

cobas[®] Cdiff

Test za določitev prisotnosti nukleinskih kislin za uporabo na sistemu cobas[®] Liat[®]



Za in vitro diagnostično uporabo

**cobas[®] Cdiff Nucleic acid test for use on the
cobas[®] Liat[®] System**

20 Tests

P/N: 07454945190

**cobas[®] Cdiff Positive and Negative Control Kit
for use on the cobas[®] Liat[®] System**

5 Sets

P/N: 07454970190

KAZALO VSEBINE

Predvidena uporaba	4
Povzetek in razlaga testa	4
Ozadje: Odkrivanje <i>C. difficile</i>	4
Razlaga testa	5
Načela postopka.....	5
Priprava vzorca	5
Pomnoževanje PCR in TaqMan® detekcija.....	5
Selektivno pomnoževanje.....	5
Reagenti in materiali	6
Reagenti in kontrole cobas® Cdiff.....	6
Shranjevanje reagentov in ravnanje z njimi	9
Dodatni potrebni materiali	9
Izbirni material	9
Potrebni instrumenti in programska oprema, ki niso priloženi.....	9
Previdnostni ukrepi in zahteve glede ravnanja.....	10
Opozorila in previdnostni ukrepi	10
Dobra laboratorijska praksa.....	10
Kontaminacija.....	10
Integriteta	11
Odlaganje odpadkov	11
Razlitje in čiščenje	11
Odvzem, transport in shranjevanje vzorcev	11
Odvzem vzorca	11
Shranjevanje in stabilnost vzorca pri transportu	11
Postopek testiranja.....	12
Potek dela za dodajanje serije	12
Potek dela za prenos vzorca	12
Potek dela cobas® Cdiff.....	12
Navodila za uporabo	13
Postopek dodajanja serije.....	13
Prenos vzorca v sredstvo cobas® PCR Media	15
Izvajanje testa cobas® Cdiff na kliničnih vzorcih	15
Izvajanje dodatnih kontrolnih postopkov	17

Rezultati	18
Nadzor kakovosti in veljavnost rezultatov	18
Pozitivna kontrola	18
Negativna kontrola	18
Notranji nadzor	18
Razlaga rezultatov	19
Predlagan postopek ponovnega testiranja	20
Omejitve postopka	20
Ocena učinkovitosti	21
Analitska občutljivost	21
Zaznavanje genotipov <i>C. difficile</i>	21
Natančnost	22
Analitska specifičnost	23
Interferenca	25
Klinična učinkovitost z uporabo kliničnih vzorcev	27
Korelacija testa cobas® Cdiff s kulturo	27
Korelacija testa cobas® Cdiff s primerjalnim testom NAT	28
Stopnja neveljavnosti	28
Kode napak	29
Dodatne informacije	30
Ključne lastnosti testa	30
Simboli	31
Tehnična podpora	32
Proizvajalec in uvoznik	32
Blagovne znamke in patenti	32
Avtorska pravica	32
Reference	33
Revizije dokumenta	35

Test za določitev prisotnosti nukleinskih kislin cobas® Cdiff za uporabo na sistemu cobas® Liat® je namenjen za uporabo s strani zdravstvenih delavcev ali usposobljenih uporabnikov, ki znajo uporabljati sistem cobas® Liat® pri testiranju ob bolniku, na mestu oskrbe ali v kliničnem laboratoriju.

Predvidena uporaba

Test za določitev prisotnosti nukleinskih kislin cobas® Cdiff za uporabo na sistemu cobas® Liat® je avtomatiziran kvalitativen *in vitro* diagnostični test, ki uporablja verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (PCR) za zaznavanje gena toksina B (*tcdB*) toksičnega *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) v neformiranih (tekočih ali mehkih) vzorcih blata, pridobljenih pri bolnikih, pri katerih obstaja sum okužbe s *C. difficile* (CDI). Test za določitev prisotnosti nukleinskih kislin cobas® Cdiff za uporabo na sistemu cobas® Liat® je namenjen uporabi kot pomoč pri diagnosticiranju CDI pri ljudeh v povezavi s kliničnimi in epidemiološkimi dejavniki tveganja.

Povzetek in razlaga testa

Ozadje: Odkrivanje *C. difficile*

Clostridioides difficile (*C. difficile*) je grampozitivni anaerobni bacil, ki tvori spore in je bil konec sedemdesetih let prejšnjega stoletja prepoznan kot etiološki povzročitelj diareje, povezane z antibiotiki, in psevdomembranskega kolitisa.^{1,2} *C. difficile* je najpogostejše prijavljeni bolnišnični patogen³ in naj bi bil odgovoren za 15 % do 20 % primerov diareje, povezane z antibiotiki, in skoraj vse primere psevdomembranskega kolitisa, povezanega z antibiotiki.⁴ Pojavnost okužbe s *C. difficile* se je v manj kot dveh desetletjih povečala za štirikrat⁵ in je povezana s hudo boleznijo in smrtnostjo³. Povečanje pojavnosti je deloma posledica pojava hipervirulentnih sevov, kot je ribotip BI/027/severnoameriški pulzotip 1 (NAP1). Najbolj ogrožene populacije za okužbo s CDI so starejši in hospitalizirani bolniki, ki so pred kratkim jemali antibiotike, vendar se pogostost CDI povečuje tudi zunaj bolnišničnega okolja.^{3,6}

Okužbe se prenašajo s sporami in po kolonizaciji s toksičnim patogenom *C. difficile* lahko posamezniki postanejo asimptomatski prenašalci ali razvijejo bolezen debelega črevesa. Klinične značilnosti CDI lahko segajo od blage diareje do življenjsko ogrožajočega psevdomembranskega kolitisa, za katerega so značilne bolečine v trebuhu, močna driska in sistemski simptomi, kot so vročina, anoreksija, slabost in slabo počutje. Kljub dramatičnemu povečanju pojavnosti in resnosti CDI sta metronidazol in vankomicin še vedno najprimernejši zdravili za zdravljenje akutnih epizod in ponavljajočih okužb.⁷

Diagnozo CDI običajno postavimo s prisotnostjo toksina v vzorcih blata. Najbolj toksični sevi *C. difficile* običajno proizvajajo dva beljakovinska eksotoksina: toksin A in toksin B.⁸ Majhen odstotek toksičnih sevov lahko proizvaja samo toksin B.⁹ Za tradicionalni »zlati standard« velja dokazovanje citopatskega učinka na enojnem sloju celic z delovanjem toksina B.^{10,11} Supernatant blata se lahko neposredno inkubira na enojnem sloju celic. Alternativno se izolati *C. difficile* iz blata lahko pred inkubiranjem supernatanta na enojnem sloju celic gojijo v obogatitvenem bujonu (toksična kultura). Pri obeh tehnikah traja najmanj od 48 do 72 ur do pridobitve končnega rezultata testa.

