llevan cargados los reactivos. Tras leer el WB, se concede 1 hora para completar el proceso de carga y hacer clic en el botón “Start”. En la pestaña “Workplace” aparece un cronómetro de cuenta atrás. El sistema no permite iniciar la serie si se ha superado el tiempo de carga permitido.

Nota: para garantizar una transferencia precisa de MGP, agite contundentemente el vial de MGP justo antes de dispensarlo en el depósito de reactivo.

7. Cargue los reactivos de amplificación/detección (Cdiff MMX y Cofactor-3), la proteinasa K (PK) y los controles [Cdiff (+) C, IC y (-) C] directamente en el transportador de reactivos. A fin de evitar la contaminación, cámbiese de guantes después de manipular los controles positivos.

Nota: el asistente del programa calculará el número óptimo y el tamaño del reactivo cobas® Cdiff MMX que debe utilizarse. El resultado se mostrará en la columna “Kit size” de la pantalla de carga de MMX y Cofactor. Para utilizar un tamaño distinto del reactivo cobas® Cdiff MMX, haga clic en el botón “Change kit size”.

8. Haga clic en “Start Run” para iniciar la preparación de las muestras.
9. Si la serie de preparación de las muestras se realiza correctamente, se activan los botones “Sample Preparation results” y “Unload”. Si lo desea, seleccione el botón “Sample Preparation results” para revisar los resultados y luego seleccione “Unload” para descargar los transportadores de placas. También puede seleccionar “Unload” para descargar el transportador de placas sin revisar los resultados. Consulte la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System.
10. Siga las instrucciones indicadas en la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System para sellar la microplaca, transportar la placa al cobas® z 480 analyzer y empezar la serie de amplificación y detección.

Nota: el sistema cobas® 4800 posee un reloj interno que supervisa el tiempo transcurrido tras añadir las muestras preparadas a la mezcla maestra activada. La amplificación y la detección se deben iniciar tan pronto como sea posible, nunca después de los 90 minutos posteriores a la finalización de la serie del cobas® x 480 instrument. En la pestaña “Workplace” aparece un cronómetro de cuenta atrás. El sistema cancela la serie si el cronómetro agota el tiempo.

11. Cuando termine la serie de amplificación y detección, descargue la microplaca del cobas® z 480 analyzer.
12. Siga las instrucciones de la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System para revisar y aceptar los resultados.

Resultados

Control de calidad y validez de los resultados

En cada serie se incluye un juego de control positivo y negativo para la prueba **cobas**® Cdiff. Para todas las series, es necesario haber obtenido resultados válidos tanto para el control positivo como para el control negativo para que el programa **cobas**® 4800 muestre los resultados de la prueba **cobas**® Cdiff de dicha serie.

Control positivo

El control Cdiff (+) contiene ADN plasmídico no infeccioso de *C. difficile*. El control Cdiff (+) supervisa los pasos de extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos en una serie concreta de la prueba. El resultado del control Cdiff (+) debe tener el valor "Valid". Si los resultados obtenidos para el control Cdiff (+) no son válidos de forma recurrente, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

Control negativo

El control (-) debe tener el valor "Valid". Si los resultados obtenidos para el control (-) no son válidos de forma recurrente, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

Control interno

El control interno es un bacteriófago lambda recombinante que contiene secuencias aleatorias y fragmentos objetivo de los cebadores y la sonda específicos para el control interno. El control interno debe añadirse a todas las pruebas y a los controles positivos y negativos durante la preparación de las muestras en el equipo **cobas**® x 480. El control interno supervisa los pasos de extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos en una muestra concreta. El control interno también se requiere para la validación de los controles de la serie.

Interpretación de los resultados

Nota: el programa cobas® 4800 lleva a cabo la validación de los ensayos y las series.

Nota: una serie válida puede incluir resultados de muestras tanto válidos como no válidos.

