

cobas[®] Cdiff Test

zur Verwendung auf dem cobas[®] 4800-System

In-vitro-Diagnostikum



cobas[®] 4800 System Sample Preparation Kit	240 Tests 960 Tests	P/N: 05235782190 P/N: 05235804190
cobas[®] 4800 System Lysis Kit 1	240 Tests 960 Tests	P/N: 06768253190 P/N: 06768270190
cobas[®] 4800 System Wash Buffer Kit	240 Tests 960 Tests	P/N: 05235863190 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

INHALTSVERZEICHNIS

Verwendungszweck	4
Zusammenfassung und Erklärung des Tests / Testprinzipien.....	4
Hintergrund: Screening auf <i>C. difficile</i>	4
Erklärung des Tests	5
Testprinzipien	5
Probenaufarbeitung	5
PCR-Amplifikation und TaqMan®-Detektion	5
Selektive Amplifikation	6
Materialien, Reagenzien und Proben	7
Mitgelieferte Materialien und Reagenzien	7
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	12
Zusätzlich benötigtes Material	13
Zusätzlich erhältliches Material	13
Zusätzlich benötigte Geräte und Software	13
Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung.....	14
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	14
Gute Laborpraxis	14
Kontamination.....	15
Integrität.....	15
Entsorgung.....	15
Verschüttetes Material und Reinigung	16
Entnahme, Transport und Lagerung von Proben.....	16
Probenentnahme.....	16
Lagerung und Stabilität von Proben während des Transports	16
Testverfahren.....	17
Durchführung des Tests.....	17
Arbeitsablauf.....	17
Gebrauchsanleitung.....	17

Ergebnisse	21
Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse	21
Positivkontrolle	21
Negativkontrolle	21
Interne Kontrolle	21
Interpretation der Ergebnisse	22
Liste der Ergebnis-Flags	23
Verfahrenseinschränkungen	23
Nicht-klinische Leistungsmerkmale	25
Analytische Sensitivität	25
Detektion von <i>C. difficile</i> -Genotypen	25
Präzision	27
Analytische Spezifität	28
Störeinflüsse	30
Klinische Leistung bei Verwendung klinischer Proben	32
Weitere Informationen	34
Wichtigste Leistungsmerkmale des Assays	34
Symbole	35
Technischer Support	36
Hersteller und Importeur	36
Marken und Patente	36
Copyright	36
Literatur	37
Dokumentversion	39

Verwendungszweck

Der **cobas**® Cdiff-Test zur Verwendung auf dem **cobas**® 4800 System ist ein qualitativer *in-vitro*-diagnostischer Test zur direkten Detektion des Toxin-B-Gens (*tcdB*) des toxischen *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in ungeformten (flüssigen oder weichen) Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf *C. difficile*-Infektion (CDI). Der **cobas**® Cdiff-Test ist als Hilfsmittel zur Diagnose von CDI bei Menschen unter Berücksichtigung klinischer und epidemiologischer Risikofaktoren vorgesehen.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests / Testprinzipien

Hintergrund: Screening auf *C. difficile*

C. difficile ist ein gram-positives, anaerobes, sporenbildendes Stäbchenbakterium, das Ende der 1970er Jahre als Erreger der Antibiotika-assoziierten pseudomembranösen Kolitis identifiziert wurde.^{1,2} Es ist Schätzungen zufolge für 15–20 % der Fälle von Antibiotika-assoziiierter Diarrhoe sowie für fast alle Fälle der Antibiotika-assoziierten pseudomembranösen Kolitis verantwortlich.³ Im Lauf des letzten Jahrzehnts hat die Inzidenz von *C. difficile*-Infektionen (CDI) in den Industrieländern progressiv zugenommen und stellt nun ein erhebliches klinisches Problem dar. Während die Inzidenz in den Akutkrankenhäusern in den USA zuvor bei 30–40 Fällen pro 100.000 Einwohnern lag, ist sie im Jahr 2005 auf über 80 pro 100.000 gestiegen.⁴ CDI-Ausbrüche wurden bereits in der Literatur beschrieben.⁵ Die durch CDI verursachten direkten Kosten betragen in den USA 6.326 US-Dollar je Fall.⁶

Die steigende Inzidenz wird zum Teil der Entstehung eines als hochvirulent angesehenen Stamms zugeschrieben, der als Ribotyp 027, PFGE-Muster NAP1 (North American Pulsed Field Type 1) und Toxintyp III klassifiziert wurde. Toxische *C. difficile*-Stämme produzieren in der Regel zwei Toxine: Toxin A (ein Enterotoxin) und Toxin B (ein Zytotoxin).⁷ Ein geringer Teil der Stämme produziert nur Toxin B.⁸

Eine erhöhte Virulenz wurde jüngst bei Stämmen beschrieben, die ein weiteres Toxin, ein sogenanntes binäres Toxin, produzieren und eine Deletion im negativen Regulatorgen *tcdC* tragen.^{9,10} Diese Stämme zeigen Berichten zufolge *in vitro* eine stärkere Virulenz und scheinen bei Menschen zu einer höheren Morbidität und Mortalität zu führen.^{11,12}

Nach Besiedelung mit toxischem *C. difficile* können die Betroffenen zu asymptomatischen Trägern werden oder eine Darmerkrankung entwickeln. Die klinischen Zeichen der CDI reichen von leichter Diarrhoe bis hin zur lebensgefährlichen pseudomembranösen Kolitis, die mit Bauchschmerzen, starker Diarrhoe sowie systemischen Symptomen wie Fieber, Appetitlosigkeit, Übelkeit und Unwohlsein einhergeht.

Die Diagnose der CDI stützt sich in der Regel auf den Nachweis des Toxins A und/oder B in Stuhlproben. Der Nachweis der zytopathischen Wirkung von Toxin B auf eine Monolage von Zellen gilt weithin als „Goldstandard“.^{13, 14} Die zytopathische Wirkung kann durch direkte Inkubation von Stuhlüberstand auf der Zellen-Monolage nachgewiesen werden; alternativ können *C. difficile*-Isolate in einem selektiven Medium gezüchtet und der resultierende Überstand anschließend auf der Zellen-Monolage inkubiert werden (toxigene Kultur).¹⁵ Bei beiden Verfahren liegt das abschließende Ergebnis erst nach 48 bis 72 Stunden vor. Immunassays zum Nachweis der Toxine A und B werden häufig angewendet, da sie in weniger als 4 Stunden positive Ergebnisse liefern, ihre Sensitivität ist jedoch deutlich geringer als die der Gewebekultur.¹⁶ Verglichen mit den klinischen Kriterien für einen positiven CDI-Befund besitzt die PCR laut der Literatur eine Sensitivität von 93,3 %, eine Spezifität von 97,4 %, einen positiven prädiktiven Wert von

75,5 % und einen negativen prädiktiven Wert von 99,4 % bei einer Durchlaufzeit von unter 4 Stunden.¹⁵ Die PCR gilt als der beste Einzelschnelltest zum Nachweis von *C. difficile*-Toxinen.¹⁷⁻²⁰ Trotz der dramatischen Zunahme der Inzidenz und des Schweregrads der CDI sind weiterhin Metronidazol und Vancomycin die Arzneimittel der Wahl zur Behandlung von akuten Episoden und Rezidiven.²¹

Maßnahmen zur Infektionsbekämpfung umfassen den vorsichtigen Einsatz von Antibiotika, die Vorbeugung von Kreuzinfektionen sowie die aktive Fallüberwachung.²² Von wiederholten Tests zur Erfolgskontrolle ist abzuraten, da die Toxine über längere Zeit vorhanden sein können, ohne dass klinische Symptome auftreten.

Aus diesen Gründen besteht ein großer Bedarf an einem hochsensitiven und schnellen, automatisierten Nachweis von *C. difficile*. Molekularbiologische Methoden besitzen das größte Potenzial, die Detektionsdauer erheblich zu verkürzen, so dass die antibiotische Therapie frühzeitig eingeleitet und schnell Maßnahmen zur Infektionskontrolle ergriffen werden können.¹⁷⁻²⁰

Erklärung des Tests

Der **cobas**® Cdiff-Test umfasst zwei Hauptprozesse: (1) automatisierte Probenaufarbeitung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus ungeformten Stuhlproben, (2) PCR-Amplifikation der Ziel-DNA-Sequenzen unter Verwendung von *C. difficile*-spezifischen Primern und Echtzeitdetektion der gespaltene *C. difficile*-spezifischen, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-Detektionssonden. Vor der automatisierten Probenaufarbeitung wird allen Proben eine interne Kontrolle mit einer nicht verwandten, randomisierten DNA-Sequenz zugegeben. Diese Kontrolle wird mit jeder Probe amplifiziert und gleichzeitig detektiert, um den gesamten Prozess zu überwachen.

Testprinzipien

Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung für den **cobas**® Cdiff-Test wird auf dem **cobas**® x 480 Instrument automatisch durchgeführt. Die Organismen werden mit einer chaotropen Substanz, Proteinase K und SDS-Reagenzien lysiert. Die freigesetzten Nukleinsäuren werden zusammen mit der DNA der zugegebenen internen Kontrolle an magnetische Glaspartikel gebunden. Sie werden gewaschen und dann in eine kleine Menge Puffer eluiert. Danach führt das Instrument eine PCR-Reaktion mit einem Aliquot des eluierten Materials und aktiviertem Master-Mix durch.

