

cobas[®] Cdiff testi

cobas[®] 4800 sisteminde kullanım için

In vitro tanıda kullanım içindir



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

İÇİNDEKİLER

Kullanım amacı.....	4
Test özeti ve açıklaması / prosedürün prensipleri.....	4
Temel bilgiler: <i>C. difficile</i> 'nin taranması	4
Testin açıklaması	5
Prosedür prensipleri	5
Numunenin hazırlanması	5
PCR amplifikasyonu ve TaqMan® saptaması	5
Selektif amplifikasyon	6
Materyaller, reaktifler ve numuneler	6
Sağlanan malzemeler ve reaktifler	6
Reaktif saklama ve kullanma	12
Diğer gerekli materyaller	12
İsteğe bağlı materyal	12
Gereken ancak sağlanmayan cihaz ve yazılımlar	13
Önlemler ve taşıma gereklilikleri.....	13
Uyarılar ve önlemler	13
İyi laboratuvar uygulamaları	13
Kontaminasyon	14
Bütünlük	14
İmha	14
Numune alma, taşıma ve saklama	15
Numunelerin toplanması	15
Numunelerin taşınması, saklanması ve stabilitesi	15
Test prosedürü.....	16
Testin çalıştırılması	16
İş akışı	16
Kullanım talimatları	16
Sonuçlar	20
Kalite kontrol ve sonuçların geçerliliği	20
Pozitif kontrol	20
Negatif kontrol	20
Dahili kontrol	20
Sonuçların yorumlanması	21
Sonuç işaretlerinin listesi	22

Prosedür ile ilgili sınırlamalar	22
Klinik olmayan performans değerlendirmesi	24
Analitik hassasiyet.....	24
<i>C. difficile</i> genotiplerinin saptanması.....	24
Kesinlik.....	26
Analitik özgüllük.....	27
İnterferans.....	29
Klinik numuneler kullanılarak klinik performans	30
Ek bilgiler.....	32
Temel test özellikleri.....	32
Semboller	33
Teknik destek	34
Üretici ve ithalatçı.....	34
Ticari markalar ve patentler	34
Telif hakkı	34
Bibliyografya.....	35
Belge revizyonu	37

Kullanım amacı

cobas® 4800 sisteminde **cobas®** Cdiff testi, *C. difficile* enfeksiyonundan (CDI) şüphelenilen hastalardan alınan şekilsiz (sıvı veya yumuşak) dışkı numunelerinde toksijenik *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) toksin B (*tcdB*) geninin doğrudan saptanması için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunu (PCR) kullanan otomatik, kalitatif bir *in vitro* tanı testidir. **cobas®** Cdiff testi, klinik ve epidemiyolojik risk faktörleri ile birlikte insanlarda CDI tanısında yardımcı olarak kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Test özeti ve açıklaması / prosedürün prensipleri

Temel bilgiler: *C. difficile*'nin taranması

C. difficile, 1970'lerin sonlarında antibiyotikle ilişkili diyare ve psödomembranöz kolitin etiyolojik ajanı olarak tanımlanan gram pozitif, anaerobik, spor oluşturan bir basildir.^{1, 2} Antibiyotikle ilişkili diyare vakalarının %15-20'sinden ve antibiyotikle ilişkili psödomembranöz kolit vakalarının neredeyse tamamından sorumlu olduğuna inanılmaktadır.³ Son on yılda *C. difficile* ile ilişkili enfeksiyonun (CDI) insidansı progresif olarak artmıştır ve artık gelişmiş ülkelerde önemli bir klinik sorundur. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki akut bakım hastanelerinde insidans oranları 100.000 kişilik bir popülasyonda 30-40 vaka aralığındayken, 2005 yılında insidans 100.000'de 80'in üzerine çıkmıştır.⁴ CDI salgınları daha önce tanımlanmıştır.⁵ CDI ile ilişkili doğrudan maliyet ABD'de vaka başına 6326 \$'dır.⁶

İnsidanstaki artışlar, kısmen ribotip 027/Kuzey Amerika pulstotip 1 (NAP1) ve toksinotip III olarak sınıflandırılan ve hipervirülan olduğu varsayılan bir suşun ortaya çıkması ile ilişkilendirilmiştir. *C. difficile*'nin toksijenik suşları tipik olarak iki toksin üretir: toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin).⁷ Suşların küçük bir yüzdesi yalnızca toksin B üretir.⁸

Yakın zamanda, ikili toksin olarak adlandırılan başka bir toksin üreten ve negatif düzenleyici gen *tcdC*'de bir delesyon taşıyan suşlarda virülans artışı tanımlanmıştır.^{9, 10} Son suşların *in vitro* ortamda daha virülan olduğu ve insanlarda daha fazla morbidite ve mortaliteye neden olduğu bildirilmiştir.^{11, 12}

Toksijenik *C. difficile* ile kolonizasyonu takiben bireyler asemptomatik taşıyıcılar olabilir veya kolon hastalığı geliştirebilir. CDI'nin klinik özellikleri hafif diyare ile karın ağrısı, profüz diyare ve ateş, anoreksi, bulantı ve malazi gibi sistemik semptomlarla karakterize edilen hayatı tehdit eden psödomembranöz kolit aralığında değişebilir.

CDI tanısı genellikle dışkı numunelerinde toksin A ve/veya B'nin varlığının gösterilmesi ile belirlenir. Toksin B'nin bir hücre tek katmanı üzerinde gösterdiği sitopatik etkinin ortaya konması, geleneksel "altın standarttır".^{13, 14} Sitopatik etkinin gösterilmesi, dışkı üst fazının hücrelerin tek katman üzerinde doğrudan inkübasyonu ile sağlanabilir; alternatif olarak, *C. difficile* izolatları selektif besiyerinde çoğaltılabilir ve hücre tek katmanı (toksijenik kültür) üzerinde daha sonra inkübasyon için üst faz elde edilebilir.¹⁵ Her iki teknik de nihai test sonucunun elde edilmesi için en az 48 ila 72 saat gerektirir. Toksin A ve B'nin saptanması için kullanılan immünokimya testleri 4 saatten daha kısa sürede pozitif sonuç verdiği için yaygın olarak kullanılmaktadır; ancak hassasiyetleri doku kültürüne kıyasla önemli ölçüde düşüktür.¹⁶ CDI'yi destekleyen klinik kriterlerle karşılaştırıldığında, PCR'in < 4 saatlik geri dönüş süresi ile sırasıyla %93,3, %97,4, %75,5 ve %99,4'lük bir hassasiyet, özgüllük ve pozitif ve negatif tahmin değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir.¹⁵ PCR, *C. difficile* toksininin saptanması için optimum hızlı tek test olarak kabul edilmiştir.¹⁷⁻²⁰ CDI insidansı ve

şiddetindeki dramatik artışa rağmen, metronidazol veya vankomisin, akut ataklar ve tekrarlayan enfeksiyon için tercih edilen tıbbi tedavi olmaya devam etmektedir.²¹

Enfeksiyon kontrol önlemleri antimikrobiklerin dikkatli kullanımını, çapraz enfeksiyonun önlenmesini ve vakaların aktif gözetimi içerir.²² Toksinler, klinik semptomlar olmadan uzun süre mevcut olabileceğinden “tedavi ile iyileşme testi” için testin tekrarlanması önerilmez.

Dolayısıyla, *C. difficile*'nin yüksek hassasiyetli ve hızlı bir şekilde otomatik olarak saptanmasına çok ihtiyaç vardır. Moleküler yöntemler, saptama süresini önemli ölçüde kısaltma potansiyeli sunar, böylece antimikrobik tedavinin hızlı bir şekilde başlatılmasını ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin hızlı bir şekilde uygulanmasını sağlar.¹⁷⁻²⁰

Testin açıklaması

cobas® Cdiff testi, iki ana işlem içerir: (1) Nükleik asitleri şekilsiz dışkı numunelerinden ekstrakte etmek için otomatik numune hazırlama; (2) *C. difficile* spesifik primerler kullanılarak hedef DNA sekanslarının PCR amplifikasyonu ve bölünmüş floresan etiketli *C. difficile* spesifik oligonükleotid saptama problemlerinin gerçek zamanlı saptaması. Bağlantısız randomize DNA dizisini içeren bir dahili kontrol, otomatik numune hazırlamadan önce tüm numuneler eklenip amplifiye edilir ve bütün işlemi görüntülemek için her bir numune ile eş zamanlı olarak saptanır.

Prosedür prensipleri

Numunenin hazırlanması

cobas® Cdiff testi için numunenin hazırlanması **cobas®** x 480 cihazı kullanımı ile otomatik hale getirilir. Organizmalar kaotropik ajan olan proteinaz K ve SDS reaktifleri ile parçalanır. Eklenen dahili kontrol DNA'sı ile birlikte salgılanan nükleik asitler manyetik cam partiküllerle bağlanır. Yıkılır ve daha sonra küçük hacimli bir tampon içinde elüte edilirler. Cihaz daha sonra elüte edilen materyalden bir alikot alır ve aktive edilmiş bir Master Mix ile PCR reaksiyonunu ayarlar.

PCR amplifikasyonu ve TaqMan® saptaması

PCR döngüsü adımları ve hedef sinyalin saptanması **cobas®** z 480 analizöründe gerçekleşir. Master Mix reaktifi, iki hedef için primer çiftleri ve problemler içerir: toksin B ve dahili kontrol. Hedef nükleik asit sekansları varsa PCR ürünlerinin (amplikonlar) üretilmesiyle sonuçlanacak şekilde termostabil DNA polimeraz yoluyla karşılık gelen primerlerle amplifikasyon gerçekleşir. Bu ürünler, bir floresan boya ve bir söndürücü içeren spesifik TaqMan problemleri ile saptanır. Normalde söndürücü, boyanın floresanını baskılar. Bununla birlikte PCR ürünü mevcutsa, prob ürüne hibridize olur ve polimerazın 5'-ila 3'-nükleaz aktivitesi ile klevajlanır. Bu reaksiyon, boyadan floresan yayılmasına izin verir ve sinyal, **cobas®** z 480 analizörü tarafından her PCR döngüsünde gerçek zamanlı olarak kaydedilir. Sinyal, **cobas®** 4800 sistem yazılımı tarafından yorumlanır ve nihai sonuçlar olarak raporlanır.