En las series consideradas válidas, los resultados de las muestras se interpretan tal como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1 Interpretación de los resultados de la prueba cobas® Cdiff

Prueba cobas® Cdiff	Notificación e interpretación de los resultados
POS Cdiff	Positiva para Cdiff La muestra es positiva para la presencia de ADN de <i>C. difficile</i> .
NEG Cdiff	Negativa para Cdiff* No se ha podido detectar el ADN de <i>C. difficile</i> , si está presente.
Invalid	No válida El resultado no es válido. La muestra original debe volver a analizarse para obtener resultados válidos. Coloque un tapón nuevo en el tubo que contiene la suspensión de heces que ha originado el resultado no válido y agite durante 5 segundos como mínimo. Añada 0,5 ml de la suspensión de heces agitada a un nuevo tubo cobas® PCR Media con medio. Tape el tubo diluido y agite durante un mínimo de 5 segundos. Quite el tapón y coloque el tubo diluido en un transportador de muestras de 24 posiciones para su procesamiento.
Failed	Muestra sin resultados Consulte la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System para obtener instrucciones sobre la revisión de los avisos de la serie y las acciones recomendadas. En casos excepcionales, cuando se produce un error de pipeteo (p. ej., un coágulo u otra obstrucción), el tubo con la suspensión de la muestra de heces original debe cerrarse con un tapón nuevo e introducirse en una centrífuga. Acelere hasta una FCR de 1.800 (o $1.800 \times g$) y, a continuación, detenga la centrífuga. Asegúrese de que el vial no se agita ni mezcla después de la centrifugación. Quite el tapón y coloque el tubo en un transportador de muestras de 24 posiciones para su procesamiento.

* Un resultado negativo no implica la presencia de ADN de *C. difficile* porque los resultados dependen de una recogida adecuada de las muestras, de la ausencia de inhibidores y de que haya ADN suficiente para detectarlo.

Pueden obtenerse resultados no válidos si la muestra contiene un exceso de heces o sustancias inhibidoras que impiden la extracción y/o amplificación y detección de los ácidos nucleicos del fragmento objetivo. Consulte el apartado

“Limitaciones del procedimiento” para obtener una lista de las sustancias interferentes.

Nota: el volumen mínimo de la suspensión de heces necesario para la prueba cobas® Cdiff es de 3 ml.

Lista de avisos de resultados

En la siguiente tabla se indican los avisos relevantes para la interpretación de los resultados.

Tabla 2 Lista de avisos para la prueba cobas® Cdiff

Prueba cobas® Cdiff	Prueba cobas® Cdiff	Notificación e interpretación de los resultados
R20	El control positivo no es válido.	Un control externo no es válido. 1. Repita toda la serie con reactivos nuevos. 2. Si el problema persiste, póngase en contacto con el servicio técnico de Roche.
R21	El control negativo no es válido.	Un control externo no es válido. 1. Repita toda la serie con reactivos nuevos. 2. Si el problema persiste, póngase en contacto con el servicio técnico de Roche.
X3	Error: se ha detectado un coágulo y no se ha podido procesar la muestra.	Asegúrese de que las muestras se hayan manipulado según la descripción del flujo de trabajo. 1. Compruebe que no haya coágulos en la muestra. 2. Vuelva a analizar la muestra.
X4	Error: se ha producido un error de pipeteo. No se ha procesado la muestra.	Lo más probable es que el volumen de muestra sea insuficiente o se haya producido un error mecánico durante el pipeteo. 1. Asegúrese de que haya volumen de muestra suficiente. 2. Compruebe que la placa de expulsión de puntas esté bien colocada. 3. Vuelva a analizar la muestra.