PCR-Amplifikation und TaqMan®-Detektion

Die PCR-Zyklen und die Detektion des Zielsignals erfolgen auf dem **cobas**® z 480 Analyzer. Der Master-Mix enthält Primerpaare und Sonden für zwei Zielsequenzen: Toxin B und die interne Kontrolle. Wenn die Ziel-Nukleinsäuresequenzen vorhanden sind, erfolgt die Amplifikation mit den entsprechenden Primern durch eine thermostabile DNA-Polymerase, wobei PCR-Produkte (Amplifikat) entstehen. Diese Produkte werden von den spezifischen TaqMan-Sonden detektiert, die einen Fluoreszenzfarbstoff sowie einen Quencher enthalten. Normalerweise unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Farbstoffs. Wenn jedoch das PCR-Produkt vorliegt, hybridisiert die Sonde mit dem Produkt und wird durch die 5'-3'-Nukleaseaktivität der Polymerase gespalten. Bei dieser Reaktion kann der Farbstoff Fluoreszenz emittieren, und dieses Signal wird während jedes PCR-Zyklus in Echtzeit vom **cobas**® z 480 Analyzer aufgezeichnet. Das Signal wird von der Software des **cobas**® 4800 Systems interpretiert und als Endergebnis angegeben.

Selektive Amplifikation

Die selektive Amplifikation der Ziel-Nukleinsäure aus der Probe wird beim **cobas**® Cdiff-Test durch die Verwendung des Enzyms AmpErase (Uracil-N-Glykosylase) und von Desoxyuridintriphosphat (dUTP) erreicht. Das Enzym AmpErase erkennt desoxyuridinhaltige²³ – nicht aber desoxythymidinhaltige – DNA-Stränge und katalysiert deren Zerstörung. Desoxyuridin ist in natürlich vorkommender DNA nicht enthalten, ist in den Amplifikaten jedoch immer vorhanden, da Desoxyuridintriphosphat anstelle von Thymidintriphosphat als eines der dNTPs im Master-Mix verwendet wird. Deshalb enthalten nur die Amplifikate Desoxyuridin. Desoxyuridin macht kontaminierende Amplifikate vor der Amplifikation der Ziel-DNA anfällig für die Zerstörung durch das Enzym AmpErase. Das im Master-Mix enthaltene Enzym AmpErase katalysiert die Spaltung desoxyuridinhaltiger DNA an den Desoxyuridin-Resten durch Öffnen der Desoxyribosekette an der C1-Position. Während der Erwärmung im ersten thermozyklischen Schritt (bei dem alkalischen pH-Wert des Master-Mix) tritt ein Bruch des DNA-Strangs des Amplifikats an der Desoxyuridin-Position auf, so dass die DNA nicht weiter amplifiziert werden kann. Das Enzym AmpErase ist bei Temperaturen über 55 °C (d. h. während aller thermozyklischen Schritte) inaktiv und zerstört deshalb keine Zielamplifikate. Es konnte gezeigt werden, dass mit dem **cobas**® Cdiff-Test pro PCR mindestens 1000 Kopien des desoxyuridinhaltigen *C. difficile*-Amplifikats inaktiviert werden.

Materialien, Reagenzien und Proben

Mitgelieferte Materialien und Reagenzien

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise
<p>cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Probenaufarbeitungskit für das cobas® 4800 System) 240 Tests (P/N: 05235782190)</p>	<p>MGP (Magnetische Glaspartikel für das cobas® 4800 System) Magnetische Glaspartikel 93 % Isopropanol</p>	10 × 4,5 ml	 <p>GEFAHR H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. H319 Verursacht schwere Augenreizung. H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. P210 Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen. P233 Behälter dicht verschlossen halten. P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. P280 Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P303 + P361 + P353 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen. P370 + P378 Bei Brand: Trockenem Sand, Trockenlöschmittel oder alkoholbeständigen Schaum zum Löschen verwenden.</p>
	<p>EB (Elutionspuffer für das cobas® 4800 System) Tris-Puffer 0,09 % Natriumazid</p>	10 × 18 ml	N/A

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Probenaufarbeitungskit für das cobas® 4800 System) 960 Tests (P/N: 05235804190)	MGP (Magnetische Glaspartikel für das cobas® 4800 System) Magnetische Glaspartikel 93 % Isopropanol	10 × 13,5 ml	 <p>GEFAHR</p> <p>H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.</p> <p>H319 Verursacht schwere Augenreizung.</p> <p>H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.</p> <p>P210 Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen.</p> <p>P233 Behälter dicht verschlossen halten.</p> <p>P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.</p> <p>P280 Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.</p> <p>P303 + P361 + P353 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.</p> <p>P370 + P378 Bei Brand: Trockenem Sand, Trockenlöschmittel oder alkoholbeständigen Schaum zum Löschen verwenden.</p>
	EB (Elutionspuffer für das cobas® 4800 System) Tris-Puffer 0,09 % Natriumazid	10 × 18 ml	N/A

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Lysekit 1 für das cobas® 4800 System) 240 Tests (P/N: 06768253190)	LYS-1 (Lysepuffer-1 für das cobas® 4800 System) Natriumcitrat 5 % Polydocanol 42,6 % Guanidinthiocyanat Dithiothreitol	10 × 10 ml	 <p>GEFAHR</p> <p>H302 + H332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.</p> <p>H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.</p> <p>H318 Verursacht schwere Augenschäden.</p> <p>H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.</p> <p>H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.</p> <p>EUH032 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.</p> <p>P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.</p> <p>P280 Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.</p> <p>P284 Atemschutz tragen.</p> <p>P304 + P340 + P312 BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.</p> <p>P305 + P351 + P338 + P310 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.</p> <p>P342 + P311 Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.</p>
	PK (Proteinase K für das cobas® 4800 System) Tris-Puffer EDTA Calciumchlorid Calciumacetat < 2,0 % Proteinase K Glycerin	10 × 0,9 ml	
	SDS (SDS-Reagenz für das cobas® 4800 System) Tris-Puffer Natriumdodecylsulfat 0,09 % Natriumazid	10 × 3 ml	

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitsymbole und -hinweise
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Lysekit 1 für das cobas® 4800 System) 960 Tests (P/N: 06768270190)	LYS-1 (Lysepuffer-1 für das cobas® 4800 System) Natriumcitrat 5 % Polydocanol 42,6 % Guanidinthiocyanat Dithiothreitol	10 × 36 ml	 <p>GEFAHR</p> <p>H302 + H332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen. H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H318 Verursacht schwere Augenschäden. H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. EUH032 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.</p>
	PK (Proteinase K für das cobas® 4800 System) Tris-Puffer EDTA Calciumchlorid Calciumacetat < 2,0 % Proteinase K Glycerin	20 × 1,2 ml	<p>P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. P280 Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P284 Atemschutz tragen. P304 + P340 + P312 BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.</p>
	SDS (SDS-Reagenz für das cobas® 4800 System) Tris-Puffer Natriumdodecylsulfat 0,09 % Natriumazid	10 × 9 ml	<p>P305 + P351 + P338 + P310 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. P342 + P311 Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.</p>

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Waschpufferkit für das cobas® 4800 System) 240 Tests (P/N: 05235863190)	WB (Waschpuffer für das cobas® 4800 System) Natriumcitratdihydrat 0,05 % N-Methylisothiazolon-HCl	10 × 55 ml	N/A
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Waschpufferkit für das cobas® 4800 System) 960 Tests (P/N: 05235871190)	WB (Waschpuffer für das cobas® 4800 System) Natriumcitratdihydrat 0,05 % N-Methylisothiazolon-HCl	10 × 200 ml	N/A
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 (Internes Kontrollkit 1 für das cobas® 4800 System) 20 Läufe (P/N: 06768318190)	IC-1 (Interne Kontrolle 1 für das cobas® 4800 System) Tris-Puffer EDTA < 0,01 % Poly rA RNA (synthetisch) 0,05 % Natriumazid < 0,01 % nicht-infektiöse, synthetische DNA als interne Kontrolle, verkapselt in Bakteriophagen-Hüllprotein Lambda	20 × 0,5 ml	N/A
cobas® 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit (cobas® 4800 Cdiff Amplifikations-/ Detektions-Kit) 80 Tests (P/N: 06768237190)	Cdiff MMX (cobas® Cdiff Master-Mix) Tricinpuffer EDTA DMSO Kaliumacetat Kaliumhydroxid Tween 20 < 0,19 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0,01 % Upstream- und Downstream-Primer für <i>C. difficile</i> sowie Primer für interne Kontrolle < 0,01 % fluoreszenzmarkierte Sonden für <i>C. difficile</i> und die interne Kontrolle < 0,01 % Oligonukleotid-Aptamer < 0,01 % Z05-DNA-Polymerase (mikrobiell) < 0,02 % AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase) (mikrobiell) 0,09 % Natriumazid	10 × 0,3 ml	N/A

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise
cobas® 4800 Cdiff Controls and Cofactor Kit (cobas® 4800 Cdiff Kontroll- und -Kofaktorkit) 10 Läufe (P/N: 06768300190)	Cdiff (+) C (cobas® Cdiff Positivkontrolle) Tris-Puffer EDTA < 0,01 % Poly rA RNA (synthetisch) 0,05 % Natriumazid < 0,01 % nicht-infektiöse Plasmid-DNA (mikrobiell) mit <i>C. difficile</i> -Sequenz	10 × 0,5 ml	N/A
	(-) C (Negativkontrolle für das cobas® 4800 System) Tris-Puffer EDTA 0,05 % Natriumazid < 0,01 % Poly rA RNA (synthetisch)	10 × 0,5 ml	N/A
	Cofactor-3 (cobas® 4800 Kofaktor-3) Manganacetat Magnesiumacetat Rinderserumalbumin aus Rinderplasma aus den USA 0,09 % Natriumazid	10 × 1,7 ml	N/A

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Reagenz	Lagertemperatur	Lagerdauer
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Probenaufarbeitungs-kit für das cobas® 4800 System)	2–8 °C	Bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Lysekit 1 für das cobas® 4800 System)	2–8 °C	Bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 (Internes Kontrollkit 1 für das cobas® 4800 System)	2–8 °C	Bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil
cobas® 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit (cobas® 4800 Cdiff Amplifikations-/Detektions-Kit)	2–8 °C	Bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil
cobas® 4800 Cdiff Controls and Cofactor Kit (cobas® 4800 Cdiff Kontroll- und -Kofaktorkit)	2–8 °C	Bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Waschpufferkit für das cobas® 4800 System)	15–25 °C	Bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil

Hinweis: Reagenzien nicht einfrieren.