Selektif amplifikasyon

Numuneden hedef nükleik asidin selektif amplifikasyonu, AmpErase (urasil-N-glikozilaz) enzimi ve deoksiüridin trifosfat (dUTP) kullanımı ile **cobas®** Cdiff testinde kapsamında elde edilir. AmpErase enzimi, deoksitimidin içeren DNA zincirlerini değil deoksiüridin²³ içeren DNA zincirlerini tanır ve bunların yıkımını katalize eder. Deoksiüridin doğal oluşumlu DNA'da yoktur ancak Master Mix reaktifinde dNTP'lerden biri olarak timidin trifosfatın yerine deoksiüridin trifosfat kullanıldığı için ampikon DNA'da her zaman mevcuttur; bu nedenle sadece ampikon, deoksiüridin içerir. Deoksiüridin, kontamine edici ampikonu, hedef DNA'nın amplifiye edilmesi öncesinde AmpErase enzimiyle yıkılmaya maruz bırakır. Master Mix reaktifinde yer alan AmpErase enzimi, C1 konumunda deoksiriboz zincirini açarak deoksiüridin kalıntılarında deoksiüridin içeren DNA'nın bölünmesini katalizler. Master Mix'in alkalın pH seviyesinde birinci ısı döngü adımında ısıtıldığında, ampikon DNA zinciri deoksiüridin konumunda kırılır, böylece DNA amplifiye edilemez duruma gelir. AmpErase enzimi, 55°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, yani termal döngü aşamalarının tümünde inaktiftir ve böylece hedef ampikonu yıkmaz. **cobas®** Cdiff testinin, PCR başına en az 1000 kopya deoksiüridin içeren *C. difficile* ampikonunu inaktive edebildiği gösterilmiştir.

Materyaller, reaktifler ve numuneler

Sağlanan malzemeler ve reaktifler

Kit/Kasetler	Bileşenler ve reaktif içerikleri	Test başına kullanılan miktar	Güvenlik sembolü ve uyarı*
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 240 test (P/N: 05235782190)	MGP (cobas® 4800 System Magnetic Glass Particles) Manyetik cam partiküller %93 izopropanol ^b	10 × 4,5 mL	 TEHLİKE H225: Kolay alevlenir sıvı ve buhar. H319: Ciddi göz tahrişine yol açar. H336: Rahavete veya baş dönmesine yol açabilir. P210: Isıdan/kıvılcımdan/alevden/sıcak yüzeylerden uzak tutun. Sigara içilmez. P233: Kabı sıkıca kapalı tutun. P261: Sisi veya buharı solumaktan kaçının. P280: Koruyucu laboratuvar eldiveni/koruyucu kıyafet/göz koruması/yüz koruması/işitme koruması kullanın. P303 + P361 + P353: DERİ (veya saç) İLE TEMAS HALİNDE İSE: Kirlenmiş tüm giysilerinizi hemen kaldırın/çıkarın. Cildinizi su ile durulayın. P370 + P378: Yangın durumunda: Söndürme için kuru kum, kuru kimyasal veya alkole dirençli köpük kullanın. 67-63-0 Propan-2-ol
	EB (cobas® 4800 System Elution Buffer) Tris tamponu %0,09 sodyum azit	10 × 18 mL	Yok

Kit/Kasetler	Bileşenler ve reaktif içerikleri	Test başına kullanılan miktar	Güvenlik sembolü ve uyarı*
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 960 test (P/N: 05235804190)	MGP (cobas® 4800 System Magnetic Glass Particles) Manyetik cam partiküller %93 izopropanol ^b	10 × 13,5 mL	 TEHLİKE H225: Kolay alevlenir sıvı ve buhar. H319: Ciddi göz tahrişine yol açar. H336: Rehavete veya baş dönmesine yol açabilir. P210: Isıdan/kıvılcımdan/alevden/sıcak yüzeylerden uzak tutun. Sigara içilmez. P233: Kabı sıkıca kapalı tutun. P261: Sisi veya buharı solumaktan kaçının. P280: Koruyucu laboratuvar eldiveni/koruyucu kıyafet/göz koruması/yüz koruması kullanın. P303 + P361 + P353: DERİ (veya saç) İLE TEMAS HALİNDE İSE: Kirlenmiş tüm giysilerinizi hemen kaldırın/çıkarın. Cildinizi su ile durulayın. P370 + P378: Yangın durumunda: Söndürme için kuru kum, kuru kimyasal veya alkole dirençli köpük kullanın. 67-63-0 Propan-2-ol
	EB (cobas® 4800 System Elution Buffer) Tris tamponu %0,09 sodyum azit	10 × 18 mL	Yok

* Ürün güvenlik etiketi öncelikli olarak AB GHS kılavuzlarına tabidir.

** Tehlikeli madde.

Kit/Kasetler	Bileşenler ve reaktif içerikleri	Test başına kullanılan miktar	Güvenlik sembolü ve uyarı*
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 240 test (P/N: 06768253190)	LYS-1 (cobas® 4800 System Lysis Buffer 1) Sodyum sitrat %5 polidokanol ^b %42,6 guanidinyum tiyosiyanat ^b Ditiyotireitol ^b	10 × 10 mL	 TEHLİKE H302: Yutulması halinde zararlıdır. H314: Ciddi cilt yanıklarına ve göz hasarına yol açar. H411: Sucul ortamda uzun süre kalıcı, toksik etki. EUH032: Asitlerle temasında çok toksik gaz çıkarır. EUH071: Solunum yolu için aşındırıcıdır. P273: Çevreye verilmesinden kaçının. P280: Koruyucu laboratuvar eldiveni/koruyucu kıyafet/göz koruması/ yüz koruması/işitme koruması kullanın. P303 + P361 + P353: DERİ (veya saç) İLE TEMAS HALİNDE İSE: Kirlenmiş tüm giysilerinizi hemen kaldırın/çıkarın. Cildinizi su ile durulayın. P304 + P340 + P310: SOLUNDUĞUNDA: Zarar gören kişiyi temiz havaya çıkartın ve kolay biçimde nefes alması için rahat bir pozisyonda tutun. Hemen ULUSAL ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİN 114 NOLU TELEFONUNU veya doktoru arayın. P305 + P351 + P338 + P310: GÖZ İLE TEMASI HALİNDE: Su ile birkaç dakika dikkatlice durulayın. Takılı ve yapması kolaysa, kontak lensleri çıkartın. Durulamaya devam edin. Hemen ULUSAL ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİN 114 NOLU TELEFONUNU veya doktoru arayın. P391: Döküntüleri toplayın. 593-84-0 Guanidinyum tiyosiyanat 9002-92-0 Polidokanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol
	PK (cobas® 4800 System Proteinase K) Tris tamponu EDTA Kalsiyum klorür Kalsiyum asetat < %2,0 proteinaz K ^b Gliserin	10 × 0,9 mL	 TEHLİKE H317: Alerjik cilt reaksiyonlarına yol açar. H334: Solunması halinde nefes alma zorlukları, astım nöbetleri veya alerjiye yol açabilir. P261: Sisi veya buharı solumaktan kaçının. P280: Koruyucu eldiven kullanın. P284: Solunum koruyucu giyin. P304 + P340: SOLUNDUĞUNDA: Zarar gören kişiyi temiz havaya çıkartın ve kolay biçimde nefes alması için rahat bir pozisyonda tutun. P333 + P313: Ciltte tahriş veya döküntü söz konusu ise: Tıbbi yardım/ bakım alın. P342 + P311: Solunumla bulguları gösterirse: ULUSAL ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİN 114 NOLU TELEFONUNU veya doktoru. 39450-01-6 Proteinaz, <i>Tritirachium album</i> serin
	SDS (cobas® 4800 System SDS Reagent) Tris tamponu Sodyum dodesil sülfat %0,09 sodyum azit	10 × 3 mL	Yok

Kit/Kasetler	Bileşenler ve reaktif içerikleri	Test başına kullanılan miktar	Güvenlik sembolü ve uyarı*
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 960 test (P/N: 06768270190)	LYS-1 (cobas® 4800 System Lysis Buffer 1) Sodyum sitrat %5 polidokanol ^b %42,6 guanidinyum tiyosiyanat ^b Ditiyotireitol ^b	10 × 36 mL	 TEHLİKE H302: Yutulması halinde zararlıdır. H314: Ciddi cilt yanıklarına ve göz hasarına yol açar. H411: Sucul ortamda uzun süre kalıcı, toksik etki. EUH032: Asitlerle temasında çok toksik gaz çıkarır. EUH071: Solunum yolu için aşındırıcıdır. P273: Çevreye verilmesinden kaçının. P280: Koruyucu laboratuvar eldiveni/koruyucu kıyafet/göz koruması/ yüz koruması/işitme koruması kullanın. P303 + P361 + P353: DERİ (veya saç) İLE TEMAS HALİNDE İSE: Kirlenmiş tüm giysilerinizi hemen kaldırın/çıkarın. Cildinizi su ile durulayın. P304 + P340 + P310: SOLUNDUĞUNDA: Zarar gören kişiyi temiz havaya çıkartın ve kolay biçimde nefes alması için rahat bir pozisyonda tutun. Hemen ULUSAL ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİN 114 NOLU TELEFONUNU veya doktoru arayın. P305 + P351 + P338 + P310: GÖZ İLE TEMASI HALİNDE: Su ile birkaç dakika dikkatlice durulayın. Takılı ve yapması kolaysa, kontak lensleri çıkartın. Durulamaya devam edin. Hemen ULUSAL ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİN 114 NOLU TELEFONUNU veya doktoru arayın. P391: Döküntüleri toplayın. 593-84-0 Guanidinyum tiyosiyanat 9002-92-0 Polidokanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol
	PK (cobas® 4800 System Proteinase K) Tris tamponu EDTA Kalsiyum klorür Kalsiyum asetat < %2,0 proteinaz K ^b Gliserin	20 × 1,2 mL	 TEHLİKE H317: Alerjik cilt reaksiyonlarına yol açar. H334: Solunması halinde nefes alma zorlukları, astım nöbetleri veya alerjiye yol açabilir. P261: Sisi veya buharı solumaktan kaçının. P280: Koruyucu eldiven kullanın. P284: Solunum koruyucu giyin. P304 + P340: SOLUNDUĞUNDA: Zarar gören kişiyi temiz havaya çıkartın ve kolay biçimde nefes alması için rahat bir pozisyonda tutun. P333 + P313: Ciltte tahriş veya döküntü söz konusu ise: Tıbbi yardım/ bakım alın. P342 + P311: Solunumla bulguları gösterirse: ULUSAL ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİN 114 NOLU TELEFONUNU veya doktoru. 39450-01-6 Proteinaz, <i>Tritirachium album</i> serin
	SDS (cobas® 4800 System SDS Reagent) Tris tamponu Sodyum dodesil sülfat %0,09 sodyum azit	10 × 9 mL	Yok

* Ürün güvenlik etiketi öncelikli olarak AB GHS kılavuzlarına tabidir.