Limitaciones del procedimiento

1. La prueba cobas® Cdiff únicamente ha sido validada para su uso con muestras de heces amorfas transferidas a tubos cobas® PCR Media de acuerdo con el presente documento de instrucciones de uso.
2. La obtención de resultados fiables depende de que la obtención, el transporte, el almacenamiento y el procesamiento de las muestras sean adecuados. Siga los procedimientos que encontrará en este documento de instrucciones de uso (también denominado “metódica del reactivo”) y la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System.
3. La detección de ADN de *C. difficile* depende del número de organismos presentes en la muestra y puede verse afectada por los métodos de obtención/procesamiento de las muestras, el historial de hospitalización, el régimen de tratamiento con antibióticos y las cepas de *C. difficile*.
4. Pueden obtenerse falsos negativos o resultados no válidos debido a la interferencia de diversas sustancias. En la prueba cobas® Cdiff se incluye un control interno para identificar las muestras que contengan sustancias que puedan interferir en el aislamiento de ácidos nucleicos y la amplificación mediante PCR. Entre las sustancias interferentes conocidas se incluyen, entre otras:
 - Las muestras con un contenido superior al 25% (p/v) de mucina pueden generar resultados falsos negativos.

5. Un resultado positivo indica la presencia de ADN de *C. difficile* y no necesariamente de organismos viables. Por lo tanto, un resultado positivo no implica forzosamente un fallo en el tratamiento de erradicación.
6. Las mutaciones o los polimorfismos en las regiones de unión de los cebadores o las sondas pueden interferir en la detección de variantes nuevas o no conocidas, lo que resulta en un falso negativo con la prueba **cobas®** Cdiff.
7. El valor predictivo de un ensayo depende de la prevalencia de la enfermedad en una población concreta.
8. La incorporación de la enzima AmpErase a la mezcla maestra **cobas®** 4800 Cdiff permite realizar una amplificación selectiva del ADN objetivo; no obstante, es imprescindible utilizar las prácticas de laboratorio recomendadas y cumplir estrictamente los procedimientos especificados en este documento de instrucciones de uso para evitar la contaminación de los reactivos y de las mezclas de amplificación.
9. El uso de este producto debe limitarse al personal con experiencia en el empleo de técnicas de PCR y la utilización del sistema **cobas®** 4800.
10. Solamente el equipo **cobas®** x 480 y el analizador **cobas®** z 480 se han validado para su uso con este producto. No debería utilizarse ningún otro equipo de preparación de muestras ni sistema de PCR con este producto.
11. Debido a las diferencias específicas entre tecnologías, se recomienda a los usuarios que, antes de cambiar de una a otra, realicen estudios de correlación en el laboratorio para identificar las diferencias tecnológicas y verificar el nuevo procedimiento. No cabe esperar un porcentaje de concordancia del 100% entre los resultados debido a las diferencias entre tecnologías indicadas anteriormente.
12. La contaminación cruzada puede causar resultados falsos positivos. El sistema **cobas®** 4800 es un equipo automatizado de PCR en tiempo real diseñado para reducir al mínimo el riesgo de contaminación cruzada durante el procesamiento de las muestras, la extracción de ácidos nucleicos, la amplificación y la detección. Para poner a prueba la solidez del sistema, se simuló un estudio no clínico con configuración de tablero de ajedrez a partir de un panel formado por muestras alternas de positivos altos y negativos artificiales a fin de valorar una tasa de contaminación cruzada hipotética del sistema. Las muestras positivas altas generaron valores de Ct antes de lo que cabría observar en el 95% de los pacientes infectados de la población objetivo. La tasa de contaminación cruzada en este estudio con configuración de tablero de ajedrez fue del 0,24% (1/423). Las tasas de contaminación cruzada en entornos clínicos dependen de la proporción de muestras positivas altas y la prevalencia de la enfermedad. Cabe esperar una reducción drástica de las tasas de contaminación cruzada clínica habitual respecto a las obtenidas en este estudio, que deberán valorarse en un contexto práctico.

Evaluación no clínica del rendimiento

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica (límite de detección o LOD) de la prueba **cobas**® Cdiff se ha determinado mediante el análisis cuantitativo de cultivos de *C. difficile* diluidos a varios niveles de concentración en suspensión de material de referencia de heces negativo recogido en **cobas**® PCR Media. Se analizaron todos los niveles de concentración con la prueba **cobas**® Cdiff con tres lotes exclusivos de reactivos de la prueba **cobas**® Cdiff. Como mínimo, se analizaron 21 réplicas por lote de reactivo de cada nivel. El LOD de esta prueba es la concentración objetivo que puede detectarse como positiva en $\geq 95\%$ de las réplicas analizadas, según los resultados generados por el lote de reactivos con un peor rendimiento.