Für das angegebene Verfallsdatum der Reagenzien ist die koordinierte Weltzeit (Coordinated Universal Time, UTC) maßgeblich. Das lokale Verfallsdatum kann je nach Zeitzone bis zu 12 Stunden vor oder nach dem angegebenen Zeitpunkt liegen.

Zusätzlich benötigtes Material

Materialien	P/N
CORE-Spitzen, 1000 µl, Rack mit 96 Spitzen	04639642001
Reagenz-Reservoir, 50 ml	05232732001
Reagenz-Reservoir, 200 ml	05232759001
Extraktionsplatte (Deep-Well-Platte) für das cobas ® 4800 System	05232716001
Mikrotiterplatte (0,3 ml) und Versiegelungsfolie für das cobas ® 4800 System	05232724001
Versiegelungsfolienwerkzeug	04900383001
Carrier mit 24 Positionen	04639502001
Beutel für Festabfälle	05530873001 (klein) oder 04691989001 (groß)
Hamilton STAR Abfallschacht aus Kunststoff	04639669001
cobas ® PCR Media and Swab Sample Kit	07051891190
cobas ® PCR Media Uni Swab Sample Kit	07958030190
Laborhandschuhe, puderfrei	Es ist jede Art von puderfreien Laborhandschuhen geeignet.
Vortexer (Einzelröhrchen)	Es ist jeder Vortexer geeignet.
Schwenkbecherzentrifuge, RCF mind. 1500	Es ist jede Zentrifuge mit diesen Eigenschaften geeignet.

Weitere Informationen zu diesen separat erhältlichen Materialien erhalten Sie von Ihrer zuständigen Roche-Vertretung.

Zusätzlich erhältlichliches Material

Materialien	P/N
Abdeckmatte oder Abdeckung für Mikrotiterplatten	Roche 04789288001 oder Hamilton 6474-01
Verschlüsse, neutrale Farbe (zum Verschließen von Proben nach der Analyse)	Roche P/N 07958056190 zum Verschließen von Proben nach der Analyse in 13-ml-Röhrchen mit rundem Boden

Weitere Informationen zu diesen zusätzlich erhältlichlichen Materialien erhalten Sie von Ihrer zuständigen Roche-Vertretung.

Zusätzlich benötigte Geräte und Software

Zusätzlich benötigte Geräte und Software
cobas ® 4800 System cobas ® x 480 Instrument cobas ® z 480 Analyzer Control Unit
cobas ® Cdiff AP Software Version 1.0.1 oder höher für das cobas ® 4800 System
Anwendungssoftware (Core) Version 2.2.0 oder höher für das cobas ® 4800 System

Weitere Informationen zu diesen separat erhältlichlichen Materialien erhalten Sie von Ihrer zuständigen Roche-Vertretung.

Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Wie bei allen Testverfahren ist gute Laborpraxis eine unerlässliche Voraussetzung für die ordnungsgemäße Durchführung dieses Tests. Aufgrund der hohen analytischen Sensitivität dieses Tests ist Vorsicht geboten, um eine Verunreinigung der Reagenzien, Proben und Amplifikationsansätze zu verhindern.

- Nur zur Verwendung als *In-vitro*-Diagnostikum bestimmt.
- Kontamination der Reagenzien und Proben durch Mikroorganismen und DNA vermeiden.
- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind auf Anfrage bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.
- Das Reagenz LYS-1 enthält Guanidinthiocyanat. Guanidinthiocyanat darf nicht mit Natriumhypochlorit (Bleiche) oder anderen hochreaktiven Reagenzien wie Säuren oder Basen in direkten Kontakt kommen. Beim Mischen dieser Stoffe können giftige Gase entstehen.
- MGP enthält Isopropanol und ist leicht entzündlich. Von offenen Flammen und Umgebungen mit potenzieller Funkenbildung fernhalten.
- MGP von magnetischen Feldern fernhalten.
- EB, Cdiff MMX, SDS, Cofactor-3, (-)C, Cdiff (+)C und IC-1 enthalten Natriumazid.
- Weitere Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Verfahren zur Verringerung der Kontaminationsgefahr für das **cobas® x 480 instrument** oder den **cobas® z 480 analyzer** sind der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800 Systems** zu entnehmen. Wenn Verdacht auf eine Verunreinigung besteht, Reinigung und wöchentliche Wartung wie in der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800 Systems** beschrieben durchführen.
- Schwerwiegende Vorkommnisse, die bei Verwendung dieses Tests auftreten, müssen den zuständigen Behörden und dem Hersteller gemeldet werden.

Hinweis: Spezifische Anweisungen sind dem Abschnitt „Entnahme, Transport und Lagerung von Proben“ zu entnehmen.

Gute Laborpraxis

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In den Arbeitsbereichen des Labors nicht essen, trinken oder rauchen.
- Nach dem Umgang mit Proben und Testreagenzien gründlich die Hände waschen.
- Beim Umgang mit Reagenzien Augenschutz, Laborkittel und Laborhandschuhe tragen. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit diesen Materialien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen. Unbehandelt können Verätzungen entstehen. Verschüttete Flüssigkeiten vor dem Aufwischen zunächst mit Wasser verdünnen.
- Alle Arbeitsflächen im Labor gründlich mit einer frisch hergestellten Lösung aus 0,5%igem Natriumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser reinigen und desinfizieren (Haushaltsbleiche im Verhältnis 1:10 verdünnen). Anschließend die Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol abreiben.

Kontamination

- Um Kontaminationen zu vermeiden, müssen Handschuhe getragen und zwischen der Handhabung von Proben und **cobas**® Cdiff-Reagenzien gewechselt werden. Darauf achten, dass die Handschuhe beim Umgang mit den Proben und Kontrollen nicht kontaminiert werden. Beim Umgang mit Proben und Testreagenzien Laborhandschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen.
- Kontamination der Reagenzien und Proben durch Mikroorganismen und Ribonuklease vermeiden.
- Wird während der Handhabung und Bearbeitung der Proben eine Verschleppung der Proben nicht vermieden, kann es zu falsch-positiven Ergebnissen kommen.
- Proben sind als potenziell infektiös und gemäß den Vorschriften für sicheres Arbeiten im Labor, wie in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*²⁴ und dem CLSI-Dokument M29-A4 beschrieben, zu behandeln.²⁵

Integrität

- Kits nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Reagenzien nicht vermischen.
- Einwegkomponenten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Es dürfen keine Reagenzien oder Behälter verwendet werden, die sichtbar beschädigt sind bzw. aus denen Flüssigkeiten auslaufen.
- Alle Einwegkomponenten sind für den einmaligen Gebrauch vorgesehen und dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Alle Geräte müssen gemäß den Anweisungen des Herstellers gepflegt und gewartet werden.

Entsorgung

- Die Reagenzien des **cobas**® 4800 Systems und die für den **cobas**® Cdiff-Test spezifischen Reagenzien enthalten Natriumazid (siehe Abschnitt „**Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen**“). Natriumazid kann bei der Reaktion mit Blei- und Kupferleitungen hochexplosive Metallazide bilden. Beim Ausgießen natriumazidhaltiger Lösungen in Laborwaschbecken mit reichlich kaltem Wasser nachspülen, um Azidansammlung zu vermeiden.
- Nicht verbrauchte Reagenzien und Abfall gemäß den einschlägigen regionalen und überregionalen Vorschriften entsorgen.

Hinweis: Anweisungen zur Entsorgung von Flüssigabfällen sind der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen.

Verschüttetes Material und Reinigung

- Das Reagenz LYS-1 enthält Guanidinthiocyanat. Wird eine Flüssigkeit verschüttet, die Guanidinthiocyanat enthält, mit einem geeigneten Laborreinigungsmittel und Wasser beseitigen. Enthält die verschüttete Flüssigkeit potenziell infektiöse Stoffe, muss der betroffene Bereich ZUERST mit Laborreinigungsmittel und Wasser und anschließend mit 0,5%igem Natriumhypochlorit gereinigt werden.
- Wenn im **cobas**® 4800 instrument Flüssigkeit verschüttet wird, die Reinigungsanweisungen in der Benutzerunterstützung des **cobas**® 4800 Systems befolgen.
- Zum Reinigen des **cobas**® x 480 Instruments oder **cobas**® z 480 Analyzers keine Natriumhypochloritlösung (Bleiche) verwenden. Das **cobas**® x 480 instrument oder den **cobas**® z 480 analyzer gemäß den Anweisungen in der Benutzerunterstützung des **cobas**® 4800 Systems reinigen.

Entnahme, Transport und Lagerung von Proben

Hinweis: Alle Proben wie potenzielle Überträger von Infektionserregern behandeln.

Probenentnahme

Ungeformte Stuhlproben in einem sterilen Behälter sammeln. Die Proben sind gemäß der Standardvorgehensweise der jeweiligen Einrichtung zu gewinnen.