Kulture blata se zaradi zapletenosti postopka in daljšega časa do rezultata, opisanega zgoraj, ne uporabljajo pogosto, zato se diagnoza pogosto postavi z encimskimi imunskimi testi (EIA) ali testi, ki temeljijo na DNA.^{3,12} Imunski testi za odkrivanje toksinov se pogosto uporabljajo, ker lahko zagotovijo pozitivne rezultate v manj kot 4 urah, vendar je občutljivost v primerjavi s kulturo manjša.^{12,13} Nasprotno pa naj bi bilo odkrivanje gena za toksin *C. difficile* z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) bolj občutljivo in naj bi imelo krajši čas do rezultata kot kultura in imunski testi.^{3,14–17}

Ukrepi za obvladovanje okužb vključujejo preudarno uporabo protimikrobnih zdravil, preprečevanje navzkrižne okužbe in aktivno spremljanje primerov.¹⁸ Zato obstaja velika potreba po zelo občutljivem in hitrem avtomatiziranem odkrivanju *C. difficile*. Molekularne metode lahko bistveno skrajšajo čas odkrivanja, kar omogoča takojšen začetek protimikrobnega zdravljenja in takojšnje izvajanje ukrepov za obvladovanje okužb.^{14–16} Test za določitev prisotnosti nukleinskih kislin **cobas® Cdiff** za uporabo na sistemu **cobas® Liat®** je zasnovan kot hitri molekularni test za zaznavanje gena toksina B *C. difficile* v vzorcih neformiranega blata, odvzetih pri bolnikih s sumom na okužbo s CDI.

Razlaga testa

Test za določitev prisotnosti nukleinskih kislin **cobas® Cdiff** za uporabo na sistemu **cobas® Liat®** (v nadaljevanju »**cobas® Cdiff**«) je hitri test, ki popolnoma avtomatizira pripravo vzorca, pomnoževanje PCR in zaznavanje zaporedij tarčne DNA na analizatorju **cobas® Liat®**. Test **cobas® Cdiff** je sestavljen iz testne epruvete za enkratno uporabo **cobas® Cdiff**, ki vsebuje reagente za izolacijo nukleinskih kislin in PCR ter notranjo kontrolo (*Bacillus thuringiensis israelensis* ali Bti). V testni epruveti **cobas® Cdiff** potekajo postopki priprave vzorca in PCR. Testna epruveta **cobas® Cdiff** je samostojna, zato je tveganje navzkrižne kontaminacije med vzorci manjše.

Načela postopka

Priprava vzorca

Organizmi v vzorcu blata se lizirajo s kaotropnim sredstvom in proteinazo K. Sproščene nukleinske kisline, vključno z notranjo kontrolno DNA Bti, se vežejo z magnetnimi steklenimi delci. Delci se sperejo, vezane nukleinske kisline pa eluirajo v majhen volumen pufra in se nato zmešajo z reakcijsko mešanico in aktivacijskim kofaktorjem za reakcijo PCR.

Pomnoževanje PCR in TaqMan® detekcija

Reagent Master Mix vsebuje pare začetnih oligonukleotidov in sonde za toksin B *C. difficile* in notranjo kontrolo. Če so tarčna zaporedja nukleinskih kislin prisotna, pride do pomnoževanja z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi s pomočjo termostabilne polimeraze DNA, pri čemer nastanejo produkti PCR (amplikoni). Te produkte zaznamo s posebnimi sondami TaqMan®, ki vsebujejo fluorescenčno reportersko barvilo in dušilec. Običajno dušilec zaduši fluorescenco reporterskega barvila. Toda če je prisoten produkt PCR, se sonda hibridizira s produktom in se razcepi s 5'- do 3'-nukleazno aktivnostjo polimeraze, s čimer se ločita reportersko barvilo in dušilec. Ta reakcija omogoča oddajanje fluorescence reporterskega barvila, v realnem času med vsakim ciklom PCR pa analizator **cobas® Liat®** beleži signal. Ta signal interpretira programska oprema sistema **cobas® Liat®** in ga sporoči kot končne rezultate.

Selektivno pomnoževanje

Selektivno pomnoževanje tarčne nukleinske kisline iz vzorca se v testu **cobas® Cdiff** doseže z uporabo encima AmpErase (uracil-N-glikozilaza) in deoksiuridin trifosfata (dUTP). Encim AmpErase prepozna in katalizira uničevanje verig DNA, ki vsebujejo deoksiuridin¹⁹, ne pa tudi DNA, ki vsebuje deoksitimidin. Deoksiuridin ni prisoten v naravno prisotni DNA, vendar je vedno prisoten v amplikonih zaradi uporabe deoksiuridin trifosfata namesto timidin trifosfata kot enega od dNTP v reagentu Master Mix, zato samo amplikoni vsebujejo deoksiuridin. Deoksiuridin poskrbi, da so amplikoni, ki so posledica kontaminacije, dovzetni za uničenje z encimom AmpErase pred pomnoževanjem tarčne DNA. Encim AmpErase, ki je vključen v reagentu Master Mix, katalizira cepitev DNA, ki vsebuje deoksiuridin, na ostankih deoksiuridina z odpiranjem deoksiribozne verige v položaju C1. Pri segrevanju v prvem koraku termičnega cikla pri alkalni vrednosti pH reagenta Master Mix se veriga DNA amplikona pretrga na mestu deoksiuridina, zaradi česar DNA ni mogoče amplificirati. Encim AmpErase je neaktiven pri temperaturah nad 55 °C, tj. v vseh fazah termičnega cikla, in zato ne uniči tarčnega amplikona. Test **cobas® Cdiff** dokazano inaktivira najmanj 1000 kopij amplikona *C. difficile*, ki vsebuje deoksiuridin, na reakcijo PCR.