** Tehlikeli madde.

06979394001-01TR

Doc. Rev. 10.0

Kit/Kasetler	Bileşenler ve reaktif içerikleri	Test başına kullanılan miktar	Güvenlik sembolü ve uyarı*
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 240 test (P/N: 05235863190)	WB (cobas® 4800 System Wash Buffer) Sodyum sitrat dihidrat %0,05 N-metilizotiyazolon HCl**	10 × 55 mL	 UYARI H317: Alerjik cilt reaksiyonlarına yol açar. P261: Sisi veya buharı solumaktan kaçının. P272: Kirlenmiş kıyafetleri işyeri dışına çıkarmayın. P280: Koruyucu eldiven kullanın. P333 + P313: Ciltte tahriş veya döküntü söz konusu ise: Tıbbi yardım/bakım alın. P362 + P364: Kirlenmiş giysilerinizi çıkarın ve yeniden kullanmadan önce yıkayın. P501: İçeriği/kabı onaylı bir atık imha tesisine atın. 26172-54-3 2-metil-2H-izotiyazol-3-on hidroklorür
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 960 test (P/N: 05235871190)	WB (cobas® 4800 System Wash Buffer) Sodyum sitrat dihidrat %0,05 N-metilizotiyazolon HCl**	10 × 200 mL	 UYARI H317: Alerjik cilt reaksiyonlarına yol açar. P261: Sisi veya buharı solumaktan kaçının. P272: Kirlenmiş kıyafetleri işyeri dışına çıkarmayın. P280: Koruyucu eldiven kullanın. P333 + P313: Ciltte tahriş veya döküntü söz konusu ise: Tıbbi yardım/bakım alın. P362 + P364: Kirlenmiş giysilerinizi çıkarın ve yeniden kullanmadan önce yıkayın. P501: İçeriği/kabı onaylı bir atık imha tesisine atın. 26172-54-3 2-metil-2H-izotiyazol-3-on hidroklorür
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 20 çalışma (P/N: 06768318190)	IC-1 (cobas® 4800 IC-1) Tris tamponu EDTA < %0,01 Poly rA RNA (sentetik) %0,05 sodyum azit < %0,01 Lambda bakteriyofaj kaplamalı proteinde kapsüllenmiş bulaşıcı olmayan, sentetik dahili kontrol DNA	20 × 0,5 mL	Yok

Kit/Kasetler	Bileşenler ve reaktif içerikleri	Test başına kullanılan miktar	Güvenlik sembolü ve uyarı*
cobas® 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit 80 test (P/N: 06768237190)	Cdiff MMX (cobas® Cdiff Master Mix) Trisin tamponu EDTA DMSO Potasyum asetat Potasyum hidroksit Tween 20 < %0,19 dATP, dCTP, dGTP, dUTP < %0,01 yukarı yönlü ve aşağı yönlü <i>C. difficile</i> ve dahili kontrol primerleri < %0,01 floresan etiketli <i>C. difficile</i> ve dahili kontrol problemleri < %0,01 oligonükleotid aptamer < %0,01 Z05 DNA polimeraz (mikrobik) < %0,02 AmpErase (ürasil-N-glikozilaz) enzimi (mikrobik) %0,09 sodyum azit	10 × 0,3 mL	Yok
cobas® 4800 Cdiff Controls and Cofactor Kit 10 çalışma (P/N: 06768300190)	Cdiff (+) C (cobas® Cdiff pozitif kontrol) Tris tamponu EDTA < %0,01 Poly rA RNA (sentetik) %0,05 sodyum azit < %0,01 <i>C. difficile</i> sekansı içeren bulaşıcı olmayan plazmid DNA (mikrobik)	10 × 0,5 mL	Yok
	(-) C (cobas® 4800 System Negative Control) Tris tamponu EDTA %0,05 sodyum azit < %0,01 Poly rA RNA (sentetik)	10 × 0,5 mL	Yok
	Cofactor-3 (cobas® 4800 Cofactor-3) Manganez asetat Magnezyum asetat Amerika Birleşik Devletleri kaynaklı sığır plazmasından sığır serum albümini %0,09 sodyum azit	10 × 1,7 mL	Yok

* Ürün güvenlik etiketi öncelikli olarak AB GHS kılavuzlarına tabidir.

**Tehlikeli madde.

Reaktif saklama ve kullanma

Reaktif	Saklama sıcaklığı	Saklama süresi
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit	2–8°C	Belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir
cobas® 4800 System Lysis Kit 1	2–8°C	Belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1	2–8°C	Belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir
cobas® 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit	2–8°C	Belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir
cobas® 4800 Cdiff Controls and Cofactor Kit	2–8°C	Belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit	15–25°C	Belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir

Not: Reaktifleri dondurmayın.

Reaktifin son kullanma tarihi, Koordineli Evrensel Saate (UTC) dayanır. Reaktifin son kullanma tarihi için yerel saat, UTC'ye göre yerel saat dilimine bağlı olarak artı veya eksi 12 saat ile dengelenebilir.

Diğer gerekli materyaller

Materyaller	P/N
CORE Uçlar, 1000 µL, 96'lı rak	04639642001
50 mL Reaktif Haznesi	05232732001
200 mL Reaktif Haznesi	05232759001
cobas® 4800 System Extraction Plate (derin kuyucuk) plakası kullanın	05232716001
cobas® 4800 sistemi AD (mikrokuyucuk) plakası 0,3 mL ve yalıtım filmi	05232724001
Kapattıcı folyo aplikatörü	04900383001
24 konumlu taşıyıcı	04639502001
Katı atık torbası	05530873001 (küçük) veya 04691989001 (büyük)
Hamilton STAR Plastic Chute	04639669001
cobas® PCR Media and Swab Sample Kit	07051891190
cobas® PCR Media Uni Swab Sample Kit	07958030190
Tek kullanımlık eldivenler, pudrasız	Pudrasız tek kullanımlık eldivenler kabul edilebilir.
Vorteks Karıştırıcı (tek tüp)	Herhangi bir vorteks karıştırıcı kabul edilebilir.
Minimum 1500 RCF'ye sahip salınlı kova rotoru ile donatılmış santrifüj	Uygun herhangi bir santrifüj kabul edilebilir.

Aynı satılan materyallerle ilgili daha fazla bilgi için, lütfen yerel Roche temsilcinizle iletişime geçin.

İsteğe bağlı materyal

Materyaller	P/N
Yalıtım matı veya derin kuyucuklu plaka kapağı	Roche 04789288001 veya Hamilton 6474-01
Kapaklar, renksiz (çalışma sonrası numunelerin tekrar kapatılması için)	Roche P/N 07958056190; 13 mL yuvarlak tabanlı tüplerdeki çalışma sonrası numunelerin tekrar kapaklanması için.

İsteğe bağlı materyallerle ilgili daha fazla bilgi için, lütfen yerel Roche temsilcinizle iletişime geçin.

Gereken ancak sağlanmayan cihaz ve yazılımlar

Gerekli cihaz ve yazılımlar, sağlanmamıştır
cobas® 4800 sistemi cobas® x 480 cihazı cobas® z 480 analizör Kontrol Ünitesi
cobas® 4800 sistemi cobas® Cdiff AP yazılımı versiyonu 1.0.1 veya üstü
cobas® 4800 sistemi uygulama yazılımı (ana) sürüm 2.2.0 veya üzeri

Ayrı satılan materyallerle ilgili daha fazla bilgi için, lütfen yerel Roche temsilcinizle iletişime geçin.

Önlemler ve taşıma gereklilikleri

Uyarılar ve önlemler

Herhangi bir test prosedüründe olduğu gibi, bu testin iyi performans sağlaması için iyi laboratuvar uygulamaları esastır. Bu testin analitik hassasiyetinin yüksek olması nedeniyle, reaktifleri, numuneleri ve amplifikasyon karışımlarını kontaminasyondan korumaya dikkat edilmelidir.

- Sadece *in vitro* tanı amaçlı kullanım içindir.
- Reaktiflerin ve numunelerin mikrobik ve DNA kontaminasyonunu önleyin.
- Güvenlik Bilgi Formları (SDS) talep halinde bölge Roche ofisinizden temin edilebilir.
- LYS-1 reaktifi guanidin tiyosiyanat içerir. Guanidin tiyosiyanat ve sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) ya da asitler veya bazlar gibi yüksek oranda reaktif diğer ajanlar arasında doğrudan temasa izin vermeyin. Bu karışımlar zehirli gaz salabilir.
- MGP izopropanol içerir ve yüksek oranda yanıcıdır. Alevden ve potansiyel kıvılcım çıkaran ortamlardan uzak tutun.
- MGP'nin manyetik alan kaynaklarına maruz kalmasını önleyin.
- EB, Cdiff MMX, SDS, Cofactor-3, (-)C, Cdiff (+)C ve IC-1 sodyum azid içerir.
- cobas®** x 480 cihazının veya **cobas®** z 480 analizörünün kontaminasyon riskini azaltmaya yönelik ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için **cobas®** 4800 sistemi – Yardım Asistanı'na bakın. Kontaminasyondan şüpheleniliyorsa **cobas®** 4800 sistemi – Yardım Asistanı'nda açıklandığı şekilde temizlik ve haftalık bakım gerçekleştirin.
- Bu testi kullanırken meydana gelebilecek tüm ciddi olayları yerel yetkili makama ve üreticiye bildirin.

Not: Özel talimatlar için bkz. “Numune toplama, taşıma ve saklama”.

İyi laboratuvar uygulamaları

- Ağzınızla pipetleme yapmayın.
- Laboratuvar çalışma ortamlarında yiyecek veya içecek tüketmeyin veya sigara içmeyin.
- Numunelerle ve kit reaktifleriyle işlem yaptıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın.

- Reaktiflerle işlem yaparken gözlük, laboratuvar önlüğü ve tek kullanımlık eldiven kullanın. Bu materyallerin cildinize, gözlerinize veya mukoza membranlarına temas etmesinden kaçınin. Temas etmeniz durumunda, vakit kaybetmeden bol miktarda suyla yıkayın. Tedavi edilmezse yanıklar oluşabilir. Dökülme meydana gelirse, silmeden önce suyla seyreltin.
- Distile veya deiyonize suya %0,5 oranında sodyum hipoklorit ekleyerek taze hazırlayacağınız çözeltiyle laboratuvardaki tüm çalışma yüzeylerini iyice temizleyin ve dezenfekte edin (ev temizliği için kullanılan çamaşır suyunu 1:10 oranında seyreltin). Bunun ardından %70 etanol içeren çözeltiyle yüzeyi silin.