Las siete cepas de *C. difficile* analizadas en el estudio de sensibilidad analítica se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 LOD (límite de detección) de la prueba **cobas**® Cdiff

ID de la cepa	Toxinotipo	Tipo REA*	Tipo PFG†	Ribotipo	Fenotipo	LOD (UFC/torunda)	
						Por tasa de positividad	Por análisis Probit
ATCC 43255 (VPI 10463)	0	N/D	N/D	087	A+B+CDT-	113	90
ATCC BAA-1382 (630)	0	R 23	N/D	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	N/D	N/D	078	N/D	54	45
ATCC 43598 (1470)	VIII	N/D	N/D	017	A-B+	225	130
F15	XII	N/D	N/D	N/D	N/D	54	59

*Análisis por endonucleasas de restricción; †Gel de campo pulsante

Detección de genotipos de *C. difficile*

Se comprobó el límite de detección de la prueba **cobas**® Cdiff para 28 cepas toxigénicas representativas de toxinotipos adicionales mediante el análisis de 40 réplicas por nivel en varios niveles. Las diluciones y muestras para el análisis se prepararon de manera similar al estudio del límite de detección (LOD) descrito anteriormente. En la Tabla 4 se indica el nivel mínimo con una tasa de positividad observada de un 95% como mínimo.

Las 28 cepas toxigénicas (Tabla 4) se detectaron como positivas en $\geq 95\%$ de las réplicas analizadas en concentraciones comprendidas entre 77,9 UFC/torunda y 460 UFC/torunda.

Tabla 4 Resumen de los resultados de verificación de cepas toxigénicas de *C. difficile*

Cepa	Toxinotipo	Ribotipo	Conc. (UFC/torunda)	Tasa de positividad
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	N/D	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	N/D	460	97,5%
K095	XVIII	014	234	95,0%
TR13	XIX	N/D	234	97,5%
TR14	XX	N/D	77,9	100,0%
CH6223	XXI	N/D	234	100,0%
CD07-468	XXII	N/D	234	100,0%
8785	XXIII	N/D	234	95,0%
597B	XXIV	131	234	97,5%
7325	XXV	027	234	100,0%
7459	XXVI	N/D	234	95,0%
KK2443-2006	XXVII	N/D	234	100,0%
CD08-070	XXVIII	126	234	97,5%
CD07-140	XXIX	056	234	97,5%
ES 130	XXX	N/D	234	100,0%
WA 151	XXXI	N/D	460	100,0%

Precisión

Se realizó un estudio de precisión interna con un panel compuesto por cultivos de *C. difficile* diluidos en suspensión de heces negativas en cobas® PCR Media en niveles de concentración inferiores al límite de detección (LOD), cercanos al LOD y superiores al LOD de la prueba cobas® Cdiff. También se analizó un nivel negativo compuesto únicamente por la suspensión de heces en cobas® PCR Media. En el estudio se utilizaron tres lotes únicos de reactivos de la prueba cobas® Cdiff y tres instrumentos para un total de 36 series realizadas durante 12 días. En la Tabla 5 figura una descripción de los paneles de precisión y un resumen del estudio. El análisis de los componentes de variación (Tabla 6) sugiere que la mayor variabilidad de los valores de Ct objetivo es atribuible a factores dentro de una serie analítica (aleatorios) y factores entre lotes (60,0% y 25,3%, respectivamente) para un nivel de concentración igual o cercano al LOD. Para un nivel de concentración superior al LOD, la mayor parte de la variabilidad del valor de Ct responde a factores internos de la serie (aleatorios) y entre equipos (72,5% y 24,7%, respectivamente). Los resultados (Tabla 7) muestran un CV (%) global para los valores de Ct del fragmento objetivo de un 1,5% para un nivel de concentración igual al LOD y de un 1,1% para un nivel de concentración superior al LOD.