Reagenti in materiali

Reagenti in kontrole cobas® Cdiff

Pregl. 1. cobas® Cdiff

Test za določitev prisotnosti nukleinskih kislin cobas® Cdiff za uporabo na sistemu cobas® Liat® Shranjujte pri 2–8 °C 20 testov (P/N 07454945190) 2 paketa prenosnih pipet cobas® Liat® (P/N 09329676001)		
Reagenti v testni epruveti cobas® Cdiff	Sestavine reagentov	Varnostni simbol in opozorilo ^a
cobas® Liat® Cdiff Internal Control	PBS Tween 80 0,01 % konzervans ProClin® 300 Glicerol EDTA < 1 % zaloga Bti (inaktivirana) EUH210: Varnosti list na voljo na zahtevo. EUH208: Vsebuje mešanico: 5-kloro-2-metil-4-izotiazolin-3-on in 2-metil-2H-izotiazol-3-on (3 : 1). Lahko povzroči alergijski odziv.	N/A
cobas® Liat® Proteinase K	Tris pufer EDTA Kalcijev klorid Kalcijev acetat < 2,0 % proteinaza K ^b Glicerol	 NEVARNOST H317: Lahko povzroči alergijski odziv kože. H334: Lahko povzroči simptome alergije ali astme ali težave z dihanjem pri vdihavanju. P261: Ne vdihavati meglice ali hlapov. P280: Nositi zaščitne rokavice. P284: Nositi opremo za zaščito dihal. P304 + P340: PRI VDIHAVANJU: prenesti osebo na svež zrak in jo pustiti v udobnem položaju, ki olajša dihanje. P333 + P313: Če nastopi draženje kože ali se pojavi izpuščaj: poiščite zdravniško pomoč/oskrbo. P342 + P311: Pri respiratornih simptomih: Pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika. 39450-01-6 Proteinaza, <i>Tritirachium album</i> serin
cobas® Liat® Magnetic Glass Particles	Magnetni stekleni delci Voda	N/A

Test za določitev prisotnosti nukleinskih kislin cobas® Cdiff za uporabo na sistemu cobas® Liat®

Shranjujte pri 2–8 °C

20 testov (P/N 07454945190)

2 paketa prenosnih pipet cobas® Liat® (P/N 09329676001)

Reagenti v testni epruveti cobas® Cdiff	Sestavine reagentov	Varnostni simbol in opozorilo ^a
cobas® Liat® Lysis Buffer	Natrijev citrat 3 % polidokanol ^b 42,6 % gvanidinijev tiocianat ^b Ditiotreitol	 NEVARNOST H302: Zdravju škodljivo pri zaužitju. H314: Povzroča hude opekline kože in poškodbe oči. H412: Škodljivo za vodne organizme, z dolgotrajnimi učinki. EUH032: V stiku s kislinami se sprošča zelo strupen plin. EUH071: Jedko za dihalne poti. P273: Preprečiti sproščanje v okolje. P280: Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za oči/zaščito za obraz/zaščito za sluh. P301 + P330 + P331: PRI ZAUŽITJU: Izprati usta. NE izzvati bruhanja. P303 + P361 + P353: PRI STIKU S KOŽO (ali lasmi): takoj sleči vsa kontaminirana oblačila. Kožo izprati z vodo. P304 + P340 + P310: PRI VDIHAVANJU: prenesti osebo na svež zrak in jo pustiti v udobnem položaju, ki olajša dihanje. Takoj pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika. P305 + P351 + P338 + P310: PRI STIKU Z OČMI: previdno izpirati z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem. Takoj pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika. 593-84-0 Gvanidinijev tiocianat 9002-92-0 Polidokanol
cobas® Liat® Wash Buffer	Natrijev citrat dihidrat 0,05 % N-metilizotiazolon HCl	 POZOR H317: Lahko povzroči alergijski odziv kože. P261: Ne vdihavati meglice ali hlapov. P272: Kontaminirana delovna oblačila niso dovoljena zunaj delovnega mesta. P280: Nositi zaščitne rokavice. P333 + P313: Če nastopi draženje kože ali se pojavi izpuščaj: poiščite zdravniško pomoč/oskrbo. P362 + P364: Sleči kontaminirana oblačila in jih oprati pred ponovno uporabo. P501: Odstraniti vsebino/posodo pooblaščenemu obratu za odstranitev odpadkov. 26172-54-3 2-metil-2H-izotiazol-3-on hidroklorid

Test za določitev prisotnosti nukleinskih kislin cobas® Cdiff za uporabo na sistemu cobas® Liat®

Shranjujte pri 2–8 °C

20 testov (P/N 07454945190)

2 paketa prenosnih pipet cobas® Liat® (P/N 09329676001)

Reagenti v testni epruveti cobas® Cdiff	Sestavine reagentov	Varnostni simbol in opozorilo ^a
cobas® Liat® Elution Buffer-1	Rekombinantni humani serumski albumin Tris-HCl pufer 0,09 % natrijev azid	N/A
cobas® Liat® Cdiff Master Mix-1	Tricin pufer EDTA DMSO Kalijev acetat Kalijev hidroksid 0,01 % zgornji in spodnji <i>C. difficile</i> in začetni oligonukleotidi za notranjo kontrolo < 0,01 % fluorescentno označen <i>C. difficile</i> in sonde za notranjo kontrolo 0,09 % natrijev azid	N/A
cobas® Liat® Cdiff Master Mix-2	DMSO Tween 20 < 0,19 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0,01 % oligonukleotidni aptamer < 0,01 % polimeraza Z05 DNA (mikrobna) < 0,02 % encim AmpErase (uracil-N-glikozilaza) (mikrobni) 0,09 % natrijev azid	N/A
cobas® Liat® Cdiff Cofactor	Manganov acetat Magnezijev acetat Goveji serumski albumin iz goveje plazme, pridobljene v Združenih državah Amerike 0,09 % natrijev azid	N/A

Pregl. 2. Pozitivni in negativni komplet kontrol cobas® Cdiff Positive and Negative Control Kit za uporabo na sistemu cobas® Liat®**cobas® Cdiff Positive and Negative Control Kit for use on the cobas® Liat® System**

Shranjujte pri temperaturi 15–30 °C

5 kompletov (P/N 07454970190)