Kontaminasyon

- Kontaminasyonu önlemek için eldiven kullanılmalıdır ve farklı numunelerle ve **cobas®** Cdiff reaktifleriyle işlem yapıldıktan sonra eldiven değiştirilmelidir. Numunelerle ve kontrollerle işlem yaparken kontamine edici eldiven kullanmaktan kaçınin. Numuneleri ve kit reaktiflerini kullanırken laboratuvar eldiveni, laboratuvar önlüğü ve göz koruması kullanın.
- Reaktiflerin mikrobik ve ribonükleaz kontaminasyonundan kaçınin.
- Numunelerin kullanılması sırasında numune bulaşması önlenmezse yanlış pozitif sonuçlar meydana gelebilir.
- Numuneler, *Mikrobiyoloji ve Biyomedikal Laboratuvarlarında Biyo Güvenlik*²⁴ ve CLSI Belgesi M29-A4²⁵'te açıklandığı gibi güvenli laboratuvar prosedürleri kullanılarak bulaşıcı şekilde ele alınmalıdır

Bütünlük

- Kitleri son kullanma tarihi geçmişse kullanmayın.
- Reaktifleri birleştirmeyin.
- Tek kullanımlık ürünleri son kullanma tarihi geçmişse kullanmayın.
- Görünür şekilde zarar görmüş veya sızıntı belirtileri gösteren reaktifleri veya kapları kullanmayın.
- Tek kullanımlık ürünlerin hepsi sadece bir kez kullanılmak içindir. Tekrar kullanmayın.
- Tüm ekipmanların bakımı üreticinin talimatlarına göre doğru bir şekilde gerçekleştirilmelidir.

İmha

- **cobas®** 4800 sistemi reaktifleri ve **cobas®** Cdiff testi spesifik reaktifleri sodyum azit içerir (bkz. “**Uyarılar ve önlemler**”). Sodyum azit, bakır ve kurşun su borularıyla reaksiyona girerek yüksek patlayıcı özelliğe sahip metal azitler oluşturabilir. Laboratuvardaki lavabolarda çözeltileri içeren sodyum azit atılırken, azit birikimini önlemek için bol miktarda soğuk su akıtarak giderleri temizleyin.
- Kullanılmayan reaktifleri ve atıkları ülke genelindeki, federal, eyalet düzeyindeki ve yerel düzenlemelere göre atın.

Not: Sıvı atıkların imhası için cobas® 4800 sistemi – Yardım Asistanı'na bakın.

Dökülme ve temizleme

- LYS-1 reaktifi guanidin tiyosiyanat içerir. Guanidin tiyosiyanat içeren sıvı dökülürse uygun bir laboratuvar deterjanı ve suyla temizleyin. Dökülen sıvı potansiyel olarak bulaşıcı ajanlar içeriyorsa, İLK ÖNCE etkilenen alanı laboratuvar deterjanı ve suyla ve ardından %0,5 sodyum hipoklorit ile temizleyin.
- Uygun **cobas®** 4800 cihazında dökülme meydana gelirse temizlemek için **cobas®** 4800 sistemi – Yardım Asistanı'nda yer alan talimatları izleyin.
- **cobas®** x 480 cihazını veya **cobas®** z 480 analizörünü temizlemek için sodyum hipoklorit çözeltisi (çamaşır suyu) kullanmayın. **cobas®** x 480 cihazını veya **cobas®** z 480 analizörünü, **cobas®** 4800 sistemi – Yardım Asistanı'nda tarif edilen prosedürlere göre temizleyin.

Numune alma, taşıma ve saklama

Not: Tüm numuneleri bulaşıcı madde yayma potansiyeli olduğunu varsayarak kullanın.

Numunelerin toplanması

Şekilsiz dışkı numunesini steril bir kapta toplayın. Numuneler, kurumunuzun standart çalışma prosedürlerinde belgelenen prosedür izlenerek toplanmalıdır.

Numunelerin taşınması, saklanması ve stabilitesi

Şekilsiz dışkı numuneleri **cobas®** 4800 sisteminde test edilmeden önce 2 gün boyunca 2–30°C'de veya 7 gün boyunca 2–8°C'de ve 60 gün boyunca 20°C'de stabildir (bu, numunelerin 2 gün boyunca 30±1°C'de, ardından 5 gün boyunca 2–8°C'de ve ardından 60 gün boyunca 20°C'de ardışık olarak saklandıktan sonra test edilmesiyle gösterilmiştir).

cobas® PCR Media ile karıştırılan dışkı numunesi, **cobas®** 4800 sisteminde test edilmeden önce 60 gün boyunca 2–8°C'de veya 7 gün boyunca 30°C'de stabildir.

C. difficile numunelerinin taşınması, etiyolojik ajanların taşınmasıyla ilgili ülke genelindeki, federal, eyalet düzeyindeki ve yerel düzenlemelere uygun olmalıdır.

Test prosedürü

Testin çalıştırılması

İş akışı

Şekil 1: cobas® Cdiff iş akışı

1	Sistemi başlatın
2	Cihaz bakımını gerçekleştirin
3	Numuneleri ve reaktifleri saklama alanından çıkarın
4	Çalışmayı başlatın: Taşıyıcılara numuneleri yükleyin.
5	LIS varsa: iş istemini onaylayın LIS yoksa: iş istemini oluşturun
6	Sarf malzemelerini (derin kuyucuklu plaka, mikrokuyucuklu plaka, uç rakları) ve reaktifleri yükleyin
7	Numune hazırlama çalışmasını başlatın
8	Mikrokuyucuklu plakayı çıkarın ve kapatın
9	Numuneleri, kullanılan reaktifleri ve derin kuyucuklu plakayı çıkarın
10	Mikrokuyucuklu plakayı analizöre yükleyin
11	Sonuçları gözden geçirin
12	LIS ile: sonuçları LIS'e gönderin
13	Analizörü boşaltın

Kullanım talimatları

Cdiff MMX ve Cofactor-3 dışındaki tüm reaktifler, **cobas®** x 480 cihazına yüklenmeden önce ortam sıcaklığında olmalıdır. Cdiff MMX ve Cofactor-3 reaktifleri, işlemde kullanıldıkları zamana kadar **cobas®** x 480 cihazında ortam sıcaklığına dengelendiklerinden doğrudan 2–8°C sıcaklıktaki depodan alınabilir.

Not: Ayrıntılı çalıştırma yönergeleri için **cobas® 4800 sistemi – Yardım Asistanı'nda** bakın.

Çalışma hacmi

cobas® 4800 sistemi, **cobas®** MRSA/SA, **cobas®** Cdiff ve **cobas®** HSV 1 and 2 testleri arasında karma batch çalışmalarını destekleyecek şekilde tasarlanmıştır. Genel **cobas®** 4800 System Sample Preparation Kit, genel **cobas®** 4800 System Lysis Kit 1 ve genel **cobas®** 4800 System Wash Buffer Kit, her biri çalıştırılacak tüm testler için kontrolleri ve numuneleri içeren 24 veya 96 numuneye kadar 10 çalışma için yeterli iki kit boyutunda mevcuttur. **cobas®** 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit, Cdiff kontrollerini ve çalışılacak olan numuneleri içerecek şekilde 80'e kadar numuneyi test etmek için yeterlidir. Birden fazla **cobas®** 4800 Cdiff Master Mix reaktifi flakonu, aynı kit boyutunda oldukları sürece tek bir çalışmada uygun şekilde kullanılabilir. Genel **cobas®** 4800 System Internal Control Kit 1 ve **cobas®** 4800 Cdiff Controls and Cofactor Kit, tek bir kit boyutunda mevcuttur ve tüm çalışma konfigürasyonlarını destekleyebilir. *C. difficile*

numunelerini içeren her çalışma için bir **cobas® 4800 Cdiff Positive Control** ve bir **cobas® 4800 System Negative Control** kullanılmalıdır (bkz. “**Kalite kontrol**”). Tek bir test çalışması için izin verilen maksimum numune sayısı 94 numune ve 2 kontroldür.

Not: **Reaktifler için optimum kullanım olmamasına rağmen, toplam 1–22 numune içeren bir çalışma için genel bir 96 testlik reaktif kullanılabilir. Ancak cobas® 4800 System Wash Buffer (WB) Kit, cobas® 4800 System Sample Preparation Kit ve cobas® 4800 System Lysis Kit 1'nin farklı boyutları karıştırılamaz. Örneğin çalışmanın başlangıcında 96 testlik WB reaktif şişesi taranırsa, diğer iki kitten 96 test boyutunda reaktifler de kullanılmalıdır.**

İş akışı

cobas® Cdiff testi, cobas® 4800 yazılımı içindeki tam iş akışı kullanılarak gerçekleştirilir. **cobas® x 480** cihazında numunenin hazırlanmasını ve ardından **cobas® z 480** analizöründe amplifikasyonu/saptamayı içerir. Çalışma sadece Cdiff olabilir veya **cobas® MRSA/SA** ve/veya **cobas® HSV 1 and 2** testleri ile karışık olarak yapılabilir. Ayrıntılar için **cobas® 4800** sistemi – Yardım Asistanı'na bakın.

cobas® PCR Media tüpüne numune aktarımı

1. Dışkıyı **cobas® PCR Media** tüpüne aktarmak için **bir** polyester sürüntü çubuğu kullanın; pakette bulunan ikinci sürüntü çubuğunu atın (varsa). Dışkı kabının kenarına dokunmadan, sürüntü çubuğunun ucunu konik bölümün sonuna kadar tamamen dışkı numunesine daldırın, ardından hemen çıkarın ve inoküle edilmiş sürüntü çubuğunu **cobas® PCR Media** tüpüne yerleştirin. Sürüntü çubuğunun ucunu tamamen daldırmak için yeterli dışkı yoksa numuneyi test etmeyin.
2. Tüpün yan tarafına basınç uygulayarak sürüntü çubuğunun şaftını gri çentik işaretinden kırın. Tüpün kapağını kapatın ve en az 5 saniye vorteksleyin. Kapağı açın ve işlemeyen önce tüpleri 24 pozisyonlu numune taşıyıcı raklarına yerleştirin. Kapakları atın.