Tabla 5 Análisis de la tasa de positividad del estudio de precisión interna

Miembro del panel	N pruebas	N positivos	Tasa de positividad	LC al 95%	
				Inferior	Superior
Negativo	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 = Límite de detección

Tabla 6 Análisis de los componentes de variación para los miembros del panel de precisión

Nivel	Media	Componentes de variación/Porcentaje de contribución al total					Total
		Lote	Instrumento	Tamaño del kit	Día	Aleatorios	
~ 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 = Límite de detección

Tabla 7 Análisis de las desviaciones estándar y los coeficientes de variación (%) de los miembros del panel de precisión

Nivel	Media	SD componentes/CV (%)					Total
		Lote	Instrumento	Tamaño del kit	Día	Aleatorios	
~ 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 = Límite de detección

Especificidad analítica

Para valorar la especificidad analítica de la prueba **cobas**® Cdiff se analizaron los siguientes paneles de organismos: 1) 103 bacterias, hongos y virus que pueden estar presentes en muestras de heces y una célula humana (Tabla 8); 2) se añadieron 28 organismos del género *Clostridiaceae*, incluido *C. difficile* no toxigénico (* citomegalovirus (HHV5) en una concentración de $2,0 \times 10^3$ UFP/ml, adenovirus humano de tipo 40 en una concentración de $2,2 \times 10^3$ UFP/ml, y rotavirus humano en una concentración de $9,8 \times 10^3$ UFP/ml para el análisis; Tabla 9).

Se añadieron todas las bacterias y células humanas en una concentración de 1×10^6 unidades*/ml y se añadieron todos los virus a 1×10^5 unidades*/ml, a excepción del citomegalovirus (HHV5), el adenovirus humano tipo 40 y el rotavirus humano, los cuales se añadieron en concentraciones inferiores debido a las limitaciones de concentración de stock. El análisis se realizó solamente con los organismos o con dos aislados *C. difficile* presentes individualmente con un límite de detección (LOD) 3x de la prueba **cobas**® Cdiff. Los resultados indican que ninguno de los organismos interfiere en la detección de los fragmentos objetivo de Cdiff. Tampoco generaron resultados falsos positivos en ausencia del fragmento objetivo de *C. difficile* previsto.

La especificidad analítica del *Clostridium botulinum* se confirmó mediante el programa BLAST frente a una base de datos de secuencias de nucleótidos, GenBank, para reproducir el paso de generación de amplicones de la PCR.

* Las bacterias se cuantificaron como unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, las células humanas como células/ml y los virus como unidades formadoras de placas (UFP)/ml, excepto los siguientes micro-organismos. La *Chlamydia trachomatis* se cuantificó como cuerpo elemental (CE)/ml. El citomegalovirus, el echovirus humano y el enterovirus humano se cuantificaron en UI/ml.

Tabla 8 Microorganismos y células humanas

<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>Bacteriodes 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>	Células humanas HCT-15	<i>Helicobacter fennelliae</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subesp. <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> subesp. <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> subesp. <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>	Citomegalovirus (HHV5)*	Adenovirus humano tipo 40*
Coxsackievirus humano A10	Enterovirus humano 11	Enterovirus humano 71
Rotavirus humano*	Norovirus GI	-

*El citomegalovirus (HHV5) se añadió a $2,0 \times 10^3$ UFP/ml, el adenovirus humano tipo 40 a $2,2 \times 10^3$ UFP/ml y el rotavirus humano a $9,8 \times 10^3$ UFP/ml.

Tabla 9 Organismos del género *Clostridiaceae*, incluido el no toxigénico *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> serogrupo B (no toxigénico)	<i>Clostridioides difficile</i> serogrupo I (no toxigénico)	<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> (nueva denominación, <i>Flavonifractor plautii</i>)	<i>Clostridium paraputrificum</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Clostridium ramosum</i>	<i>Clostridium scindens</i>	<i>Clostridium septicum</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Clostridium sphenoides</i>	<i>Clostridium spiroforme</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Clostridium symbiosum</i>	<i>Clostridium tertium</i>
<i>Clostridium tetani</i>	-	-

* Según el programa BLAST.