Sestavni deli kompleta	Sestavine reagentov	Količina v kompletu	Varnostni simbol in opozorilo
Cdiff (+) C (Pozitivna kontrola cobas® Liat® Cdiff)	Tris pufer EDTA < 0,01 % poli rA RNK (sintetična) 0,05 % natrijev azid < 0,01 % neinfektivna plazmidna DNA (mikrobna), ki vsebuje zaporedje <i>C. difficile</i>	5 vial	N/A
BUF (–) C (Negativna kontrola cobas® Liat®)	Tris pufer EDTA 0,05 % natrijev azid < 0,01 % poli rA RNK (sintetična)	5 vial	N/A

Shranjevanje reagentov in ravnanje z njimi

Pregl. 3. Shranjevanje reagentov in ravnanje z njimi

Reagent	Temperatura shranjevanja	Čas shranjevanja
Test za določitev prisotnosti nukleinskih kislin cobas ® Cdiff za uporabo na sistemu cobas ® Liat®	2–8 °C	Stabilno do navedenega roka uporabnosti
Pozitivni in negativni komplet kontrol cobas ® Cdiff Positive and Negative Control Kit za uporabo na sistemu cobas ® Liat®	15–30 °C	Stabilno do navedenega roka uporabnosti

Opomba: Reagentov ne zamrzujte.

Ne odpirajte ovojnine posamezne testne epruvete, dokler uporabnik ni pripravljen na testiranje.

Komplet prenosnih pipet **cobas**® Liat® lahko shranjujete pri sobni temperaturi, potem ko ste ga prvič odstranili iz kompleta testne epruvete **cobas**® Cdiff. Zagotovite, da pri jemanju pipet za prenos iz paketa pipet za prenos **cobas**® Liat® uporabljate čiste rokavice za enkratno uporabo. Takoj po odstranitvi potrebnega števila pipet ponovno tesno zaprite paket pipet za prenos **cobas**® Liat®.

Datum izteka roka uporabnosti reagenta temelji na koordiniranem univerzalnem času (UTC). Lokalni čas izteka roka uporabnosti reagenta se lahko zamakne za plus ali minus 12 ur, odvisno od lokalnega časovnega pasu glede na UTC.

Dodatni potrebni materiali

Pregl. 4. Dodatni potrebni materiali

Materiali	P/N
cobas ® PCR Media Uni Swab Sample Kit	07958030190
Rokavice za enkratno uporabo, brez pudra	Sprejemljive so katere koli rokavice za enkratno uporabo brez pudra.

Za več informacij o materialih, ki se prodajajo ločeno, se obrnite na lokalnega predstavnika družbe Roche.

Izbirni material

Pregl. 5. Izbirni material

Material	P/N
Komplet nadomestnega pokrovčka cobas ® PCR Replacement Cap Kit	07958056190

Za več informacij o izbirnem materialu se obrnite na lokalnega predstavnika družbe Roche.

Potrebni instrumenti in programska oprema, ki niso priloženi

Pregl. 6. Potrebni instrumenti in programska oprema, ki niso priloženi

Zahtevani instrumenti in programska oprema, niso priloženi
Analizator cobas ® Liat® (P/N 07341920190) • vključno z različico programske opreme (jedrno) 3.3.0 ali novejšo za sistem cobas® Liat®
cobas ® Cdiff Script v1.1 ali novejši

Za več informacij o zahtevanih instrumentih in programski opremi se obrnite na lokalnega predstavnika družbe Roche.

Previdnostni ukrepi in zahteve glede ravnanja

Opozorila in previdnostni ukrepi

Tako kot pri vseh testnih postopkih je tudi pri tem testu za pravilno izvedbo bistvena dobra laboratorijska praksa. Zaradi visoke analitične občutljivosti tega testa je treba poskrbeti, da reagenti, vzorci in mešanice za pomnoževanje niso kontaminirani.

- Samo za *in vitro* diagnostično uporabo.
- Test za določitev prisotnosti nukleinskih kislin **cobas® Cdiff** za uporabo na sistemu **cobas® Liat®** je za uporabo s strani zdravstvenih delavcev ali usposobljenih uporabnikov, ki znajo uporabljati sistem **cobas® Liat®** na mestu oskrbe ali v kliničnem laboratoriju.
- Preprečite kontaminacijo reagentov in vzorcev z mikrobi in DNA.
- Rokavice zamenjajte pred odstranitvijo pipete za prenos iz paketa pipet za prenos **cobas® Liat®** ter po rokovanju s posameznim vzorcem ali kontrolo, da preprečite kontaminacijo reagentov in pipet.
- Varnostni listi so na zahtevo na voljo pri lokalnem predstavniku družbe Roche.
- Lizni pufer **cobas® Liat®** (reagent LYS) vsebuje gvanidin tiocianat. Ne dovolite neposrednega stika med gvanidin tiocianatom in natrijevim hipokloritom (belilom) ali drugimi zelo reaktivnimi reagenti, kot so kisline ali baze. Te mešanice lahko sproščajo škodljive pline.
- **cobas® Liat®** Elution Buffer-1 (EB), **cobas® Liat® Cdiff** Master Mix-1 (Cdiff MMX-1), **cobas® Liat® Cdiff** Master Mix-2 (Cdiff MMX-2), **cobas® Liat® Cdiff** Cofactor (Cofactor), BUF (-) C in Cdiff (+) C vsebujejo natrijev azid.
- Za dodatna opozorila, previdnostne ukrepe in postopke za zmanjševanje tveganja kontaminacije pri analizatorju **cobas® Liat®** preverite veljaven uporabniški vodnik za sistem **cobas® Liat®**.
- V EU: O vseh resnih incidentih, do katerih lahko pride pri uporabi tega testa, obvestite pristojni lokalni organ in proizvajalca.

Dobra laboratorijska praksa

- Ne pipetirajte z usti.
- Ne jejte, ne pijte in ne kadite v delovnih prostorih.
- Po rokovanju z vzorci in reagenti iz kompleta si temeljito umijte roke.
- V skladu s pravilnikom ustanove pri rokovanju s katerim koli reagentom uporabljajte zaščito za oči, laboratorijske plašče in rokavice za enkratno uporabo. Izogibajte se stiku teh materialov s kožo, očmi ali sluznicami. Če pride do stika, prizadeto mesto takoj sperite z veliko količino vode. Če prizadetega mesta ne oskrbite, lahko pride do opeklin. Če pride do razlitja, ga razredčite z vodo in nato obrišite do suhega.
- Dodajanje encima AmpErase v glavno mešanico **cobas® Liat® Cdiff** Master Mix omogoča selektivno pomnoževanje tarčne DNA, vendar je za preprečevanje kontaminacije reagentov in mešanic za pomnoževanje potrebna dobra laboratorijska praksa in natančno upoštevanje postopkov, določenih v tem dokumentu z navodili za uporabo.
- Temeljito očistite in razkužite vse laboratorijske delovne površine s sveže pripravljeno raztopino 0,5-odstotnega natrijevega hipoklorita v destilirani ali deionizirani vodi (gospodinjsko belilo razredčite v razmerju 1 : 10). Nato površino obrišite s 70-odstotnim etanolom.