Not: **cobas® Cdiff testi; cobas® PCR Media Kit, cobas® PCR Media Uni Swab Sample Kit ve cobas® PCR Media Dual Swab Sample Kit ile birlikte kullanım için doğrulanmıştır. Başka cihazlar veya ortam türleri kullanmayın.**

Not: **Dışkıyı aktarmak için yalnızca bir polyester sürüntü çubuğu kullanın. cobas® PCR Media tüpüne aktarılan fazla dışkı, pıhtılara ve/veya geçersiz sonuçlara neden olabilir.**

Not: **Dışkı numuneleri, cobas® x 480 cihazında işlenmek üzere uygun barkodla etiketlenmiş cobas® PCR Media tüplerine aktarılmalıdır. Uygun barkodlama prosedürleri ve cobas® 4800 sistemi için kabul edilebilir barkodların listesi için cobas® 4800 sistemi – Yardım Asistanı'na başvurun.**

Not: **cobas® PCR Media'daki dışkı numunesi süspansiyonlarının çapraz kontaminasyonunu önlemek için işlemeyen sonra numuneleri yeniden kapatmak için alternatif renkte (renksiz; bkz. “İsteğe bağlı materyaller”) ek cobas® PCR Media kabı kapakları kullanılmalıdır.**

cobas® PCR Media, dışkı süspansiyonunun cobas® 4800 sisteminde birden fazla kere test edilmesi için yeterli hacim içerir. cobas® PCR Media tüpünde, cobas® Cdiff çalışmasını yürütmek için minimum dışkı süspansiyonu hacmi 3 mL'dir.

cobas® Cdiff testinin gerçekleştirilmesi

Not: cobas® MRSA/SA ve cobas® Cdiff ve/veya cobas® HSV 1 and 2 testleri arasında karma batch çalışmaları yürütülebilir. Daha fazla bilgi için cobas® 4800 sistemi – Yardım Asistanı'na bakın.

1. **cobas®** 4800 sistemi – Yardım Asistanı'ndaki talimatları takip ederek sistemi başlatma ve bakım prosedürlerini gerçekleştirin.
2. Gereken tüm reaktifleri ve sarf malzemelerini toplayın. **cobas®** Cdiff MMX ve Cofactor-3 reaktifleri hariç olmak üzere, reaktifler çalışma başlatıldığında oda sıcaklığında olmalıdır.

Not: Tüm reaktifler ve reaktif hazneleri barkodludur ve tek kullanımlık olarak tasarlanmışlardır. **cobas® 4800 yazılımı, reaktiflerin ve reaktif haznelerinin kullanımını izler ve önceden kullanılmış reaktifleri veya reaktif haznelerini reddeder.**

3. Yeni bir çalışma başlatın ve çalışma için iş istemini tanımlayın. Bir iş istemi oluşturmak için üç yol vardır:
 - Numune rakı **cobas®** x 480 cihazına yüklenmeden önce numune düzenleyiciyi kullanarak (ana menünün sağındaki “Editor” (Düzenleyici) düğmesi). İş istemleri kaydedilebilir, düzenlenebilir ve gerekirse tekrar yüklenebilir.
 - Yeni çalışma için yazılım sihirbazını izleyerek ve istendiğinde numuneleri **cobas®** x 480 cihazına yükleyerek. Numune barkodları otomatik olarak taranır ve her numune için istenen sonuçlar tanımlanmalıdır.
 - Kurumunuzun LIS sistemini kullanarak.

Ayrıntılar için **cobas®** 4800 sistemi – Yardım Asistanı'na bakın. İstenen sonuçları seçerken “Cdiff” ögesini işaretleyin.

4. Numuneleri yükleyin ve uygun olan şekilde iş isteğini tanımlayın/seçin veya LIS'i kullanın. “Derin kuyucuklu plakayı aktardıktan sonra numune taşıyıcılarını boşalt” seçeneği varsayılan olarak seçilidir. Bu, kullanıcının kalan dışkı süspansiyonu numunelerini, **cobas®** x 480 cihazı ile işlenmek üzere alikotlandıktan sonra mümkün olan en kısa sürede almasını sağlar. Saklama gerekiyorsa dışkı süspansiyonu kapları yeni bir kapakla tekrar kapatılmalıdır (bkz. “İsteğe bağlı materyaller”).
5. Yazılım sihirbazı rehberini takip edin ve sarf malzemelerini yükleyin. Yazılım, kalan uç sayısını takip ettiğinden, uçları kısmen kullanılmış bir uç rakına tek tek uç yüklemeyin veya çıkarmayın. Yapılacak çalışma için yeterli uç yoksa yazılım kullanıcıyı uyarır.
6. Numune hazırlama reaktiflerini barkodlu reaktif haznelere yükleyin. Reaktif hazneleri iki boyutta mevcuttur: 200 mL ve 50 mL. Doğru reaktif haznesi boyutunu seçmek için yazılım sihirbazı kılavuzunu izleyin. Reaktif haznesi barkodları, taşıyıcının sağ tarafına bakmalıdır. Numune hazırlama reaktiflerini yüklemek için “tara-tara-dök-yerleştir” yöntemini kullanın:
 - Reaktif şişesinin barkodunu tarayın
 - Reaktif haznesinin barkodunu tarayın
 - Reaktif hazneye dökün
 - Dolu reaktif haznesini reaktif taşıyıcı üzerinde belirtilen konuma yerleştirin

Not: cobas® 4800 sistemi, reaktiflerin cihaz üzerinde olduğu süreyi izlemek için dahili bir saate sahiptir. WB tarandığında yükleme işleminin tamamlanması için 1 saat bekleyin ve “Start” (Başlat) düğmesine tıklayın. “Workplace” (İşyeri) sekmesinde bir geri sayım saati görüntülenir. Cihaz üzerinde kalma süresi sayacı dolmuşsa sistem, çalışmanın başlamasına izin vermez.

Not: MGP'nin doğru transferini sağlamak için, reaktif haznesine dağıtmadan hemen önce MGP flakonunu vorteksleyin veya kuvvetlice çalkalayın.

7. Amplifikasyon/saptama reaktiflerini (Cdiff MMX ve Cofaktor-3), Proteinaz K (PK) ve kontrolleri [Cdiff (+) C, IC ve (-) C] doğrudan reaktif taşıyıcıya yükleyin. Kontaminasyonu önlemek için pozitif kontrolleri kullandıktan sonra eldivenleri değiştirin.

Not: Yazılım sihirbazı, kullanılacak en uygun cobas® Cdiff MMX reaktif sayısını ve boyutunu hesaplayacaktır. Bu, MMX ve Kofaktör yükleme ekranındaki “Kit size” (Kit boyutu) sütununa yansıtılacaktır. Farklı boyutta bir cobas® Cdiff MMX reaktifi kullanmak için “Change kit size” (Kit boyutunu değiştir) düğmesine tıklayın.

8. “Start Run” (Çalışmayı başlat) öğesine tıklayarak numunenin hazırlanmasını başlatın.

9. Başarılı olan numunenin hazırlanması çalışmasından sonra, “Sample Preparation results” (Numune hazırlama sonuçları) düğmesi ve “Unload” (Boşalt) düğmesi kullanılabilir hale gelir. İsterseniz sonuçları gözden geçirmek için “Sample Preparation results” düğmesine basın, ardından plaka taşıyıcılarını boşaltmak için “Unload” öğesini seçin. Alternatif olarak sonuçları gözden geçirmeden plaka taşıyıcısını boşaltmak için “Unload” öğesini seçin. Bkz. cobas® 4800 sistemi – Yardım Asistanı.

10. Mikrokuyucuk plağını kapatmak, plakayı cobas® z 480 analizörüne aktarmak ve amplifikasyon ve saptama çalışmasını başlatmak için cobas® 4800 sistemi – Yardım Asistanı'ndaki talimatları takip edin.

Not: cobas® 4800 sistemi, hazırlanan numunelerin aktive edilen Master Mix eklenmesinden sonraki süreyi izlemek için dahili bir saate sahiptir. Amplifikasyon ve saptama, mümkün olan en kısa sürede, cobas® x 480 cihazının çalışması bittikten en geç 90 dakika sonra başlatılmalıdır. “Workplace” (İşyeri) sekmesinde bir geri sayım saati görüntülenir. Sayacın süresi dolmuşsa sistem çalışmayı iptal eder.

11. Amplifikasyon ve saptama çalışması tamamlandığında mikrokuyucuk plakasını cobas® z 480 analizöründen çıkarın.

12. Sonuçları gözden geçirmek ve kabul etmek için cobas® 4800 sistemi – Yardım Asistanı'ndaki talimatları takip edin.

Sonuçlar

Kalite kontrol ve sonuçların geçerliliği

Her bir çalışmaya bir set **cobas®** Cdiff testi pozitif hem de negatif kontrol eklenir. Herhangi bir çalışma için, o çalışmadan raporlanabilir **cobas®** Cdiff testi sonuçlarını görüntülemek üzere **cobas®** 4800 yazılımı için hem pozitif hem de negatif kontrol için geçerli sonuçlar elde edilmelidir.

Pozitif kontrol

Cdiff (+) kontrol, *C. difficile*'nin bulaşıcı olmayan DNA plazmidlerini içerir. Cdiff (+) kontrol, testin verilen çalışmasındaki nükleik asit ekstraksiyonu, amplifikasyonu ve tespiti adımlarını görüntüler. Cdiff (+) kontrol sonucu “Geçerli” olmalıdır. Cdiff (+) kontrol sonuçları tutarlı bir şekilde geçersiz ise, teknik destek için yerel Roche ofisinizle iletişime geçin.

Negatif kontrol

(-) kontrol sonucu “Geçerli” olmalıdır. (-) kontrol sonuçları tutarlı bir geçersizlik gösteriyorsa, teknik destek için yerel Roche ofisinizle iletişime geçin.

Dahili kontrol

Dahili kontrol, dahili kontrole özgü primerler ve prob için randomize sekanslar ve hedefler içeren bir rekombinant bakteriyofaj lambdadır. Dahili kontrol, **cobas®** x 480 cihazında numune hazırlama sırasında tüm numunelere ve pozitif ve negatif kontrol'lere eklenir. Dahili kontrol, spesifik bir numune için nükleik asit ekstraksiyonu, amplifikasyonu ve saptama adımlarını izler. Dahili kontrol, çalışma kontrollerinin doğrulanması için de gereklidir.

Sonuçların yorumlanması

Not: Tüm test ve çalışma validasyonu cobas® 4800 yazılımıyla ile belirlenir.

Not: Geçerli bir çalışması hem geçerli hem de geçersiz numune sonuçlarını içerebilir.

Geçerli bir çalışma için, numune sonuçları Tablo 1'da gösterildiği gibi yorumlanır.