Lagerung und Stabilität von Proben während des Transports

Ungeformte Stuhlproben sind vor der Analyse auf dem **cobas**® 4800 System bei 2–30 °C 2 Tage, bei 2–8 °C 7 Tage und bei –20 °C 60 Tage stabil (dies wurde durch Tests von Proben belegt, die nacheinander 2 Tage bei 30 °C ± 1 °C, 5 Tage bei 2–8 °C und 60 Tage bei –20 °C gelagert wurden).

Mit **cobas**® PCR Media gemischte Stuhlproben sind vor der Analyse auf dem **cobas**® 4800 System bei 2–8 °C 60 Tage und bei 30 °C 7 Tage stabil.

Beim Transport von *C. difficile*-Proben sind die geltenden Vorschriften für den Transport von Krankheitserregern zu beachten.

Testverfahren

Durchführung des Tests

Arbeitsablauf

Abbildung 1: Arbeitsablauf für **cobas®** Cdiff

1	System einschalten.
2	Wartung des Instruments durchführen.
3	Proben und Reagenzien aus der Lagerung nehmen.
4	Lauf starten: <ul style="list-style-type: none"> Carrier mit Proben laden.
5	Mit LIS: Arbeitsliste bestätigen. Ohne LIS: Arbeitsliste erstellen.
6	Verbrauchsmaterial (Deep-Well-Platte, Mikrotiterplatte, Spitzen-Racks) und Reagenzien laden.
7	Probenaufarbeitungslauf starten.
8	Mikrotiterplatte entnehmen und verschließen.
9	Proben, verbrauchte Reagenzien und Deep-Well-Platte entnehmen.
10	Mikrotiterplatte in den Analyzer laden.
11	Ergebnisse überprüfen.
12	Mit LIS: Ergebnisse an LIS übertragen.
13	Analyzer leeren.

Gebrauchsanleitung

Mit Ausnahme von Cdiff MMX und Cofactor-3 müssen alle Reagenzien vor dem Einsetzen in das **cobas® x** 480 Instrument auf Raumtemperatur gebracht werden. Cdiff MMX und Cofactor-3 können direkt aus der Kühlung (bei 2–8 °C) genommen und verwendet werden, da diese Komponenten bis zu ihrem Gebrauch im Verfahren auf dem **cobas® x** 480 Instrument Raumtemperatur erreichen.

Hinweis: Detaillierte Anweisungen sind der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen.

Umfang eines Laufs

Das **cobas®** 4800 System unterstützt Läufe mit verschiedenen Batches für den **cobas®** MRSA/SA-Test, den **cobas®** Cdiff-Test und den **cobas®** HSV-1/2-Test. Das generische Probenaufarbeitungs- und das generische Waschpufferkit für das **cobas®** 4800 System stehen jeweils in zwei Größen zur Verfügung, die für 10 Läufe mit 24 bzw. 96 Proben ausreichen (Kontrollen und Proben für alle auszuführenden Assays eingerechnet). Das **cobas®** 4800 Cdiff Amplifikations-/Detektionskit reicht für 80 Proben aus (zu analysierende Cdiff-Kontrollen und Proben eingerechnet). In einem Lauf können wie erforderlich mehrere Fläschchen des **cobas®** 4800 Cdiff Master-Mix mitgeführt werden, sofern sie dieselbe Kitgröße besitzen. Das generische interne Kontrollkit 1 für das **cobas®** 4800 System und das **cobas®** 4800 Cdiff Kontroll- und Kofaktorkit stehen nur in einer Kitgröße zur Verfügung, die für alle Laufkonfigurationen ausreicht. Für jeden Lauf

mit *C. difficile*-Proben muss eine cobas® 4800 Cdiff-Positivkontrolle und eine Negativkontrolle für das cobas® 4800 System verwendet werden (siehe Abschnitt „**Qualitätskontrolle**“). Für einen einzelnen Analyselauf beträgt die zulässige Höchstbelastung 94 Proben und 2 Kontrollen.

Hinweis: Auch wenn die Reagenzien dabei nicht optimal eingesetzt werden, kann ein generisches Reagenz für 96 Tests für einen Lauf mit 1 bis 22 Proben verwendet werden. Die verschiedenen Größen des Waschpufferkits (WB) für das cobas® 4800 System, des Probenaufarbeitungskits für das cobas® 4800 System und des Lysekits 1 für das cobas® 4800 System können jedoch nicht miteinander kombiniert werden. Wenn beispielsweise zu Beginn des Laufs eine WB-Reagenzflasche für 96 Tests gescannt wird, müssen auch die für 96 Tests vorgesehene Reagenzien aus den anderen beiden Kits verwendet werden.

Arbeitsablauf

Der cobas® Cdiff-Test wird unter Verwendung des vollständigen Arbeitsablaufs in der cobas® 4800 Software durchgeführt. Dieser umfasst die Probenvorbereitung auf dem cobas® x 480 instrument und die anschließende Amplifikation/Detektion auf dem cobas® z 480 analyzer. Der Lauf kann als reiner Cdiff-Lauf oder als Mixed-Batch-Lauf mit dem cobas® MRSA/SA-Test und/oder dem cobas® HSV-1/2-Test durchgeführt werden. Detaillierte Informationen sind der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen.

Überführung von Proben in cobas® PCR Media-Röhrchen

1. Mit **nur einem** Polyester-Abstrichtupfer Stuhl in das cobas® PCR Media-Röhrchen überführen. Den zweiten Abstrichtupfer aus der Packung werfen (falls vorhanden). Die Spitze des Abstrichtupfers vollständig, d. h. bis zum Ende des abgeschrägten Teils, in die Stuhlprobe eintauchen, ohne die Wände des Stuhlgefäßes zu berühren, dann sofort herausziehen und den benetzten Tupfer in das cobas® PCR Media-Röhrchen geben. Probe nicht testen, wenn nicht genügend Stuhl vorhanden ist, um die Spitze des Tupfers vollständig einzutauchen.

2. Durch Druck gegen die Seite des Röhrchens den Stiel des Abstrichtupfers an der grauen Einkerbung durchbrechen. Röhrchen verschließen und mindestens 5 Sekunden im Vortexer mischen. Röhrchen öffnen und zur Verarbeitung in Proben-Carrier-Rack(s) mit 24 Positionen setzen. Verschlüsse entsorgen.

Hinweis: Der cobas® Cdiff-Test wurde zur Verwendung mit dem cobas® PCR Media Kit, dem cobas® PCR Media Uni Swab Sample Kit und dem cobas® PCR Media Dual Swab Sample Kit validiert. Nicht mit anderen Abstrichtupfern oder Medien verwenden.

Hinweis: Zum Überführen von Stuhl nur einen der beiden Polyester-Abstrichtupfer aus der Packung verwenden. Wenn zu viel Stuhl in das cobas® PCR Media-Röhrchen überführt wird, kann es zu Verstopfungen und/oder ungültigen Ergebnissen kommen.

Hinweis: Stuhlproben müssen in cobas® PCR Media-Röhrchen überführt werden, die mit dem richtigen Barcode für die Verarbeitung auf dem cobas® x 480 Instrument gekennzeichnet sind. Informationen zur korrekten Kennzeichnung mit Barcodes und eine Liste der zulässigen Barcodes für das cobas® 4800 System sind der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen.

Hinweis: Um eine Kreuzkontamination von in cobas® PCR Media suspendierten Stuhlproben zu verhindern, sollten die cobas® PCR Media-Röhrchen nach der Verarbeitung mit Verschlüssen in einer anderen Farbe (neutral, siehe „Zusätzlich erhältliches Material“) verschlossen werden.

Hinweis: cobas® PCR Media enthält eine ausreichende Menge, um die suspendierte Stuhlprobe mehrfach auf dem cobas® 4800 System zu analysieren. Zur Durchführung eines cobas® Cdiff-Tests ist ein Stuhlsuspension-Mindestvolumen von 3 ml im cobas® PCR Media-Röhrchen erforderlich.

Durchführen des cobas® Cdiff-Tests

Hinweis: Es sind Mixed-Batch-Läufe mit dem cobas® MRSA/SA-Test und dem cobas® Cdiff-Test und/oder dem cobas® HSV-1/2-Test möglich. Weitere Informationen sind der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen.

1. Verfahren zum Starten und Warten des Systems gemäß den Anweisungen in der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems durchführen.
2. Alle benötigten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien bereitstellen. Die Reagenzien müssen vor dem Start des Laufs auf Raumtemperatur gebracht werden, ausgenommen hiervon sind nur cobas® Cdiff MMX und Cofactor-3.

Hinweis: Alle Reagenzien und Reagenz-Reservoirs sind mit Barcodes versehen und für den Einmalgebrauch vorgesehen. Die cobas® 4800 Software erfasst die Verwendung der Reagenzien und Reagenz-Reservoirs und weist bereits verwendete Reagenzien oder Reagenz-Reservoirs zurück.

3. Einen neuen Lauf starten und die Arbeitsliste für den Lauf definieren. Es gibt drei Möglichkeiten zum Erstellen einer Arbeitsliste:
 - Über den Probeneditor, bevor das Probenrack in das cobas® x 480 Instrument geladen wird (Schaltfläche „Editor“ rechts im Hauptmenü). Arbeitslisten können bei Bedarf gespeichert, bearbeitet und erneut geladen werden.
 - Über den Softwareassistenten für den neuen Lauf und das Laden der Proben in das cobas® x 480 Instrument, wenn die Software dazu auffordert. Die Barcodes der Proben werden automatisch gescannt, und es muss die Ergebnisausgabe für jede Probe definiert werden.
 - Über das LIS der Einrichtung.

Detaillierte Informationen sind der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen. Bei der Auswahl der Ergebnisausgabe „Cdiff“ markieren.