Kontaminacija

- Rokavice je treba uporabljati in jih zamenjati pred odstranjevanjem pipete za prenos **cobas® Liat®** iz kompleta pipet za prenos **cobas® Liat®**, med rokovanjem z vzorci in s testno epruveto **cobas® Cdiff**, da preprečite kontaminacijo. Pri ravnanju z vzorci in kontrolami se izogibajte kontaminaciji rokavic. Pri rokovanju z vzorci in kompleti reagentov uporabljajte laboratorijske rokavice, laboratorijske halje in zaščito za oči.

- Izogibajte se kontaminaciji reagentov z mikrobi in ribonukleazami.
- Lažni pozitivni rezultati se lahko pojavijo, če med ravnanjem z vzorci ni preprečeno prenašanje vzorcev.
- Z vzorci je treba ravnati kot s kužnimi z uporabo varnih laboratorijskih postopkov, kot so opisani v dokumentu Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories²⁰ in v dokumentu CLSI M29-A4.²¹

Integriteta

- Kompletov ne uporabljajte po preteku roka uporabnosti.
- Reagentov ne združujte.
- Ne uporabljajte poškodovane testne epruvete **cobas® Cdiff** ali testne epruvete **cobas® Cdiff**, ki je po odstranitvi iz folije padla na tla.
- Testnih epruvet **cobas® Cdiff** ne uporabljajte znova. Če testna epruveta **cobas® Cdiff** ni nameščena v tulcu ali če prostor za vzorec v epruveti že vsebuje tekočino, epruvete NE uporabljajte.
- Vso opremo je treba ustrezno vzdrževati v skladu z navodili proizvajalca.
- Vsi kompleti reagentov morajo biti ustrezno shranjeni. Glejte Pregl. 3.

Odlaganje odpadkov

- Testno epruveto **cobas® Cdiff** je treba odvreči v ustrezen zabojnik za biološke odpadke, kot je določeno v okoljskih standardih za zdravje in varnost na vašem delovnem mestu.
- Reagenti in kontrole **cobas® Cdiff** vsebujejo natrijev azid (glejte »Opozorila in previdnostni ukrepi«). Natrijev azid lahko reagira z vodovodno napeljavo iz svinca in bakra ter tvori zelo eksplozivne kovinske azide. Rastopine, ki vsebujejo natrijev azid, med zlivanjem v laboratorijske umivalnike splaknite z veliko količino hladne vode, da preprečite kopičenje azida.
- Neuporabljeno testno epruveto in odpadke odstranite v skladu z državnimi, zveznimi in lokalnimi predpisi.

Razlitje in čiščenje

- V primeru razlitja na analizatorju **cobas® Liat®** upoštevajte ustrezna navodila za čiščenje iz uporabniškega vodnika za sistem **cobas® Liat®**.

Odvzem, transport in shranjevanje vzorcev

Z vsemi vzorci ravnajte kot z možnimi prenašalci povzročiteljev okužb.

Odvzem vzorca

Test **cobas® Cdiff** se sme uporabljati le pri **vzorcih delno formiranega ali neformiranega blata**. Ta je opredeljen kot vzorec blata, ki prevzame obliko vsebnika. Vzorec blata odvezmite v čist, suh in neuporabljen vsebnik v skladu s standardnimi operativnimi postopki vaše ustanove.

Shranjevanje in stabilnost vzorca pri transportu

Vzorci neformiranega blata so 2 dneva stabilni pri sobni temperaturi (2–30 °C) oziroma 9 dni pri temperaturi 2–8 °C, preden se prenesejo v sredstvo **cobas® PCR Media** in testirajo v sistemu **cobas® Liat®** (to je bilo dokazano s testiranjem vzorcev po zaporednem 2-dnevnem shranjevanju pri 30 ± 1 °C in nato 7-dnevnem shranjevanju pri 2–8 °C).

Vzorec blata, ki je ponovno suspendiran v sredstvu **cobas® PCR Media** je 7 dni stabilen pri temperaturi 2–30 °C, preden je testiran v sistemu **cobas® Liat®**.

Transport vzorcev *C. difficile* mora potekati v skladu z državnimi, zveznimi in lokalnimi predpisi za transport etioloških povzročiteljev.

Postopek testiranja

Potek dela za dodajanje serije

Slika 1. Potek dela za dodajanje serije

1	Zaženite sistem in se prijavite.
2	Iz shrambe odstranite kontrole, testne epruvete in pipete za prenos.
3	V meniju »Assay« (Test) izberite »New Lot« (Nova serija).
4	Odčitajte črtno kodo na ID-kartici s črtno kodo iz navodil za uporabo.
5	Odčitajte in izvedite negativno kontrolo.
6	Odčitajte in izvedite pozitivno kontrolo.

Potek dela za prenos vzorca

Slika 2. Potek dela za prenos vzorca

1	Palčko potopite v vzorec blata.
2	Inokulirano palčko dajte v epruveto s sredstvom cobas® PCR Media.
3	Palčko odlomite na sivi zarezi.
4	Epruveto zaprite in zavrtite najmanj 5-krat.

Potek dela **cobas®** Cdiff

Slika 3. Potek dela **cobas®** Cdiff

1	Zaženite sistem in se prijavite.
2	Iz shrambe odstranite vzorce, testne epruvete in pipete za prenos.
3	V glavnem meniju izberite »Run Assay« (Izvedi test).
4	Odčitajte črtno kodo na testni epruveti cobas® Cdiff.
5	Odčitajte ali vnesite ID vzorca.
6	S pipeto za prenos dodajte vzorec v testno epruveto cobas® Cdiff in ponovno zaprite epruveto s pokrovčkom.
7	Ponovno odčitajte črtno kodo na testni epruveti cobas® Cdiff.
8	Zaženite postopek, tako da vstavite testno epruveto cobas® Cdiff.
9	Preglejte rezultate*.
10	Odstranite in zavrzite uporabljen testno epruveto cobas® Cdiff.