Tablo 1: cobas® Cdiff testi sonuçlarının yorumlanması

cobas® Cdiff testi	Sonuç raporu ve yorumlama
POS Cdiff	Cdiff pozitif <i>C. difficile</i> DNA varlığı için numune pozitifdir.
NEG Cdiff	Cdiff negatif* Varsa <i>C. difficile</i> DNA saptanamamıştır.
Invalid	Geçersiz Sonuç geçersizdir. Orijinal numune, geçerli sonuç elde etmek üzere tekrar test edilmelidir. Geçersiz sonuç veren dışkı süspansiyonunu içeren tüpün üzerine yeni bir kapak yerleştirin ve en az 5 saniye vorteksleyin. Ortam içeren yeni bir cobas® PCR Media tüpüne 0,5 mL vortekslenmiş dışkı süspansiyonu ekleyin. Seyreltilmiş tüpün kapağını kapatın ve en az 5 saniye vorteksleyin. Kapağı açın ve işleme için seyreltilmiş tüpü 24 pozisyonlu numune taşıyıcıya yerleştirin.
Failed	Numune sonucu yok Çalışma işaretleri ve önerilen işlemlerin gözden geçirilmesine ilişkin talimatlar için cobas® 4800 sistemi – Yardım Asistanı'na başvurun. Pipetleme hatasının (ör. pıhtı veya diğer engeller) meydana geldiği nadir durumlarda, orijinal dışkı numunesi süspansiyon tüpü yeni bir kapakla kapatılmalı ve bir santrifüje yerleştirilmelidir. 1800 RCF'ye (veya 1800 × g) hızlandırın, ardından durdurun. Santrifüjden sonra flakonun çalkalanmadığından veya karıştırılmadığından emin olun. Kapağı açın ve işleme için tüpü 24 pozisyonlu numune taşıyıcıya yerleştirin.

* Negatif bir sonuç, sonuçların yeterli numune alımına, inhibitörlerin yokluğuna ve saptanacak yeterli DNA'ya bağlı olmasından ötürü *C. difficile* DNA'sının varlığını olanak dışı bırakmaz.

Numune, aşırı dışkı veya nükleik asit hedef ekstraksiyonunu ve/veya amplifikasyonunu ve saptamayı önleyen inhibe edici maddeler içeriyorsa geçersiz sonuçlar elde edilebilir. Bilinen interferans oluşturan maddeler için bkz. **"Prosedür ile ilgili sınırlamalar"**.

Not: **cobas®** Cdiff testi için gerekli olan minimum dışkı süspansiyonu hacmi 3 mL'dir.

Sonuç işaretlerinin listesi

Aşağıdaki tablo, sonuç yorumlaması ile ilgili işaretleri listeler.

Tablo 2: cobas® Cdiff testi için işaretlerin listesi

cobas® Cdiff testi	cobas® Cdiff testi	Sonuç raporu ve yorumlama
R20	Pozitif kontrol geçersizdir.	Harici kontrol geçersiz. 1. Tüm çalışmayı yeni reaktiflerle tekrarlayın. 2. Sorun devam ederse Roche Servisi ile iletişime geçin.
R21	Negatif kontrol geçersizdir.	Harici kontrol geçersiz. 1. Tüm çalışmayı yeni reaktiflerle tekrarlayın. 2. Sorun devam ederse Roche Servisi ile iletişime geçin.
X3	Hata: Pıhtı saptandı numune işlenmedi.	Numunelerin iş akışının tanımına göre kullanıldığından emin olun. 1. Numuneyi pıhtılar için kontrol edin. 2. Numuneyi tekrar çalışın.
X4	Hata: Pipetleme hatası meydana geldi. Numune işlenmedi.	Yetersiz numune hacmi veya pipetleme sırasındaki mekanik hata, en muhtemel nedendir. 1. Yeterli numune hacmi olduğundan emin olun. 2. Uç çıkarma plakasının doğru yerleştirildiğini kontrol edin. 3. Numuneyi tekrar çalışın.

Prosedür ile ilgili sınırlamalar

- cobas®** Cdiff testi yalnızca bu Kullanım Talimatları belgesine göre **cobas®** PCR Media'ya aktarılan şekilsiz dışkı numuneleriyle kullanım için doğrulanmıştır.
- Alınan sonuçların güvenilir olması yeterli numune toplama, taşıma, depolama ve işleme koşullarına bağlıdır. Bu Kullanım Talimatları belgesindeki (kullanma talimatı olarak da ifade edilir) ve **cobas®** 4800 sistemi – Yardım Asistanı'ndaki prosedürleri izleyin.
- C. difficile* DNA'sının saptanması, numunede bulunan organizmaların sayısına bağlıdır ve numune alma/işleme yöntemlerinden, hastaneye yatış öyküsünden, antibiyotik tedavi rejiminden ve *C. difficile* suşlarından etkilenebilir.
- Çeşitli maddelerden kaynaklanan interferans nedeniyle yanlış negatif veya geçersiz sonuçlar alınabilir. Nükleik asit izolasyonu ve PCR amplifikasyonuna engel olabilecek maddeler içeren numuneleri tanımlamaya yardımcı olması için **cobas®** Cdiff testi içine dahili kontrol eklenir. Bilinen interferans, aşağıdakileri içerir ancak bunlarla sınırlı olmayabilir:
 - %25'den fazla (a/h) müsin içeren numuneler yanlış negatif sonuçlar oluşturabilir.
- Pozitif bir sonuç, *C. difficile* DNA'sının varlığının göstergesidir ve canlı organizmalar olduğu anlamına gelmez. Bu nedenle, pozitif bir sonuç eradikasyon tedavisinin başarısızlığı anlamına gelmeyebilir.
- Primer veya prob bağlanma bölgelerindeki mutasyonlar veya polimorfizmler, yeni veya bilinmeyen varyantların saptanmasını etkileyerek **cobas®** Cdiff testi ile yanlış negatif sonuç verebilir.
- Bir testin tahmin değeri, herhangi bir belirli popülasyonda hastalığın prevalansına bağlıdır.

8. AmpErase enziminin **cobas**® 4800 Cdiff Master Mix'e eklenmesi, hedef DNA'nın selektif amplifikasyonunu sağlar; ancak iyi laboratuvar uygulamaları ve bu Kullanım Talimatları belgesinde belirtilen prosedürlere tam uyum, reaktiflerde ve amplifikasyon karışımlarında kontaminasyonu önlemek için gereklidir.
9. Bu ürünü sadece PCR tekniklerinde ve **cobas**® 4800 sisteminin kullanımında eğitimli olan personel kullanmalıdır.
10. Yalnızca **cobas**® x 480 cihazı ve **cobas**® z 480 analizörünün bu ürünle birlikte kullanılması onaylanmıştır. Bu ürünle birlikte başka hiçbir numune hazırlama cihazı veya PCR sistemi kullanılamaz.
11. Teknolojiler arasındaki doğal farklılıklardan ötürü, bir teknolojiden başka birine geçmeden önce kullanıcıların, teknoloji farklılıklarını tanımlamak için kendi laboratuvarlarında yöntem korelasyon çalışmaları yapmaları ve yeni prosedürü doğrulamaları önerilir. Teknolojiler arasındaki daha önce bahsedilen farklılıklardan dolayı sonuçlar arasında yüzde yüzlük uyum beklenmemelidir.
12. Çapraz kontaminasyon, yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. **cobas**® 4800 sistemi numune işleme, nükleik asit ekstraksiyonu, amplifikasyon ve saptama sırasında çapraz kontaminasyon riskini en aza indirmek için tasarlanmış otomatik, gerçek zamanlı bir PCR cihazıdır. Sistemin sağlamlığını test etmek için sistemin teorik çapraz kontaminasyon oranını değerlendirmek üzere, yüksek pozitif ve negatif yapay numunelerden oluşan bir panel üzerinde simüle edilmiş, klinik olmayan bir dama tahtası çalışması gerçekleştirilmiştir. Yüksek pozitif numuneler, kullanım amacına uygun popülasyonundaki enfekte olan hastaların %95'inde gözlenenden daha erken Ct değerlerine sahiptir. Bu dama tahtası çalışmasındaki çapraz kontaminasyon oranı %0,24 (1/423) olarak tespit edilmiştir. Klinik ortamlardaki çapraz kontaminasyon oranları, yüksek pozitif numunelerin oranına ve hastalığın prevalansına bağlıdır. Rutin klinik çapraz kontaminasyon oranlarının bu çalışmada gözlemlenenden önemli ölçüde daha düşük olması beklenmektedir ve kullanıcı ortamlarında değerlendirilmesi gerekmektedir.

Klinik olmayan performans değerlendirmesi

Analitik hassasiyet

cobas® Cdiff testi için analitik hassasiyet (saptama limiti veya LoD), **cobas®** PCR Media'da negatif dışkı temelini süspansiyonunda çoklu konsantrasyon seviyelerine seyreltilmiş kantifiye *C. difficile* kültürleri analiz edilerek saptanmıştır. Tüm seviyeler, **cobas®** Cdiff testinin üç ayrı **cobas®** Cdiff testi reaktif lotu kullanılarak test edilmiştir. Her seviyede reaktif lotu başına en az 21 kopya test edilmiştir. Bu test için LoD, en kötü performans gösteren reaktif lotu ile elde edilen sonuçlara dayanılarak, test edilen kopyaların $\geq$ %95'inde pozitif olarak saptanabilen hedef konsantrasyon olarak tanımlanır.

Analitik hassasiyet çalışmasında test edilen yedi *C. difficile* suşu, Tablo 3 içinde gösterilmiştir.

Tablo 3: **cobas®** Cdiff testi LoD (saptama limiti)

Suş ID	Toksinotip	REA* tipi	PFG† tipi	Ribotip	Fenotip	LoD (CFU/sürüntü)	
						Pozitiflik oranına göre	Probit analizine göre
ATCC 43255 (VPI 10463)	0	Yok	Yok	087	A+B+CDT-	113	90
ATCC BAA-1382 (630)	0	R 23	Yok	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	Yok	Yok	078	Yok	54	45
ATCC 43598 (1470)	VIII	Yok	Yok	017	A-B+	225	130
F15	XII	Yok	Yok	Yok	Yok	54	59

* Kısıtlama endonükleaz analizi; † Puls Alan Jeli.

C. difficile genotiplerinin saptanması

Ek toksinotipleri temsil eden 28 toksijenik suş üzerinde **cobas®** Cdiff testinin saptama limiti (LoD), birden fazla seviyede, seviye başına 40 kopyanın test edilmesiyle doğrulanmıştır. Dilüsyonlar ve test numuneleri, yukarıda açıklanan saptama limiti çalışmasına benzer şekilde hazırlanmıştır. En az %95 gözlenen eşleşme oranına sahip en düşük seviyeler Tablo 4 içinde özetlenmiştir.