Interferencia

Se analizaron veintiséis medicamentos de uso frecuente, así como grasa fecal, sangre total y mucina, para detectar posibles efectos de interferencia con la prueba **cobas**® Cdiff. Todas las sustancias se analizaron con niveles superiores a lo que cabría esperar razonablemente en una torunda con heces. La cantidad de sustancias interferentes se expresa como concentración en muestras de heces primarias. Se añadieron dos aislados *C. difficile* al límite de detección (LOD) 3x de la prueba **cobas**® Cdiff y se utilizaron como valores objetivo de los ensayos. No se observaron interferencias de sustancias exógenas. En el caso de la grasa fecal, no se observaron interferencias hasta el 28%, para la sangre total, hasta el 50% y para la mucina, hasta el 25%. Los resultados se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10 Resultados del análisis de sustancias interferentes

Sustancia	Concentración	Resultados
Grasa fecal	4 ~ 28% (p/v)	Sin interferencias
Sangre total	25, 50% (v/v)	Sin interferencias
Mucina	25, 50% (p/v)	Sin interferencias hasta el 25% (p/v)
Tums	10% (p/v)	Sin interferencias
Vancomicina	1% (p/v)	Sin interferencias
Metronidazol	10% (p/v)	Sin interferencias
Imodium AD®	10% (p/v)	Sin interferencias
Ablandador de heces	10% (p/v)	Sin interferencias
Pepto-Bismol® (Procter & Gamble)	10% (v/v)	Sin interferencias
Pomada Nystatin USP	10% (p/v)	Sin interferencias
Crema Preparation H® con Bio-Dyne® (Wyeth)	10% (p/v)	Sin interferencias
GYNOL II	10% (p/v)	Sin interferencias
Crema contra el picor Vagisil®	10% (p/v)	Sin interferencias
Anusol® Plus	10% (p/v)	Sin interferencias
Pantalla solar	1% (p/v)	Sin interferencias
Monistat® 7	10% (p/v)	Sin interferencias
Vaseline™	10% (p/v)	Sin interferencias
Supositorios SAB-Dimenhydrinate® (SABEX®)	10% (p/v)	Sin interferencias
Aceite mineral	10% (v/v)	Sin interferencias
Laxante vegetal natural Equate	10% (p/v)	Sin interferencias
Dulcolax®	10% (p/v)	Sin interferencias
Fleet® (CB Fleet Company)	10% (p/v)	Sin interferencias
K-Y Jelly/Gelée® (McNeil-PPC)	1% (p/v)	Sin interferencias
Aerosol nasal Afrin Original	10% (v/v)	Sin interferencias
Hamamelis virginiana	Líquido de 1 toallita/torunda	Sin interferencias
Sulfato de bario de alta densidad para suspensión E-Z-HD™ (E-Z-EM Canada)	20% (p/v)	Sin interferencias
Ácido palmítico	10% (p/v)	Sin interferencias
Ácido esteárico	10% (p/v)	Sin interferencias
Aleve	10% (p/v)	Sin interferencias

Rendimiento clínico con muestras clínicas

Se comparó el rendimiento de la prueba **cobas**® Cdiff con el de la prueba NAT comparativa más avanzada autorizada por la FDA y con marcado CE. Como método de referencia se utilizó un ensayo de citotoxicidad de cultivo tisular en aislados *C. difficile* procedentes de cultivo directo. Se analizaron muestras de heces obtenidas en 3 hospitales/centros médicos mediante la prueba **cobas**® Cdiff y la prueba NAT comparativa y se enviaron a un laboratorio de referencia para el ensayo de citotoxicidad del cultivo tisular.