* Glejte uporabniški vodnik za sistem **cobas®** Liat® glede podrobnosti vnosa rezultatov v DMS in LIS.

Navodila za uporabo

Postopek dodajanja serije

Pred uporabo nove serije testnih epruvet **cobas® Cdiff** je treba na analizatorju **cobas® Liat®** izvesti postopek dodajanja serije (»Add Lot«) za validacijo serije testne epruvete **cobas® Cdiff** na vaši lokaciji. Postopek vključuje analizo vzorca negativne kontrole in vzorca pozitivne kontrole Cdiff.

Materiali, potrebni za dodajanje serije (»Add Lot«)

- Nova serija za test za določitev prisotnosti nukleinskih kislin **cobas® Cdiff** za uporabo na sistemu **cobas® Liat®** (dve testni epruveti)
- 2 pipeti za prenos iz kompleta pipet za prenos **cobas® Liat®**
- Kartica z črtno kodo za ID nove serije testnih epruvet **cobas® Cdiff** v navodilih za uporabo
- Pozitivna kontrola **cobas® Liat® Cdiff**
- Negativna kontrola **cobas® Liat®**
- Kartica s črtno kodo za pozitivno kontrolo **cobas® Liat® Cdiff** in negativno kontrolo **cobas® Liat®**

Opomba: Za podrobnosti glede navodil za uporabo glejte uporabniški vodnik za sistem **cobas® Liat®**.

Postopek

1. Pritisnite gumb za vklop/izklop, da zaženete analizator **cobas® Liat®**.
2. Na zaslonu analizatorja **cobas® Liat®** izberite **Login** (Prijava).
3. Po pozivu vnesite uporabniško ime in izberite **Enter** (Vnesi).
4. Po pozivu vnesite novo geslo in izberite **Enter** (Vnesi).

Opomba: Morda boste pozvani, da potrdite, da ste prebrali uporabniški vodnik (npr. uporabniški vodnik za sistem **cobas® Liat®**).

5. V glavnem meniju analizatorja **cobas® Liat®** izberite **Assay Menu** (Meni testov).
6. Izberite **New Lot** (Nova serija) na dnu seznama.
7. Na poziv **Scan the Insert ID** (Odčitaj ID v navodilih za uporabo) izberite **Scan** (Odčitaj) ter odčitajte ID-kartico s črtno kodo iz navodil za uporabo testa **cobas® Cdiff**. Prepričajte se, da rdeča lučka za odčitavanje sega čez celotno črtno kodo.

Opomba: Morda boste pozvani, da potrdite, da ste prebrali navodila za uporabo.

8. Na poziv **Scan Negative Control ID** (Odčitaj ID negativne kontrole) izberite **Scan** (Odčitaj) ter odčitajte kartico s črtno kodo negativne kontrole, ki je priložena kontrolnemu kompletu. Prepričajte se, da rdeča lučka za odčitavanje sega čez celotno črtno kodo. Nato se na analizatorju **cobas® Liat®** prikaže sporočilo **Add negative control & scan tube ID** (Dodaj negativno kontrolo in odčitaj ID na epruveti).
9. Epruveto negativne kontrole **cobas® Liat®** držite pokonci ter rahlo potrkajte po ravni površini, da se tekočina zbere na dnu epruvete.
10. Odprite folijo testne epruvete **cobas® Cdiff** (iz serije za dodajanje) in odstranite testno epruveto.

11. Uporabite pipeto za prenos iz kompleta pipet za prenos **cobas® Liat®**, da dodate negativno kontrolo **cobas® Liat®** v testno epruveto **cobas® Cdiff**. Močno stisnite bučko pipete, da je popolnoma sploščena, nato vstavite konico pipete v tekočino in s počasnim popuščanjem bučke vsrkajte vzorec.

Opomba: *Za prenos kontrol in vzorcev v testno epruveto **cobas® Cdiff** uporabljajte samo pipete za prenos, ki so priložene paketu pipet za prenos **cobas® Liat®**.*

12. Previdno odstranite pokrovček testne epruvete **cobas® Cdiff** in vstavite pipeto v odprtino. Konico pipete namestite blizu dna odprtega segmenta.
13. Počasi stisnite bučko in izpraznite vsebino pipete v testno epruveto **cobas® Cdiff**. Pazite, da v vzorcu ne nastanejo mehurčki. Ne spuščajte bučke pipete, dokler se pipeta še vedno nahaja v testni epruveti **cobas® Cdiff**.

Opomba: *Ne prebadajte testne epruvete **cobas® Cdiff** oziroma tesnila na dnu dela za vzorec. Če je kar koli od navedenega poškodovano, zavrzite tako testno epruveto **cobas® Cdiff** kot pipeto za prenos in ponovno zaženite postopek testiranja z novo testno epruveto **cobas® Cdiff** in pipeto.*

14. Privijte pokrovček nazaj na testno epruveto **cobas® Cdiff**. Pipeto za prenos zavrzite.
15. Izberite **Scan** (Odčitaj) in testno epruveto **cobas® Cdiff** postavite vodoravno na mizo pod čitalnik črtnih kod tako, da rdeča lučka za odčitavanje sega čez celotno črtno kodo. Ko je črna koda odčitana, se vratca za vstop testne epruvete na vrhu analizatorja **cobas® Liat®** samodejno odprejo.
16. Odstranite ovoj testne epruvete **cobas® Cdiff** in takoj vstavite testno epruveto **cobas® Cdiff** v analizator **cobas® Liat®** tako, da se testna epruveta zaskoči na svoje mesto.