4. Proben laden und wie erforderlich Arbeitsliste definieren/auswählen oder das LIS verwenden. Die Option „Unload sample carriers after transferring to deep well plate“ ist standardmäßig aktiviert. Sie ermöglicht es dem Benutzer, die verbleibenden Stuhlsuspensionsproben möglichst bald aus dem System zu nehmen, nachdem die Aliquote für die Verarbeitung auf dem cobas® x 480 Instrument entnommen wurden. Die Gefäße mit der Stuhlsuspension können mit frischen Verschlüssen (siehe „Zusätzlich erhältliches Material“) verschlossen werden, wenn sie gelagert werden sollen.
5. Mit Hilfe des Softwareassistenten alle Verbrauchsmaterialien laden. Keine einzelnen Spitzen in ein teilweise bestücktes Spitzenrack laden oder daraus entnehmen, da die Software die Anzahl der verbleibenden Spitzen erfasst. Wenn die Zahl der Spitzen nicht ausreicht, um den Lauf durchzuführen, warnt die Software den Benutzer.
6. Die Reagenzien für die Probenaufarbeitung in die mit Barcodes versehenen Reagenz-Reservoirs laden. Die Reagenz-Reservoirs sind in zwei Größen verfügbar: 200 ml und 50 ml. Zur Auswahl des richtigen Reagenz-Reservoirs die Anweisungen des Softwareassistenten befolgen. Die Barcodes der Reagenz-Reservoirs müssen nach rechts zeigen. Die Reagenzien für die Probenaufarbeitung nach dem Prinzip „Scannen-Scannen-Befüllen-Platzieren“ laden:
 - Barcode der Reagenzflasche einscannen.

- Barcode des Reagenz-Reservoirs einscannen.
- Reagenz in das Reservoir gießen.
- Das gefüllte Reagenz-Reservoir an der vorgegebenen Position im Reagenz-Carrier platzieren.

Hinweis: Das cobas® 4800 System verfügt über eine interne Uhr zum Messen des Zeitraums, über den sich die Reagenzien im System befinden. Nach dem Scannen des Waschpuffers (WB) muss innerhalb von 1 Stunde der Ladevorgang abgeschlossen und auf die Schaltfläche „Start“ geklickt werden. Auf der Registerkarte „Workplace“ wird ein Countdown angezeigt. Der Lauf kann nicht gestartet werden, wenn die Haltbarkeit im System abgelaufen ist.

Hinweis: Um sicherzustellen, dass die magnetischen Glaspartikel (MGP) richtig überführt werden, das MGP-Fläschchen unmittelbar vor dem Einfüllen in das Reagenz-Reservoir im Vortexer mischen und kräftig schütteln.

7. Amplifikations-/Detektionsreagenzien (Cdiff MMX und Cofactor-3), Proteinase K (PK) und Kontrollen [Cdiff (+) C, IC und (-) C] direkt in den Reagenz-Carrier laden. Um Kontaminationen zu verhindern, müssen nach der Handhabung von Positivkontrollen die Handschuhe gewechselt werden.

Hinweis: Der Softwareassistent berechnet die optimale Kitanzahl und -größe für das zu verwendende cobas® Cdiff MMX-Reagenz. Die Angabe erscheint in der Spalte „Kit size“ auf dem Ladebildschirm für das Laden von MMX und Kofaktor. Um cobas® Cdiff MMX in einer anderen Kitgröße zu verwenden, auf die Schaltfläche „Change kit size“ klicken.

8. Die Probenvorbereitung durch Klicken auf „Start Run“ starten.
9. Nach erfolgreichem Abschluss des Probenvorbereitungslaufs werden die Schaltflächen „Sample Preparation results“ und „Unload“ verfügbar. Falls gewünscht, auf die Schaltfläche „Sample Preparation results“ klicken, um die Ergebnisse anzuzeigen, und dann auf „Unload“ klicken, um die Platten-Carrier zu entladen. Alternativ direkt auf „Unload“ klicken, um den Platten-Carrier zu entladen, ohne die Ergebnisse zu überprüfen. Hierzu die Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems beachten.
10. Gemäß den Anweisungen in der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems die Mikrotiterplatte versiegeln, die Platte zum cobas® z 480 Analyzer überführen und den Amplifikations-/Detektionslauf starten.

Hinweis: Das cobas® 4800 System verfügt über eine interne Uhr zum Messen des Zeitraums nach der Zugabe der vorbereiteten Proben zum aktivierten Master-Mix. Amplifikation und Detektion sollten so bald wie möglich und nicht später als 90 Minuten nach Ende des Laufs auf dem cobas® x 480 instrument gestartet werden. Auf der Registerkarte „Workplace“ wird ein Countdown angezeigt. Der Lauf wird vom System abgebrochen, wenn der Countdown abgelaufen ist.

11. Nach Abschluss des Amplifikations- und Detektionslaufs die Mikrotiterplatte aus dem cobas® z 480 analyzer nehmen.
12. Die Ergebnisse gemäß den Anweisungen in der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems überprüfen und akzeptieren.

Ergebnisse

Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse

In jedem Lauf wird ein Satz Positiv- und Negativkontrollen für den **cobas**® Cdiff-Test mitgeführt. Damit die **cobas**® 4800 Software für einen Lauf die Ergebnisse des **cobas**® Cdiff-Tests anzeigt, müssen für den Lauf sowohl für die Positiv- als auch die Negativkontrolle gültige Ergebnisse erzielt werden.

Positivkontrolle

Die Cdiff-Positivkontrolle enthält nicht-infektiöse DNA-Plasmide von *C. difficile*. Sie überwacht die Isolierung, Amplifikation und Detektion der Nukleinsäuren im jeweiligen Testlauf. Die Ergebnisse der Cdiff-Positivkontrolle müssen gültig („Valid“) sein. Wenn die Cdiff-Positivkontrolle durchweg ungültige Ergebnisse ergibt, den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung verständigen.

Negativkontrolle

Die Ergebnisse der Negativkontrolle müssen gültig („Valid“) sein. Wenn die Negativkontrolle durchweg ungültige Ergebnisse ergibt, den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung verständigen.

Interne Kontrolle

Die interne Kontrolle ist ein rekombinantes Bakteriophagen-Lambda, das randomisierte Sequenzen und Zielsequenzen für die Primer und die Sonde enthält, die spezifisch für die interne Kontrolle sind. Die interne Kontrolle wird bei der Probenaufarbeitung auf dem **cobas**® x 480 Instrument allen Proben sowie der Positiv- und der Negativkontrolle zugegeben. Die interne Kontrolle überwacht die Isolierung, Amplifikation und Detektion der Nukleinsäuren für die jeweilige Probe. Außerdem wird sie für die Validierung der Laufkontrollen benötigt.

Interpretation der Ergebnisse

Hinweis: Die gesamte Assay- und Laufvalidierung wird von der cobas® 4800 Software bestimmt.

Hinweis: Ein gültiger Lauf kann sowohl gültige als auch ungültige Probenergebnisse enthalten.

Bei einem gültigen Lauf werden die Probenergebnisse wie in Tabelle 1 dargestellt interpretiert.

Tabelle 1 Interpretation der Ergebnisse des cobas® Cdiff-Tests

cobas® Cdiff-Test	Angabe und Interpretation der Ergebnisse
POS Cdiff	Cdiff-positiv Probe ist positiv für <i>C. difficile</i> -DNA.
NEG Cdiff	Cdiff-negativ* <i>C. difficile</i> -DNA (sofern vorhanden) konnte nicht nachgewiesen werden.
Invalid	Ungültig Ergebnis ist ungültig. Die Originalprobe muss neu getestet werden, damit ein gültiges Ergebnis erzielt wird. Das Röhrchen mit der Stuhlsuspension, das das ungültige Ergebnis erzeugt hat, mit einem neuen Verschluss verschließen und mindestens 5 Sekunden im Vortexer mischen. 0,5 ml der gemischten Stuhlsuspension in ein neues cobas® PCR Media-Röhrchen geben. Röhrchen mit der verdünnten Suspension verschließen und mindestens 5 Sekunden im Vortexer mischen. Röhrchen öffnen und zur Verarbeitung in Proben-Carrier mit 24 Positionen setzen.
Failed	Keine Ergebnisse für die Probe Anweisungen zur Überprüfung der Flags für einen Lauf und empfohlene Aktionen sind der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen. In den seltenen Fällen, in denen es zu einem Pipettierfehler kommt (z. B. aufgrund einer Verstopfung), das ursprüngliche Röhrchen mit der suspendierten Stuhlprobe mit einem neuen Verschluss verschließen und in eine Zentrifuge setzen. Auf 1800 RCF (bzw. 1800 × g) beschleunigen und dann stoppen. Darauf achten, dass das Röhrchen nach dem Zentrifugieren nicht geschüttelt oder gemischt wird. Röhrchen öffnen und zur Verarbeitung in Proben-Carrier mit 24 Positionen setzen.

* Ein negatives Ergebnis schließt das Vorliegen von *C. difficile*-DNA nicht aus, da die Ergebnisse von einer korrekten Probengewinnung, dem Fehlen von Inhibitoren sowie einer ausreichenden Menge zu detektierender DNA abhängen. Es kann zu ungültigen Ergebnissen kommen, wenn die Probe zu viel Stuhl oder hemmende Substanzen enthält, die die Isolierung und/oder Amplifikation und Detektion der Ziel-Nukleinsäuren verhindern. Informationen zu bekannten Störsubstanzen sind dem Abschnitt „**Verfahrenseinschränkungen**“ zu entnehmen.