28 toksijenik suşun tamamı (Tablo 4) test edilen kopyaların $\geq$ %95'inde 77,9 CFU/sürüntü ile 460 CFU/sürüntü arasında değişen konsantrasyonlarda pozitif olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4: Toksikjenik *C. difficile* doğrulama sonuçlarının özeti

Suş	Toksinotip	Ribotip	Kons. (CFU/sürüntü)	Pozitiflik oranı
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	Yok	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	Yok	460	%97,5
K095	XVIII	014	234	%95,0
TR13	XIX	Yok	234	%97,5
TR14	XX	Yok	77,9	%100,0
CH6223	XXI	Yok	234	%100,0
CD07-468	XXII	Yok	234	%100,0
8785	XXIII	Yok	234	%95,0
597B	XXIV	131	234	%97,5
7325	XXV	027	234	%100,0
7459	XXVI	Yok	234	%95,0
KK2443-2006	XXVII	Yok	234	%100,0
CD08-070	XXVIII	126	234	%97,5
CD07-140	XXIX	056	234	%97,5
ES 130	XXX	Yok	234	%100,0
WA 151	XXXI	Yok	460	%100,0

Kesinlik

cobas® PCR Media'da negatif dışkı süspansiyonuna seyreltilmiş *C. difficile* kültürlerinden oluşan bir panel kullanılarak, **cobas®** Cdiff testinin saptama limitinin (LoD) altında, LoD yakınında ve LoD üzerindeki konsantrasyon seviyelerine kadar kurum içi bir kesinlik çalışması yapılmıştır. **cobas®** PCR Media'da yalnızca negatif dışkı süspansiyonundan oluşan bir negatif seviye de test edilmiştir. Çalışmada, 12 gün boyunca toplam 36 çalışma için üç benzersiz **cobas®** Cdiff testi reaktif lotu ve üç cihaz kullanılmıştır. Kesinlik panellerinin tanımı ve çalışma özeti Tablo 5 içinde gösterilmiştir. Varyans bileşenlerinin analizi (Tablo 6) hedef Ct değerlerinin çoğu değişkenliğinin, LoD veya civarındaki konsantrasyon seviyesi için çalışma içi (rastgele) ve lotlar arası faktörlere (sırasıyla %60,0 ve %25,3) atfedilebileceğini düşündürmüştür. LoD'nin üzerindeki konsantrasyon seviyesi için Ct değerinin değişkenliğinin çoğu çalışma içi (rastgele) ve cihazlar arası faktörlere (sırasıyla %72,5 ve %24,7) atfedilmiştir. Sonuçlar (Tablo 7), hedef Ct değerlerinin LoD'deki konsantrasyon seviyesi için %1,5 ve LoD üzerindeki konsantrasyon seviyesi için %1,1'lük genel CV (%) oranına sahip olduğunu göstermiştir.

Tablo 5: Dahili kesinlik çalışması pozitiflik oranı analizi

Panel üyesi	Test edilen N	N pozitif	Pozitiflik oranı	%95 GA	
				Alt	Üst
Negatif	72	0	%0,0	%0,0	%5,0
< 1 × LoD	72	21	%29,2	%19,0	%41,1
~ 1 × LoD	72	72	%100,0	%95,0	%100,0
~ 3 × LoD	72	72	%100,0	%95,0	%100,0

LoD = saptama limiti

Tablo 6: Kesinlik paneli üyeleri için varyans bileşenleri analizi

Seviye	Ortalama	Varyans bileşenleri/Toplama katkı yüzdesi					Toplam
		Lot	Cihaz	Kit boyutu	Gün	Rastgele	
~ 1 × 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 × 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 = saptama limiti

Tablo 7: Kesinlik paneli üyeleri için standart sapmalar ve varyasyon katsayıları (%) analizi

Seviye	Ortalama	SD bileşenleri/ CV (%)					Toplam
		Lot	Cihaz	Kit boyutu	Gün	Rastgele	
~ 1 × 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 × 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 = saptama limiti

Analitik özgüllük

cobas® Cdiff testinin analitik özgüllüğünü değerlendirmek için aşağıdaki organizma panelleri test edilmiştir: 1) Dışkı numunelerinde bulunabilecek 103 bakteri, mantar ve virüs ile ve insan hücresi (Tablo 8); 2) toksijenik olmayan *C. difficile* dahil 28 *Clostridiaceae* cinsi organizma (* test için Sitomegalovirüs (HHV5), $2,0 \times 10^3$ PFU/mL'de, İnsan Adenovirüs Tip 40, $2,2 \times 10^3$ PFU/mL'de ve İnsan Rotavirüs $9,8 \times 10^3$ PFU/mL'de eklenmiştir; Tablo 9).

Stok konsantrasyon sınırlamaları nedeniyle daha düşük konsantrasyonlarda eklenmiş olan Sitomegalovirüs (HHV5), İnsan Adenovirüs Tip 40 ve İnsan Rotavirüs hariç tüm bakteriler ve insan hücreleri 1×10^6 birim*/mL'de ve tüm virüsler 1×10^5 birim*/mL'de eklenmiştir. Test, tek başına organizmalarla veya **cobas®** Cdiff testinin $3 \times$ saptama limiti (LoD) düzeyinde ayrı ayrı bulunan iki *C. difficile* izolatu ile yapılmıştır. Sonuçlar, bu organizmaların hiçbirinin amaçlanan Cdiff hedeflerinin saptanması için interferans oluşturmadığını göstermiştir. Amaçlanan bir *C. difficile* hedefi olmadığında hiçbir yanlış pozitif sonuç alınmamıştır.

Clostridium botulinum'un analitik özgüllüğü, PCR amplikon oluşturma adımını taklit etmek için GenBank nükleotit sekansı veritabanına karşı BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır.

* Aşağıdaki mikroorganizmalar hariç bakteriler, koloni oluşturabilen birimler (CFU)/mL; insan hücresi, hücre/mL ve virüsler, plak oluşturan birimler (PFU)/mL olarak kantifiye edilmiştir. *Chlamydia trachomatis*, elementer cisimcik (EB)/mL olarak kantifiye edilmiştir. Sitomegalovirüs, İnsan Ekovirüs ve İnsan Enterovirüs IU/mL olarak kantifiye edilmiştir.

Tablo 8: Mikroorganizmalar ve insan hücreleri

<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> alt türü <i>faecalis</i>	<i>Anaerococcus tetradius</i>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13472	<i>Bacteroides caccae</i>
<i>Bacteroides merdae</i>	<i>Bacteroides stercoris</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Campylobacter coli</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida catenulata</i>	<i>Cedecea davisae</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> L2 serotipi	<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>	HCT-15 insan hücreleri	<i>Helicobacter fennelliae</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> alt türü <i>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</i> alt türü <i>choleraesuis</i>	<i>Salmonella enterica</i> alt türü <i>arizonae</i> (eski adıyla <i>Salmonella choleraesuis</i> alt türü <i>arizonae</i>)
<i>Salmonella enterica</i> alt türü <i>enterica</i> <i>Choleraesuis</i> serotipi	<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>	Sitomegalovirüs (HHV5)*	İnsan adenovirüs tip 40*
İnsan koksakivirüsü A10	İnsan enterovirüs 11	İnsan enterovirüs 71
İnsan rotavirüsü*	Norovirüs GII	-

* Test için Sitomegalovirüs (HHV5) $2,0 \times 10^3$ PFU/mL'de, İnsan Adenovirüs Tip 40 $2,2 \times 10^3$ PFU/mL'de ve İnsan Rotavirüs $9,8 \times 10^3$ PFU/mL'de eklenmiştir.

Tablo 9: Toksik olmayan *C. difficile* dahil *Clostridium* cinsi organizmalar

<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> serogrup B (toksik olmayan)	<i>Clostridioides difficile</i> serogrup I (toksik olmayan)	<i>Clostridium fallax</i>
<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Clostridium innocuum</i>
<i>Clostridium methylpentosum</i>	<i>Clostridium nexile</i>	<i>Clostridium novyi</i>
<i>Clostridium orbiscindens</i> (<i>Flavonifractor plautii</i> olarak yeniden adlandırılmıştır)	<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>	-	-

* BLAST programına dayanır.

İnterferans

Yaygın olarak kullanılan yirmi altı ilacın yanı sıra fekal yağ, tam kan ve müsin **cobas**® Cdiff testi ile potansiyel interferans etkileri açısından test edilmiştir. Tüm maddeler, makul olarak bir dışkı numunesinde bir sürüntü çubuğu ile toplanması beklenebilecek seviyelerde test edilmiştir. İnterferans oluşturan maddenin miktarı, primer dışkı numunesindeki konsantrasyon olarak ifade edilmiştir. İki *C. difficile* izolatu, **cobas**® Cdiff testinin 3 × saptama limiti (LoD) düzeyinde eklenmiştir ve testlerde hedef olarak kullanılmıştır. Ekzojen maddeler için interferans gözlenmemiştir. Fekal yağ için %28'a kadar interferans gözlenmemiştir, tam kan için %50'e kadar interferans gözlenmemiştir ve müsin için %25'ye kadar interferans gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, Tablo 10 içinde özetlenmiştir.