Opomba: *Testna epruveta **cobas® Cdiff** se prilega samo v eni smeri – žlebičasta stran testne epruvete **cobas® Cdiff** mora biti na levi strani, medtem ko je pokrovček na vrhu.*

17. Če testna epruveta ni vstavljena do takrat, ko se vratca zaprejo, ponovno odčitajte črtno kodo testne epruvete **cobas® Cdiff** ter znova vstavite testno epruveto **cobas® Cdiff**. Ko je testna epruveta **cobas® Cdiff** pravilno vstavljena, analizator **cobas® Liat®** samodejno zapre vratca in začne izvajati testiranje.
18. Med testiranjem analizator **cobas® Liat®** prikazuje stanje postopka in ocenjen preostali čas do zaključka. Ko je test končan in če se prikaže napis **Negative control result accepted** (Potrjen rezultat negativne kontrole) izberite **Confirm** (Potrdi). Če je rezultat zavržen, ponovite postopek negativne kontrole (korake 8–18). Če tudi pri ponovnem kontrolnem postopku ne dobite pričakovanih rezultatov, se obrnite na lokalnega predstavnika družbe Roche.
19. Ko je testiranje končano, analizator **cobas® Liat®** prikaže sporočilo **Remove the assay tube slowly and carefully** (Počasi in previdno odstrani testno epruveto) in samodejno odpre vstopna vratca za testno epruveto. Testno epruveto **cobas® Cdiff** počasi dvignite iz analizatorja **cobas® Liat®**. Uporabljeno testno epruveto **cobas® Cdiff** zavrzite v vsebnik za nevarne odpadke.
20. Izberite **Back** (Nazaj) za nadaljevanje na test pozitivne kontrole **cobas® Liat® Cdiff** na istem instrumentu.
21. Pri pozitivni kontroli testa **cobas® Liat® Cdiff** na podoben način sledite korakom 8 do 17 namesto negativne kontrole **cobas® Liat®**.
22. Če se na koncu postopka prikaže sporočilo »**Positive Control Result Accepted. Lot ... added.**« (Rezultat pozitivne kontrole sprejet. Dodana serija ...), izberite **Confirm** (Potrdi), nato pa za vrnitev v glavni meni izberite **Back** (Nazaj). Če je rezultat zavržen, ponovite test pozitivne kontrole testa **cobas® Liat® Cdiff**. Če tudi pri ponovnem kontrolnem postopku ne dobite pričakovanih rezultatov, se obrnite na lokalnega predstavnika družbe Roche.

23. Ponovite korak 19.

24. Izberite **Assay Menu** (Meni testov), da preverite, ali je bila dodana nova serija.

Ko na enem analizatorju dokončate postopek »Add Lot« (Dodaj serijo), uporabite meni »Tools« (Orodja) na analizatorju **cobas®** Liat s ključkom USB za prenos informacij o seriji na druge analizatorje na vaši lokaciji. To drugim analizatorjem omogoči uporabo te serije testne epruvete **cobas®** Cdiff brez izvedbe postopka »Add Lot« na vsakem analizatorju.

Upoštevajte navodila v uporabniškem vodniku sistema **cobas®** Liat® in na analizatorju, na katerem je bil izveden postopek »Add Lot«, izvedite postopek »Export assay lots« (Izvozi testne serije). Nato na vsakem izmed preostalih analizatorjev na vaši lokaciji izvedite postopek »Import assay lots« (Uvozi testne serije).

Prenos vzorca v sredstvo **cobas®** PCR Media

1. Vzorec blata je treba prenesti v epruveto sredstva **cobas®** PCR Media in ga testirati v časovnem okviru, opisanem v razdelku »Odvzem, transport in shranjevanje vzorca«. Izvirni vzorec blata se imenuje tudi »primarni vzorec«, suspenzija blata v sredstvu **cobas®** PCR Media (glejte korake spodaj) pa se v tem dokumentu imenuje tudi »sekundarni vzorec«.
2. Za prenos vzorca blata uporabite samo priloženo palčko iz kompleta sredstva z eno palčko **cobas®** PCR Media Uni Swab Sample Kit. Ne da bi se dotaknili stranice vsebnika z blatom, potopite konico palčke v vzorec blata do konca koničastega dela.
3. Takoj odstranite in inokulirano palčko vstavite v epruveto s sredstvom **cobas®** PCR Media. Ne testirajte vzorca, če v njem ni dovolj blata, da bi bila konica palčke v celoti potopljena.
4. Palčko prelomite na sivi zarezi, tako da jo pritisnete ob stranico epruvete s sredstvom **cobas®** PCR Media.
5. Epruveto zaprite in zavrtite najmanj 5-krat.

Opomba: Test **cobas®** Cdiff je validiran za uporabo s kompletom sredstva z eno palčko **cobas®** PCR Media Uni Swab Sample Kit. Drugi pripomočki ali vrste sredstev niso bili validirani za uporabo s testom **cobas®** Cdiff.

Opomba: Da bi se izognili navzkrižni kontaminaciji suspenzije vzorcev blata v sredstvu **cobas®** PCR Media, je treba za ponovno zapiranje suspenzije vzorcev po obdelavi uporabiti dodatne pokrovčke za epruvete s sredstvom **cobas®** PCR Media v drugi barvi (naravni; glejte »Dodatni material«).

Opomba: Epruvete s sredstvom **cobas®** PCR Media vsebujejo zadosten volumen sredstva **cobas®** PCR Media za suspenzije blata, da so lahko večkrat testirane v sistemu **cobas®** Liat®. Najmanjši volumen suspenzije blata za izvedbo postopka **cobas®** Cdiff je 0,2 ml.

Izvajanje testa **cobas®** Cdiff na kliničnih vzorcih

Potrebni materiali za izvedbo testa **cobas®** Cdiff

- Testna epruveta **cobas®** Cdiff iz vrečke testa **cobas®** Cdiff
- Pipeta za prenos iz kompleta pipet za prenos **cobas®** Liat®
- Vzorci blata, preneseni in ponovno suspendirani v sredstvu **cobas®** PCR Media (glejte »Prenos vzorca v sredstvo **cobas®** PCR Media«)

Postopek

1. Zagotovite, da je analizator **cobas® Liat®** vklopljen.
2. Na zaslonu analizatorja **cobas® Liat®** izberite **Login** (Prijava).
3. Po pozivu vnesite uporabniško ime in izberite **Enter** (Vnesi).
4. Po pozivu vnesite novo geslo in izberite **Enter** (Vnesi).