Hinweis: Für den cobas® Cdiff-Test ist ein Stuhlsuspension-Mindestvolumen von 3 ml erforderlich.

Liste der Ergebnis-Flags

In der folgenden Tabelle sind die zur Interpretation der Ergebnisse benötigten Flags aufgeführt.

Tabelle 2 Liste der Flags für den **cobas®** Cdiff-Test

cobas® Cdiff-Test	cobas® Cdiff-Test	Angabe und Interpretation der Ergebnisse
R20	Die Positivkontrolle ist ungültig.	Eine externe Kontrolle ist ungültig. 1. Den gesamten Lauf mit frischen Reagenzien wiederholen. 2. Wenn das Problem weiterhin besteht, den Roche Kundendienst verständigen.
R21	Die Negativkontrolle ist ungültig.	Eine externe Kontrolle ist ungültig. 1. Den gesamten Lauf mit frischen Reagenzien wiederholen. 2. Wenn das Problem weiterhin besteht, den Roche Kundendienst verständigen.
X3	Fehler: Es wurde eine Verklumpung erkannt; die Probe wurde nicht verarbeitet.	Sicherstellen, dass die Proben gemäß der Beschreibung des Arbeitsablaufs verarbeitet wurden. 1. Die Probe auf Verklumpungen untersuchen. 2. Die Probe erneut analysieren.
X4	Fehler: Es ist ein Pipettierfehler aufgetreten. Die Probe wurde nicht prozessiert.	Der wahrscheinlichste Grund ist ein unzureichendes Probenvolumen oder ein mechanischer Fehler während der Pipettierung. 1. Sicherstellen, dass ausreichend Probenvolumen vorhanden ist. 2. Sicherstellen, dass die Spitzenabwurfplatte richtig platziert ist. 3. Die Probe erneut analysieren.

Verfahrenseinschränkungen

- Der **cobas®** Cdiff-Test wurde nur zur Verwendung mit ungeformten Stuhlproben validiert, die entsprechend der Gebrauchsanweisung in **cobas®** PCR Media überführt wurden.
- Zuverlässige Ergebnisse sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Entnahme, Transport, Lagerung und Bearbeitung der Proben gewährleistet. Die in dieser vorliegenden Gebrauchsanweisung (Packungsbeilage) und in der Benutzerunterstützung des **cobas®** 4800 Systems beschriebene Vorgehensweise ist zu befolgen.
- Die Detektion von *C. difficile*-DNA hängt von der in der Probe vorhandenen Anzahl von Organismen ab und kann durch die Methoden zur Entnahme/Verarbeitung der Probe, frühere Krankenhausaufenthalte, Anwendung von Antibiotika und die Art der *C. difficile*-Stämme beeinflusst werden.
- Verschiedene Störsubstanzen können zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen. Die interne Kontrolle des **cobas®** Cdiff-Tests dient zur Erkennung von Proben, die Stoffe enthalten, die bei der Isolierung von Nukleinsäuren und der PCR-Amplifikation störend wirken könnten. Zu Störungen kann es unter anderem in den folgenden Situationen kommen:
 - Proben mit einem Schleimanteil von mehr als 25 % (Massenvolumen-%) können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
- Ein positives Ergebnis zeigt das Vorliegen von *C. difficile*-DNA und nicht zwingend das Vorliegen lebensfähiger Organismen an. Daher bedeutet ein positives Ergebnis nicht zwangsläufig, dass eine Eradikationstherapie fehlgeschlagen ist.

6. Mutationen oder Polymorphismen in Primer- und Sonden-Bindungsregionen können die Detektion neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen, so dass der **cobas**® Cdiff-Test ein falsch-negatives Ergebnis liefert.
7. Der prädiktive Wert eines Assays hängt von der Prävalenz der Erkrankung in einer bestimmten Population ab.
8. Die Zugabe des Enzyms AmpErase zum **cobas**® 4800 Cdiff Master-Mix ermöglicht eine selektive Amplifikation der Ziel-DNA; es ist jedoch eine gute Laborpraxis sowie die genaue Einhaltung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren erforderlich, um eine Kontamination der Reagenzien und Amplifikationsansätze zu vermeiden.
9. Dieses Produkt darf nur von Personal verwendet werden, das in der PCR-Technik und der Verwendung des **cobas**® 4800 Systems geschult ist.
10. Für die Verwendung mit diesem Produkt wurden ausschließlich das **cobas**® x 480 Instrument und der **cobas**® z 480 Analyzer validiert. Kein anderes Probenaufarbeitungs- oder PCR-System darf mit diesem Produkt verwendet werden.
11. Bevor Benutzer zwischen verschiedenen Verfahren wechseln, sollten sie aufgrund der inhärenten Unterschiede zwischen den Verfahren in ihrem Labor Studien zur Korrelation der Methoden durchführen, um die Unterschiede der Verfahren zu ermitteln und das neue Verfahren zu bestätigen. Eine hundertprozentige Übereinstimmung der Ergebnisse ist aufgrund der bereits erwähnten Unterschiede zwischen den Verfahren nicht zu erwarten.
12. Kreuzkontaminationen können zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Das **cobas**® 4800 System ist ein automatisiertes Instrument für die Echtzeit-PCR, das speziell entwickelt wurde, um das Risiko eine Kreuzkontamination bei Probenverarbeitung, Extraktion der Nukleinsäuren, Amplifikation und Detektion zu vermeiden. Es wurde eine simulierte, nicht-klinische Studie mit künstlichen, hoch positiven und negativen Proben in einer Schachbrettkonfiguration durchgeführt, um eine theoretische Kreuzkontaminationsrate für das System zu ermitteln und dadurch die Robustheit des Systems zu testen. Die hoch positiven Proben wiesen früher einen Ct-Wert auf, als es in 95 % der Fälle bei infizierten Patienten der Zielpopulation der Fall war. Die in dieser Studie mittels Schachbrettmethode ermittelte Kreuzkontaminationsrate lag bei 0,24 % (1/423). Kreuzkontaminationsraten in klinischen Umgebungen sind vom Anteil der hoch positiven Proben und der Prävalenz der Erkrankung abhängig. Es wird davon ausgegangen, dass die Kreuzkontaminationsraten in routinemäßigen klinischen Umgebungen deutlich geringer sind als die Ergebnisse aus dieser Studie gezeigt haben. Die tatsächliche Rate muss in der jeweiligen Kundenumgebung ermittelt werden.

Nicht-klinische Leistungsmerkmale

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität (Nachweisgrenze oder LOD, Limit of Detection) des **cobas**® Cdiff-Tests wurde durch die Analyse quantifizierter *C. difficile*-Kulturen bestimmt, die auf verschiedene Konzentrationen in einer negativen Stuhlintergrund suspension in **cobas**® PCR Media verdünnt worden waren. Alle Konzentrationsstufen wurden mit dem **cobas**® Cdiff-Test über drei verschiedene Chargen von **cobas**® Cdiff-Testreagenzien getestet. Auf jeder Stufe wurden mindestens 21 Replikate pro Reagenzcharge analysiert. Die Nachweisgrenze (LOD) dieses Tests ist als diejenige Zielkonzentration definiert, die bei $\geq 95\%$ der getesteten Replikate als positiv nachgewiesen werden kann, bezogen auf die Ergebnisse der Reagenzcharge mit der schlechtesten Leistung.

Die in der Studie zur analytischen Sensitivität getesteten sieben *C. difficile*-Stämme sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 Nachweisgrenze (LOD) des **cobas**® Cdiff-Tests

Stamm-ID	Toxinotyp	REA ⁺ -Typ	PFG ⁺ -Typ	Ribotyp	Phänotyp	LOD (CFU/Abstrich)	
						Nach Positivrate	Nach Probit-Analyse
ATCC 43255 (VPI 10463)	0	N/A	N/A	087	A+B+CDT-	113	90
ATCC BAA-1382 (630)	0	R 23	N/A	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/A	N/A	078	N/A	54	45
ATCC 43598 (1470)	VIII	N/A	N/A	017	A-B+	225	130
F15	XII	N/A	N/A	N/A	N/A	54	59

* Restriktionsendonuklease-Analyse; †Pulsfeldgel

Detektion von *C. difficile*-Genotypen

Die Nachweisgrenze des **cobas**® Cdiff-Tests für 28 toxische Stämme, die zusätzliche Toxinotypen repräsentieren, wurde durch die Analyse von verschiedenen Konzentrationsstufen mit jeweils 40 Replikaten überprüft. Die Verdünnungen und Analyseproben wurden in ähnlicher Weise wie bei der oben beschriebenen Studie zur Nachweisgrenze hergestellt. Die niedrigste Konzentration, bei der noch eine Trefferquote von mindestens 95 % erreicht wurde, ist in Tabelle 4 angegeben.

Alle 28 toxischen Stämme (Tabelle 4) wurden bei $\geq 95\%$ der getesteten Replikate als positiv erkannt, wobei die Konzentration zwischen 77,9 CFU/Abstrich und 460 CFU/Abstrich lag.