La prueba **cobas**® Cdiff y la prueba NAT comparativa más avanzada se realizaron según las instrucciones del fabricante. El ensayo de citotoxicidad del cultivo tisular se llevó a cabo con un procedimiento de cultivo directo. Cada muestra de heces se inoculó en un agar cicloserina cefoxitina fructosa (CCFA-HT) reducido previamente. Las colonias sospechosas se identificaron como *C. difficile* mediante tinción de Gram, aerointolerancia y mediante la prueba Pro-Disk y se inocularon en caldo de carne picada anaeróbico. Los sobrenadantes obtenidos del caldo de carne picada anaeróbico se procesan a continuación para la detección de la toxina B del *C. difficile* mediante el ensayo de citotoxicidad de cultivo tisular (prueba C. DIFFICILE TOX-B, Techlab).

El estudio se realizó con un total de 1.434 sujetos procedentes de cinco centros. Se excluyeron 156 sujetos a causa de resultados incompletos. Había 152 muestras positivas para *C. difficile* mediante cultivo directo (prevalencia: 11,9%). En la Tabla 11 y en la Tabla 12 se muestra el rendimiento de la prueba **cobas**® Cdiff y de la prueba NAT comparativa en cultivo directo.

Tabla 11 Prueba **cobas**® Cdiff en cultivo directo

		Cultivo directo		
		Positivo	Negativo	Total
Prueba cobas ® Cdiff	Positiva	147	30	177
	Negativa	5	1.096	1.101
	Total	152	1.126	1.278

Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad y la especificidad de la prueba **cobas**® Cdiff en cultivo directo son del 96,7% (intervalo de confianza bilateral al 95%: 92,5-98,6%) y del 97,3% (intervalo de confianza bilateral al 95%: 96,2-98,1%), respectivamente.

Valor predictivo positivo y negativo

Los valores predictivos positivo y negativo de la prueba **cobas**® Cdiff para las muestras del estudio son del 83,1% (intervalo de confianza bilateral al 95%: 76,7-88,3%) y del 99,5% (intervalo de confianza bilateral al 95%: 98,9-99,9%), respectivamente.

Tabla 12 Prueba de ácidos nucleicos (NAT) comparativa en cultivo directo

		Cultivo directo		
		Positivo	Negativo	Total
NAT comparativa	Positiva	147	29	176
	Negativa	5	1.097	1.102
	Total	152	1.126	1.278

Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad y la especificidad de la prueba NAT comparativa en cultivo directo son del 96,7% (intervalo de confianza bilateral al 95%: 92,5-98,6%) y del 97,4% (intervalo de confianza bilateral al 95%: 96,3-98,2%), respectivamente.

Correlación con respecto a la prueba NAT comparativa

En la Tabla 13 se muestra el rendimiento de la prueba **cobas**® Cdiff comparándola directamente con la prueba NAT comparativa más avanzada autorizada por la FDA y con marcado CE.

Tabla 13 Comparación de los resultados de la prueba **cobas**® Cdiff con los de la prueba de ácidos nucleicos (NAT)

		NAT comparativa		
		Positiva	Negativa	Total
Prueba cobas® Cdiff	Positiva	167	10	177
	Negativa	9	1.092	1.101
	Total	176	1.102	1.278

Porcentaje de concordancia de resultados positivos y negativos

Los porcentajes de concordancia de resultados positivos y negativos de la prueba **cobas**® Cdiff con respecto a la prueba NAT comparativa son del 94,9% (intervalo de confianza bilateral al 95%: 90,6-97,3%) y del 99,1% (intervalo de confianza bilateral al 95%: 98,3-99,5%), respectivamente.

Información adicional

Características principales del ensayo

Tipo de muestra	Muestras de heces amorfas
Cantidad de muestra necesaria	4,3 ml de cobas ® PCR Media en el vial primario; se necesitan 3 ml como mínimo para una prueba cobas ® Cdiff.
Duración de la prueba	Los resultados están listos al cabo de 2,5 horas de la carga de la muestra en el sistema (entre 1 y 22 muestras)..
Sensibilidad analítica	Entre 54 y 460 UFC/torunda según el aislado.
Especificidad	Sin reactividad cruzada con 125 organismos estrechamente relacionados o que suelen estar presentes en las muestras de heces.
Inclusividad	Todas las cepas conocidas de <i>C. difficile</i> (toxintipos 0 ~ XXXI, excepto los toxintipos XI no toxigénicos) incluida la cepa epidémica hipervirulenta BI/ NAP1/027.