Tablo 10: İnterferans oluşturan maddelerin test sonuçları

Madde	Konsantrasyon	Sonuçlar
Fekal yağ	%4–28 (a/h)	İnterferans yok
Tam kan	%25, %50 (h/h)	İnterferans yok
Müsin	%25, %50 (a/h)	%25'e (a/h) kadar interferans yok
Tums	%10 (a/h)	İnterferans yok
Vankomisin	%1 (a/h)	İnterferans yok
Metronidazol	%10 (a/h)	İnterferans yok
Imodium AD®	%10 (a/h)	İnterferans yok
Dışkı Yumuşatıcı	%10 (a/h)	İnterferans yok
Pepto-Bismol® (Procter & Gamble)	%10 (h/h)	İnterferans yok
Nistatin Merhem USP	%10 (a/h)	İnterferans yok
Bio-Dyne® Krem (Wyeth) ile Preparation H®	%10 (a/h)	İnterferans yok
GYNOL II	%10 (a/h)	İnterferans yok
Vagisil® Kaşıntı Giderici Krem	%10 (a/h)	İnterferans yok
Anusol® Plus	%10 (a/h)	İnterferans yok
Güneş Kremi	%1 (a/h)	İnterferans yok
Monistat® 7	%10 (a/h)	İnterferans yok
Vaseline™	%10 (a/h)	İnterferans yok
SAB-Dimenhydrinate® Supozituar (SABEX®)	%10 (a/h)	İnterferans yok
Mineral Yağ	%10 (h/h)	İnterferans yok
Equate Natural Bitkisel Laksatif	%10 (a/h)	İnterferans yok
Dulcolax®	%10 (a/h)	İnterferans yok
Fleet® (CB Fleet Company)	%10 (a/h)	İnterferans yok
K-Y Jelly/Gelée® (McNeil-PPC)	%1 (a/h)	İnterferans yok
Afrin Original Burun Spreyi	%10 (h/h)	İnterferans yok
Karaağaç	1 mendil/sürüntü'den sıvı	İnterferans yok
E-Z-HD™ Süspansiyonluk Yüksek Yoğunluklu Baryum Sülfat (E-Z-EM Canada)	%20 (a/h)	İnterferans yok
Palmitik asit	%10 (a/h)	İnterferans yok
Stearik asit	%10 (a/h)	İnterferans yok
Aleve	%10 (a/h)	İnterferans yok

Klinik numuneler kullanılarak klinik performans

cobas® Cdiff testinin performansı, referans yöntem olarak doğrudan kültürden elde edilen *C. difficile* izolatları üzerinde doku kültürü sitotoksinite testi kullanılarak, FDA onaylı ve CE işaretli Son Teknoloji karşılaştırma yöntemi NAT ile karşılaştırılmıştır. Üç hastane/tıp merkezinde toplanan dışkı numuneleri **cobas®** Cdiff testi ve karşılaştırma amaçlı NAT ile test edilmiş ve doku kültürü sitotoksinite testi için bir referans laboratuvara gönderilmiştir.

cobas® Cdiff testi ve son teknoloji karşılaştırma yöntemi NAT testi, üreticinin yönergelerine göre gerçekleştirilmiştir. Doku kültürü sitotoksinite testi, doğrudan kültür prosedürü kullanılarak yapılmıştır. Her dışkı numunesi, önceden indirgenmiş sikloserin-sefoksitin-fruktoz agara (CCFA-HT) inoküle edilmiştir. Şüpheli koloniler, gram boyama, aerointolerans ve Pro-Disk testi ile *C. difficile* olarak tanımlanmış ve anaerobik kıyılmış et sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Anaerobik kıyılmış et sıvı besiyeriden elde edilen üst fazlar daha sonra doku kültürü sitotoksinite testi (*C. DIFFICILE* TOX-B testi, Techlab) kullanılarak *C. difficile* toksin B'nin saptanması için işlenmiştir.

Beş merkezden toplamda 1434 hasta kayıt olmuştur. Yüz elli altı hasta eksik sonuçlar nedeniyle hariç tutulmuştur. Doğrudan kültür yoluyla 152 pozitif *C. difficile* numunesi olmuştur (prevalans: %11,9). Doğrudan kültüre karşı **cobas®** Cdiff testinin ve karşılaştırmacı NAT performansı Tablo 11 ve Tablo 12 içinde gösterilir.

Tablo 11: Doğrudan kültüre karşı **cobas®** Cdiff testi

		Doğrudan kültür		
		Pozitif	Negatif	Toplam
cobas® Cdiff testi	Pozitif	147	30	177
	Negatif	5	1096	1101
	Toplam	152	1126	1278

Hassasiyet ve özgüllük

cobas® Cdiff testinin doğrudan kültüre hassasiyeti ve özgüllüğü sırasıyla %96,7 (%95 iki taraflı güven aralığı: %92,5–98,6) ve %97,3'tür (%95 iki taraflı güven aralığı: %96,2–98,1).

Pozitif ve negatif tahmin değeri

Çalışma numuneleri için **cobas®** Cdiff testinin gözlenen pozitif ve negatif tahmin değerleri sırasıyla %83,1 (%95 iki taraflı güven aralığı: %76,7–88,3) ve %99,5'tir (%95 iki taraflı güven aralığı: %98,9–99,9).

Tablo 12: Doğrudan kültüre karşı nükleik asit testi (NAT) karşılaştırma yöntemi

		Doğrudan kültür		
		Pozitif	Negatif	Toplam
NAT karşılaştırma yöntemi	Pozitif	147	29	176
	Negatif	5	1097	1102
	Toplam	152	1126	1278

Hassasiyet ve özgüllük

NAT karşılaştırma yönteminin doğrudan kültüre hassasiyeti ve özgüllüğü sırasıyla %96,7 (%95 iki taraflı güven aralığı: %92,5–98,6) ve %97,4'tür (%95 iki taraflı güven aralığı: %96,3–98,2).

NAT karşılaştırma yöntemiyle korelasyon

Bir FDA onaylı ve CE işaretli Son Teknoloji NAT karşılaştırma yöntemi ile doğrudan karşılaştırmada **cobas®** Cdiff testinin performansı Tablo 13 içinde gösterilir.

Tablo 13: Karşılaştırma yöntemi nükleik asit testine (NAT) karşı **cobas®** Cdiff testi

		Karşılaştırmacı NAT		
		Pozitif	Negatif	Toplam
cobas® Cdiff testi	Pozitif	167	10	177
	Negatif	9	1092	1101
	Toplam	176	1102	1278

Pozitif ve negatif uyum yüzdesi

cobas® Cdiff testinin NAT karşılaştırma yöntemine pozitif ve negatif uyum yüzdesi sırasıyla %94,9 (%95 iki taraflı güven aralığı: %90,6–97,3) ve %99,1'dir (%95 iki taraflı güven aralığı: %98,3–99,5).

Ek bilgiler

Temel test özellikleri

Numune tipi	Şekilsiz dışkı numuneleri
Gereken numune miktarı	Primer flakonda 4,3 mL cobas® PCR Media, cobas® Cdiff testi için minimum 3 mL gereklidir.
Test süresi	Sonuçlar, numunenin sisteme yüklenmesinden sonra yaklaşık 2,5 saat içinde hazır olacaktır. (1–22 numune)
Analitik hassasiyet	İzolata bağlı olarak 54 ila 460 CFU/sürüntü.
Özgüllük	125 yakından ilişkili organizma veya dışkı numunelerinde tipik olarak bulunan organizmalar ile çapraz reaktivite yok.
Kapsama	BI/NAP1/027 hipervirülan epidemik suş dahil bilinen tüm <i>C. difficile</i> (toksinotipler 0 ila XXXI, Toksik olmayan toksinotipler XI hariç).

Semboller

Aşağıdaki semboller Roche PCR diagnostik ürünlerinin etiketlenmesinde kullanılır.

Tablo 14: Roche PCR diagnostik ürünlerinin etiketlenmesinde kullanılan semboller

Age/DOB Yaş veya doğum tarihi	 Hasta yanında test için uygun olmayan cihaz	QS IU/PCR PCR reaksiyonu başına QS IU, sonuçların hesaplanmasında PCR reaksiyonu başına QS ulusal birimlerini (IU) kullanın.
 Yardımcı yazılım	 Cihaz hastanın kendi kendini test etmesi amaçlı değildir	SN Seri numarası
Assigned Range [copies/mL] Atanan aralık (kopya/mL)	 Distribütör (Not: Sembolün altında geçerli ülke/bölge belirtilmiş olabilir)	Site Tesis
Assigned Range [IU/mL] Atanan aralık (IU/mL)	 Tekrar kullanmayın	Procedure Standard Standart prosedür
EC REP Avrupa Topluluğundaki yetkili temsilci	 Kadın	STERILE EO Etilen oksit ile sterilize edilmiştir
BARCODE Barkod Veri Sayfası	 Sadece IVD performans değerlendirmesi için	 Karanlık ortamda muhafaza edin
LOT Lot kodu	GTIN Global Ticari Ürün Numarası	 Sıcaklık sınırı
 Biyolojik riskler	 İthalatçı	 Test tanım dosyası
REF Katalog numarası	IVD <i>In vitro</i> tıbbi tanı cihazı	 Burası yukarı gelecek
 CE uygunluk işareti; bu cihaz, <i>in vitro</i> tıbbi tanı cihazı için geçerli CE işareti gerekliliklerine uygundur	LLR Belirlenen aralığın alt sınırı	Procedure UltraSensitive Ultra hassas prosedür
Collect Date Numune alma tarihi	 Erkek	UDI Benzersiz cihaz tanımlayıcı
 Kullanım talimatlarına bakın	 Üretici	ULR Belirlenen aralığın üst sınırı
 <n> test için yeterli miktarda içerir	CONTROL - Negatif kontrol	Urine Fill Line İdrar dolum çizgisi
CONTENT Kit içeriği	 Steril değil	Rx Only ABD için: Dikkat: Federal yasalar, bu cihazın yalnızca bir hekim tarafından veya hekimin siparişiyle satışına izin verir.
CONTROL Kontrol	 Hasta adı	 Son kullanma tarihi
 Üretim tarihi	 Hasta numarası	
 Hasta yanında test için uygun cihaz	 Buradan soyarak açın	
 Hastanın kendi kendini test etmesi amaçlı cihaz	CONTROL + Pozitif kontrol	
	QS copies / PCR PCR reaksiyonu başına QS kopya, sonuçların hesaplanmasında PCR reaksiyonu başına QS kopyalarını kullanın.	

Teknik destek

Teknik destek için lütfen yerel bağlı şirket ile iletişime geçin:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Üretici ve ithalatçı

Tablo 15: Üretici ve ithalatçı



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

ABD'de imal edilir



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

Ticari markalar ve patentler

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

Telif hakkı

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Bibliyografya

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.

Belge revizyonu

Belge revizyonu bilgileri	
Doc Rev 8.0 02/2024	Kitlerin Lysis Kit 1 tehlike bilgileri güncellendi. cobas® markası güncellendi. Herhangi bir sorunuz varsa lütfen Roche temsilciniz ile iletişime geçin.
Doc Rev 9.0 06/2024	Numune Hazırlama kitleri tehlike bilgileri güncellendi. Ön sayfadan Rx Only kaldırıldı. Uyumlaştırılmış sembol sayfası güncellendi. Herhangi bir sorunuz varsa lütfen Roche temsilciniz ile iletişime geçin.
Doc Rev 10.0 07/2024	Kitleri Wash Buffer Kit tehlike bilgileri güncellendi. Ürün güvenliliği etiketlemesinde temel olarak AB GHS kılavuzlarının takip edildiğini açıklayan ifade eklenmiştir. Herhangi bir sorunuz varsa lütfen Roche temsilciniz ile iletişime geçin.

Güvenlik ve performans raporunun özeti, şu bağlantı adresi kullanılarak bulunabilir:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.