Tabelle 4 Zusammenfassung der Überprüfungsergebnisse für toxische *C. difficile*-Stämme

Stamm	Toxinotyp	Ribotyp	Konz. (CFU/Abstrich)	Positivrate
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/A	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/A	460	97,5 %
K095	XVIII	014	234	95,0 %
TR13	XIX	N/A	234	97,5 %
TR14	XX	N/A	77,9	100,0 %
CH6223	XXI	N/A	234	100,0 %
CD07-468	XXII	N/A	234	100,0 %
8785	XXIII	N/A	234	95,0 %
597B	XXIV	131	234	97,5 %
7325	XXV	027	234	100,0 %
7459	XXVI	N/A	234	95,0 %
KK2443-2006	XXVII	N/A	234	100,0 %
CD08-070	XXVIII	126	234	97,5 %
CD07-140	XXIX	056	234	97,5 %
ES 130	XXX	N/A	234	100,0 %
WA 151	XXXI	N/A	460	100,0 %

Präzision

Die interne Präzision wurde mit einem Panel von *C. difficile*-Kulturen bestimmt, die zu einer negativen Stuhlsuspension in **cobas**® PCR Media mit Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze (LOD), nahe der Nachweisgrenze und über der Nachweisgrenze des **cobas**® Cdiff-Tests verdünnt wurden. Eine negative Konzentrationsstufe, die nur aus der Stuhlsuspension in **cobas**® PCR Media bestand, wurde ebenfalls analysiert. Die Tests wurden über 12 Tage in insgesamt 36 Läufen auf drei Geräten mit drei verschiedenen Chargen von **cobas**® Cdiff-Testreagenzien durchgeführt. Tabelle 5 enthält eine Beschreibung der Panels zur Bestimmung der Präzision und eine Zusammenfassung der Studie. Die Analyse der Varianzkomponenten (Tabelle 6) ergab, dass die größte Variabilität der Ct-Zielwerte bei Konzentrationen gleich oder nahe der Nachweisgrenze im Zusammenhang mit Intra-Lauf- (Zufall) und Charge-zu-Charge-Faktoren besteht (60,0 % bzw. 25,3 %). Bei Konzentrationen über der Nachweisgrenze besteht die größte Variabilität der Ct-Werte im Zusammenhang mit Intra-Lauf- (Zufall) und Instrument-zu-Instrument-Faktoren (72,5 % bzw. 24,7 %). Die Ergebnisse (Tabelle 7) zeigen, dass die Ct-Zielwerte einen Gesamt-VK (%) von 1,5 % bei Konzentrationen an der Nachweisgrenze und 1,1 % bei Konzentrationen über der Nachweisgrenze aufwiesen.

Tabelle 5 Analyse der Positivraten aus der Studie zur internen Präzision

Panelprobe	Anz. getestet	Anz. Positive	Positivrate	95 % KI	
				Untere Grenze	Obere Grenze
Negativ	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 = Nachweisgrenze

Tabelle 6 Analyse der Varianzkomponenten für die Panelproben in der Präzisionsstudie

Stufe	Mittelwert	Varianzkomponenten/prozentualer Einfluss zum Gesamtwert					Gesamt
		Charge	Instrument	Kitgröße	Tag	Zufall	
~ 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 = Nachweisgrenze

Tabelle 7 Analyse der Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (%) für die Panelproben in der Präzisionsstudie

Stufe	Mittelwert	SD-Komponenten/VK (%)					Gesamt
		Charge	Instrument	Kitgröße	Tag	Zufall	
~ 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 = Nachweisgrenze

Analytische Spezifität

Zur Bestimmung der analytischen Spezifität des **cobas**® Cdiff-Tests wurden die folgenden Organismenpanels getestet: 1) 103 Bakterien, Pilze und Viren, die in Stuhlproben vorkommen können, und eine Humanzelle (Tabelle 8); 2) 28 Organismen der Gattung *Clostridiaceae*, einschließlich nicht-toxischem *C. difficile* (* Für die Tests wurden das Cytomegalievirus (HHV5) auf eine Konzentration von $2,0 \times 10^3$ PFU/ml, das humane Adenovirus Typ 40 auf eine Konzentration von $2,2 \times 10^3$ PFU/ml und das humane Rotavirus auf eine Konzentration von $9,8 \times 10^3$ PFU/ml gebracht; siehe Tabelle 9).

Alle Bakterien und Humanzellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^6 Einheiten*/ml und alle Viren auf eine Konzentration von 1×10^5 Einheiten*/ml gebracht, mit Ausnahme des Cytomegalievirus (HHV5), des humanen Adenovirus Typ 40 und des humanen Rotavirus, die aufgrund von Beschränkungen der Stammkonzentration auf geringere Konzentrationen gebracht wurden. Getestet wurden die Organismen alleine oder mit zwei *C. difficile*-Isolaten, die einzeln in einer der 3fachen Nachweisgrenze (LOD) des **cobas**® Cdiff-Tests entsprechenden Konzentration vorlagen. Die Ergebnisse zeigten an, dass keiner der Organismen die Detektion der vorgesehenen Cdiff-Zielsequenzen störte. In keinem Fall kam es zu falsch-positiven Ergebnissen, wenn keine vorgesehene *C. difficile*-Zielsequenz vorhanden war.

Die analytische Spezifität von *Clostridium botulinum* wurde durch einen Abgleich mit der GenBank Sequenzdatenbank mit Hilfe des BLAST Programms bestätigt, mit der der Schritt zur Erzeugung des PCR-Amplifikats nachgeahmt wird.

*Bakterien wurden in CFU/ml (Colony Forming Units, koloniebildenden Einheiten), Humanzellen in Zellen/ml und Viren in PFU/ml (Plaque Forming Units, plaque-bildende Einheit) quantifiziert – mit Ausnahme der folgenden Mikroorganismen. *Chlamydia trachomatis* wurde in EK/ml (Elementarkörperchen) quantifiziert. Das Cytomegalievirus, das humane Echovirus und das humane Enterovirus wurden in IE/ml quantifiziert.

Tabelle 8 Mikroorganismen und humane Zellen

<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter Iwoffii</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Alcaligenes faecalis subsp. 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 vanA</i>	<i>Enterococcus gallinarum vanC</i>
<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>	<i>HCT-15</i> Humanzellen	<i>Helicobacter fennelliae</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Leminorella grimontii</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 subsp. choleraesuis</i>	<i>Salmonella enterica subsp. arizonae</i> (früher <i>Salmonella choleraesuis subsp. choleraesuis</i>)
<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar 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>	Cytomegalievirus (HHV5)*	Humanes Adenovirus Typ 40*
Humanes Coxsackie-Virus A10	Humanes Enterovirus 11	Humanes Enterovirus 71
Humanes Rotavirus*	Norovirus GII	-

* Für die Tests wurden das Cytomegalievirus (HHV5) auf eine Konzentration von $2,0 \times 10^3$ PFU/ml, das humane Adenovirus Typ 40 auf eine Konzentration von $2,2 \times 10^3$ PFU/ml und das humane Rotavirus auf eine Konzentration von $9,8 \times 10^3$ PFU/ml gebracht.

Tabelle 9 Organismen der Gattung *Clostridiaceae*, einschließlich nicht-toxischem *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> Serogruppe B (nicht-toxisch)	<i>Clostridioides difficile</i> Serogruppe I (nicht-toxisch)	<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> (umbenannt in <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>	-	-

* Basierend auf Ergebnissen des BLAST Programms.

Störeinflüsse

Es wurden die potentiellen Störeinflüsse von 26 gängigen Medikamenten sowie von Stuhlfett, Vollblut und Schleim auf den **cobas**® Cdiff-Test untersucht. Alle Substanzen wurden in Konzentrationen getestet, die über den bei Abstrichen aus Stuhlproben zu erwartenden Werten lagen. Die Menge der Störsubstanz wird als Konzentration in der Primärstuhlprobe angegeben. Zwei *C. difficile*-Isolate wurden auf eine Konzentration an der 3fachen Nachweisgrenze (LOD) des **cobas**® Cdiff-Tests gebracht und in den Tests als Zielorganismen verwendet. Bei den exogenen Substanzen wurden keine Störeinflüsse beobachtet. Bei Stuhlfett wurden bis zu einer Konzentration von 28 % keine Störeinflüsse festgestellt, bei Vollblut bis zu einer Konzentration von 50 % und bei Schleim bis zu einer Konzentration von 25 %. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10 Ergebnisse der Tests von Störsubstanzen

Substanz	Konzentration	Ergebnisse
Stuhlfett	4 ~ 28 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Vollblut	25, 50 % (Vol.-%)	Kein Störeinfluss
Schleim	25, 50 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss bis 25 % (Massenvol.-%)
Tums (Antazidum)	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Vancomycin	1 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Metronidazol	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Imodium AD®	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Stuhlweichmacher	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Pepto-Bismol® (Procter & Gamble)	10 % (Vol.-%)	Kein Störeinfluss
Nystatin-Salbe USP	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Preparation H® mit Bio-Dyne® Creme (Wyeth)	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
GYNOL II	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Vagisil® Creme gegen Juckreiz	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Anusol® Plus	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Sonnencreme	1 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Monistat® 7	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Vaseline™	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
SAB-Dimenhydrinate® Zäpfchen (SABEX®)	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Mineralöl	10 % (Vol.-%)	Kein Störeinfluss
Equate Natural Vegetable Laxative (pflanzliches Abführmittel)	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Dulcolax®	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Fleet® (CB Fleet Company)	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
K-Y Jelly/Gelée® (McNeil-PPC)	1 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Afrin Original Nasenspray	10 % (Vol.-%)	Kein Störeinfluss
Hamamelis virginiana	Flüssigkeit aus 1 Wischbewegung/Abstrich	Kein Störeinfluss
E-Z-HD™ Hochdichtes Bariumsulfat zur Suspension (E-Z-EM Canada)	20 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Palmitinsäure	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Stearinsäure	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss
Aleve	10 % (Massenvol.-%)	Kein Störeinfluss

Klinische Leistung bei Verwendung klinischer Proben

Die Leistung des **cobas**® Cdiff-Tests wurde mit der Leistung eines von der FDA zugelassenen und CE-gekennzeichneten NAT (Nukleinsäuretests) auf dem neuesten Stand der Technik verglichen. Dabei wurde ein Gewebekultur-Zytotoxizitätstest an *C. difficile*-Isolaten aus direkter Kultur als Referenzmethode herangezogen. Stuhlproben aus 3 Krankenhäusern wurden mit dem **cobas**® Cdiff-Test und dem Vergleichs-NAT getestet und für den Gewebekultur-Zytotoxizitätstest an ein Referenzlabor gesendet.