Símbolos

Los símbolos siguientes se emplean en el rotulado de todos los productos de diagnóstico por PCR de Roche.

Tabla 14 Símbolos utilizados para el etiquetaje de los productos de PCR para diagnóstico de Roche

Age/DOB	Edad o fecha de nacimiento		Dispositivo no apto para pruebas cerca del paciente	QS IU/PCR	UI de QS por reacción de PCR, utilice las unidades internacionales (UI) de QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.
	Software auxiliar		Dispositivo no apto para autoexamen	SN	Número de serie
Assigned Range [copies/mL]	Intervalo asignado (copias/ml)		Distribuidor (Nota: el país o la región se indicará debajo de este símbolo.)	Site	Centro
Assigned Range [IU/mL]	Intervalo asignado (UI/ml)		No deben reutilizarse	Procedure Standard	Procedimiento estándar
EC REP	Representante autorizado en la Comunidad Europea		Mujeres	STERILE EO	Esterilizado con óxido de etileno
	Hoja de datos del código de barras		Para evaluación del rendimiento IVD únicamente		Almacenar en la oscuridad
LOT	Código de serie	GTIN	Global Trade Item Number (número mundial de un artículo comercial)		Límite de temperatura
	Riesgo biológico		Importador		Archivo de definición de pruebas
REF	Número de catálogo	IVD	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>		Este lado hacia arriba
	Marcado CE de conformidad; este dispositivo cumple con los requisitos aplicables para el marcado CE de un producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> .	LLR	Límite inferior del intervalo asignado	Procedure UltraSensitive	Procedimiento ultrasensible
Collect Date	Fecha de recogida		Hombres	UDI	Identificación exclusiva del dispositivo
	Consulte las instrucciones de uso		Fabricante	ULR	Límite superior del intervalo asignado
	Suficiente para <n> pruebas	CONTROL -	Control negativo	Urine Fill Line	Línea de llenado de orina
CONTENT	Contenido del kit		Sin esterilizar	Rx Only	Solamente para EE. UU.: la ley federal de los Estados Unidos solo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo autorizado o bajo prescripción médica.
CONTROL	Control		Nombre del paciente		Fecha de caducidad
	Fecha de fabricación		Número del paciente		
	Dispositivo para pruebas cerca del paciente		Abrir aquí		
	Dispositivo para autoexamen	CONTROL +	Control positivo		
		QS copies / PCR	Copias QS por reacción de PCR, utilice copias QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.		

Asistencia técnica

Para obtener asistencia técnica, póngase en contacto con su filial local:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Fabricante e importador

Tabla 15 Fabricante e importador



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

Fabricado en los EE. UU.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

Marcas registradas y patentes

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

Copyright

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Bibliografía

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.

Revisión del documento

Información de revisión del documento	
Doc Rev 7.0 04/2023	Se ha modificado <i>Clostridium</i> por <i>Clostridioides</i> en todo el documento. Se han eliminado todas las referencias al kit de la prueba Cdiff 240T por haber quedado obsoleto. Se ha actualizado el apartado Precauciones y requisitos de manipulación para recomendar al usuario que se ponga en contacto con una autoridad local competente. Se ha añadido la advertencia “daños/fugas” al apartado de integridad. Se ha cambiado el nombre del apartado Correlación por Rendimiento clínico con muestras clínicas. Se ha incluido un enlace web al resumen del informe de seguridad y rendimiento. Se ha añadido el símbolo de marcado CE con número de organismo notificado. Se ha actualizado la página de símbolos armonizados. Se ha actualizado para reflejar los Operadores Económicos actuales. Se ha actualizado el apartado Marcas registradas y patentes, incluido el enlace. Se ha incluido el símbolo Rx Only en la primera página. Se ha incluido la declaración “Fabricado en”. Se ha incluido el apartado Asistencia técnica. Se ha actualizado la marca cobas®. Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.

Puede consultar el resumen del informe de seguridad y rendimiento en el siguiente enlace:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>