Der **cobas**® Cdiff-Test und der Vergleichs-NAT wurden jeweils gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Der Gewebekultur-Zytotoxizitätstest wurde mittels Direktkultur durchgeführt. Jede Stuhlprobe wurde auf vorreduzierten Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (CCFA-HT) geimpft. Verdächtige Kolonien wurden mittels Gram-Färbung, Aerobie-Unverträglichkeit sowie Pro-Disk-Test als *C. difficile* identifiziert und in anaerobe Hackfleischbouillon geimpft. Die Überstände der anaeroben Hackfleischbouillon wurden dann zur Detektion des *C. difficile*-Toxins B mit dem Gewebekultur-Zytotoxizitätstest (C. DIFFICILE TOX-B test, Techlab) aufbereitet.

Es nahmen insgesamt 1.434 Testpersonen in fünf Zentren teil. 156 Testpersonen wurden aufgrund unvollständiger Ergebnisse ausgeschlossen. Durch Direktkultur wurden 152 *C. difficile*-positive Proben ermittelt (Prävalenz: 11,9 %). Die Leistung des **cobas**® Cdiff-Tests und des Vergleichs-NAT im Vergleich zur Direktkultur sind in Tabelle 11 und Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 11 cobas® Cdiff-Test und Direktkultur im Vergleich

		Direktkultur		
		Positiv	Negativ	Gesamt
cobas® Cdiff-Test	Positiv	147	30	177
	Negativ	5	1.096	1.101
	Gesamt	152	1.126	1.278

Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität und Spezifität des **cobas**® Cdiff-Tests im Vergleich zur Direktkultur beträgt 96,7 % (zweiseitiges 95 %-Konfidenzintervall: 92,5–98,6 %) bzw. 97,3 % (zweiseitiges 95 %-Konfidenzintervall: 96,2–98,1 %).

Positiver und negativer prädiktiver Wert

Der beobachtete positive und negative prädiktive Wert des **cobas**® Cdiff-Tests für Studienproben beträgt 83,1 % (zweiseitiges 95 %-Konfidenzintervall: 76,7–88,3 %) bzw. 99,5 % (zweiseitiges 95 %-Konfidenzintervall: 98,9–99,9 %).

Tabelle 12 Vergleichs-Nukleinsäuretest (NAT) im Vergleich zur Direktkultur

		Direktkultur		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Vergleichs-NAT	Positiv	147	29	176
	Negativ	5	1.097	1.102
	Gesamt	152	1.126	1.278

Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität und Spezifität des Vergleichs-NAT im Vergleich zur Direktkultur beträgt 96,7 % (zweiseitiges 95 %-Konfidenzintervall: 92,5–98,6 %) bzw. 97,4 % (zweiseitiges 95 %-Konfidenzintervall: 96,3–98,2 %).

Korrelation mit dem Vergleichs-NAT

Die Leistung des **cobas**® Cdiff-Tests im direkten Vergleich mit einem von der FDA zugelassenen und CE-gekennzeichneten Vergleichs-NAT auf dem neuesten Stand der Technik ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13 cobas® Cdiff-Test im Vergleich zum Vergleichs-Nukleinsäuretest (NAT)

		Vergleichs-NAT		
		Positiv	Negativ	Gesamt
cobas® Cdiff-Test	Positiv	167	10	177
	Negativ	9	1.092	1.101
	Gesamt	176	1.102	1.278

Prozentuale positive und negative Übereinstimmung

Die prozentuale positive und negative Übereinstimmung des **cobas**® Cdiff-Tests mit dem Vergleichs-NAT beträgt 94,9 % (zweiseitiges 95 %-Konfidenzintervall: 90,6–97,3 %) bzw. 99,1 % (zweiseitiges 95 %-Konfidenzintervall: 98,3–99,5 %).

Weitere Informationen

Wichtigste Leistungsmerkmale des Assays

Probentyp	Ungeformter Stuhl
Erforderliche Probenmenge	4,3 ml cobas ® PCR Media im Primärgefäß, für einen cobas ® Cdiff-Test werden mindestens 3 ml benötigt.
Testdauer	Die Ergebnisse liegen innerhalb von 2,5 Stunden nach dem Laden der Proben in das System vor (1–22 Proben).
Analytische Sensitivität	Von 54 bis 460 CFU/Abstrich, je nach Isolat.
Spezifität	Keine Kreuzreaktivität mit 125 eng verwandten Organismen und Organismen, die üblicherweise in Stuhlproben vorhanden sind.
Subtypenerfassung	Alle bekannten <i>C. difficile</i> (Toxinotypen 0–XXXI, außer nicht-toxigene Toxinotypen XI) einschließlich des hypervirulenten epidemischen Stamms BI/ NAP1/027.

Symbole

Die folgenden Symbole werden bei der Etikettierung von Roche PCR-Diagnostikprodukten verwendet.

Tabelle 14 Symbole auf den Etiketten von Roche PCR-Diagnoseprodukten

 Alter oder Geburtsdatum	 Produkt nicht für eine patientennahe Testung geeignet	 Quantifizierungsstandard zur Berechnung der Ergebnisse, in Internationalen Einheiten pro PCR-Reaktion
 Zusatz-Software	 Produkt nicht für Selbsttests geeignet	 Seriennummer
 Sollbereich (Kopien/mL)	 Vertrieb <i>(Hinweis: ggf. Angabe von Land/Region unter dem Symbol)</i>	 Zentrum, Labor
 Sollbereich (IE/mL)	 Nicht wiederverwenden	 Standardverfahren
 Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft	 Frauen, weiblich	 Mit Ethylenoxid sterilisiert
 Barcode-Datenblatt	 Nur zur Beurteilung der IVD-Leistung	 Im Dunkeln lagern
 Chargenbezeichnung	 Globale Artikelnummer GTIN	 Temperaturbegrenzung
 Biogefährdung	 Import	 Testdefinitionsdatei
 Bestellnummer	 <i>In-vitro</i> -Diagnostikum	 Diese Seite oben
 CE-Kennzeichnung für Konformität; dieses Produkt entspricht den geltenden Vorschriften für die CE-Kennzeichnung für <i>In-vitro</i> -Diagnostika.	 Unterer Grenzwert des Sollbereichs	 Ultrasensitives Verfahren
 Entnahmedatum	 Männer, männlich	 Einmalige Produktkennung
 Gebrauchsanweisung beachten	 Hersteller	 Oberer Grenzwert des Sollbereichs
 Ausreichend für <n> Tests	 Negativkontrolle	 Fülllinie für Urin
 Inhalt der Packung	 Nicht steril	 Nur für die USA: In den USA darf dieses Produkt nach den gesetzlichen Vorschriften nur durch einen Arzt oder auf ärztliche Verschreibung abgegeben werden.
 Kontrolle	 Patientename	 Verwendbar bis
 Herstellungsdatum	 Patienten-ID	
 Produkt für patientennahe Tests	 Hier abziehen	
 Produkt zur Eigenanwendung	 Positivkontrolle	
	 Quantifizierungsstandard zur Berechnung der Ergebnisse, in Kopien pro PCR-Reaktion	

Technischer Support

Für technischen Support wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Hersteller und Importeur

Tabelle 15: Hersteller und Importeur



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

Hergestellt in den USA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

Marken und Patente

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

Copyright

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Literatur

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, Borrielo 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.

Dokumentversion

Dokumentversionsübersicht	
Doc Rev. 7.0 04/2023	<p>Im gesamten Dokument wurde „<i>Clostridium</i>“ zu „<i>Clostridioides</i>“ geändert.</p> <p>Es wurden alle Verweise auf das Cdiff-Testkit für 240 Proben gelöscht, da es dieses nicht mehr gibt.</p> <p>Im Abschnitt Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung wurde der Hinweis hinzugefügt, dass sich der Benutzer im Falle schwerwiegender Vorkommnisse an die zuständigen Behörden wenden soll.</p> <p>Im Abschnitt Integrität wurde eine Warnung zu Reagenzien und Behältern hinzugefügt, die sichtbar beschädigt sind bzw. aus denen Flüssigkeiten auslaufen.</p> <p>Der Abschnitt Korrelation wurde zu Klinische Leistung bei Verwendung klinischer Proben geändert.</p> <p>Es wurde ein Weblink zur Zusammenfassung des Berichts zu Sicherheit und Leistung hinzugefügt.</p> <p>Das CE-Zeichen mit der Nummer der benannten Stelle wurde hinzugefügt.</p> <p>Die Symbolbezeichnungen auf der Symbolseite wurden im Zuge der Harmonisierung aktualisiert.</p> <p>Die Angaben zum Hersteller wurden aktualisiert.</p> <p>Der Abschnitt Marken und Patente einschließlich des darin enthaltenen Links wurde aktualisiert.</p> <p>Auf der Titelseite wurde das Symbol „Rx Only“ eingefügt.</p> <p>Es wurde die Angabe hinzugefügt, wo das Produkt hergestellt wurde.</p> <p>Der Abschnitt Technischer Support wurde hinzugefügt.</p> <p>Die Marke cobas® wurde aktualisiert.</p> <p>Bei Fragen wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort.</p>

Unter dem folgenden Link finden Sie eine Zusammenfassung des Berichts zu Sicherheit und Leistung:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>