Opomba: *Morda boste pozvani, da potrdite, da ste prebrali uporabniški vodnik (npr. uporabniški vodnik za sistem **cobas® Liat®**).*

5. V glavnem meniju izberite **Run Assay** (Izvedi test).
6. Odprite vrečko s testno epruveto **cobas® Cdiff** in vzemite iz nje testno epruveto. Ob pozivu **Scan Tube ID** (Odčitaj ID epruvete) izberite **Scan** (Odčitaj) in testno epruveto **cobas® Cdiff** postavite vodoravno na mizo pod čitalnik črtnih kod tako, da rdeča lučka za odčitavanje sega čez celotno črtno kodo.
7. Na poziv **Scan sample ID** (Odčitaj ID vzorca) izberite **Scan** (Odčitaj), da odčitate črtno kodo vzorca. Če vzorca ni mogoče odčitati, izberite **Enter** (Vnesi) za ročni vnos ID vzorca.

Opomba: *Če morate potrditi prejete podatke o pacientu, izberite gumb »Confirm« (Potrdi), če to določa konfiguracija analizatorja.*

8. Ob pozivu dodajte vzorec v testno epruveto **cobas® Cdiff**.
9. Za prenos sekundarnega vzorca uporabite pipeto za prenos iz kompleta pipet za prenos **cobas® Liat®**. Močno stisnite bučko pipete, da je popolnoma sploščena, nato vstavite konico pipete v tekočino in s počasnim popuščanjem bučke vsrkajte vzorec.

Opomba: *Zamenjajte rokavice, preden pipeto za prenos vzamete iz kompleta pipet za prenos **cobas® Liat®**, da preprečite kontaminacijo kompleta pipet.*

10. Previdno odstranite pokrovček testne epruvete **cobas® Cdiff** in vstavite pipeto v odprtino. Konico pipete namestite blizu dna odprtega segmenta.
11. Počasi stisnite bučko in izpraznite vsebino pipete v testno epruveto **cobas® Cdiff**. Ne spuščajte bučke pipete, dokler se pipeta še vedno nahaja v testni epruveti **cobas® Cdiff**.
12. Ponovno zaprite testno epruveto **cobas® Cdiff** in zavržite pipeto za prenos.

Opomba: *Preprečite navzkrižno kontaminacijo rokavic za enkratno uporabo, opreme in delovnih površin s preostalo vsebino pipete.*

13. Izberite **Scan** (Odčitaj) in ponovno odčitajte črtno kodo iste testne epruvete **cobas® Cdiff**. Vratca za vstop testne epruvete na vrhu analizatorja **cobas® Liat®** se samodejno odprejo.
14. Odstranite ovoj testne epruvete **cobas® Cdiff** in takoj vstavite testno epruveto **cobas® Cdiff** v analizator **cobas® Liat®** tako, da se testna epruveta zaskoči na svoje mesto.

Opomba: *Testna epruveta **cobas® Cdiff** se prilega samo v eni smeri – žlebičasta stran testne epruvete **cobas® Cdiff** mora biti na levi strani, medtem ko je pokrovček na vrhu.*

15. Če testna epruveta ni vstavljena do takrat, ko se vratca zaprejo, ponovno odčitajte črtno kodo testne epruvete **cobas® Cdiff** ter znova vstavite testno epruveto **cobas® Cdiff**. Ko je testna epruveta **cobas® Cdiff** pravilno vstavljena, analizator **cobas® Liat®** samodejno zapre vratca in začne izvajati testiranje.
16. Med testiranjem analizator **cobas® Liat®** prikazuje stanje postopka in ocenjen preostali čas do zaključka. Ko je testiranje končano, analizator **cobas® Liat®** prikaže sporočilo **Remove the assay tube slowly and carefully** (Počasi in previdno odstrani testno epruveto) in samodejno odpre vstopna vratca za testno epruveto. Testno epruveto **cobas® Cdiff** počasi dvignite iz analizatorja **cobas® Liat®**. Uporabljeno testno epruveto **cobas® Cdiff** zavržite v vsebnik za nevarne odpadke.
17. Izberite **Report** (Poročilo) za ogled poročila z rezultati. Po potrebi izberite **Print** (Natisni) za tiskanje poročila.
18. Izberite **Back** (Nazaj) in nato **Main** (Glavni) za vrnitev v glavni meni za izvedbo naslednjega testa.

Izvajanje dodatnih kontrolnih postopkov

Skladno z lokalnimi, državnimi, zveznimi zahtevami in/ali zahtevami akreditacijske organizacije se lahko s serijo testnih epruvet **cobas® Cdiff**, ki so že bile dodane na podlagi poteka »Add Lot« (Dodaj serijo), izvedejo dodatni kontrolni postopki. Za izvedbo teh postopkov uporabite komplet za pozitivno in negativno kontrolo **cobas® Cdiff Positive and Negative Control Kit** za uporabo na sistemu **cobas® Liat®**.

Potrební materiali za dodatne kontrolne postopke

- Testnih epruvet in pipet za prenos **cobas® Cdiff** ne uporabite ponovno.
- Pozitivna kontrola **cobas® Liat® Cdiff** in/ali negativna kontrola **cobas® Liat®**
- Pripadajoče črtne kode za pozitivno kontrolo **cobas® Liat Cdiff** in/ali negativno kontrolo **cobas® Liat®**.

Postopek

Uporabite postopek iz razdelka »Izvajanje testa **cobas® Cdiff** pri testiranju kliničnih vzorcev« za izvedbo dodatnih kontrolnih postopkov. V 7. koraku ne pozabite za odčitavanje črtne kode ID vzorca uporabiti kontrolnih črtnih kod, priloženih kompletu pozitivnih in negativnih kontrol **cobas® Cdiff Positive and Negative Control Kit**. Razlaga rezultatov za test **cobas® Cdiff** pri izvajanju dodatnih pozitivnih ali negativnih kontrol **Cdiff** je prikazana v Pregl. 9 in Pregl. 10 v razdelku »Razlaga rezultatov«. Uporaba črtnih kod, ki niso priložene črtne kode kontrole, lahko vodi do nepravilnih rezultatov kontrole.

Rezultati

Nadzor kakovosti in veljavnost rezultatov

Ena pozitivna kontrola **cobas**® Liat® Cdiff in ena negativna kontrola **cobas**® Liat® se izvedeta med prej opisanim postopkom »Add Lot« (Dodaj serijo). Veljavne rezultate je treba pridobiti tako pri pozitivni kot pri negativni kontroli za novo serijo testnih epruvet **cobas**® Cdiff, ki jih je treba validirati na instrumentu. Dodatne kontrole je mogoče izvesti po postopku »Add Lot«. Podrobnosti so na voljo v poglavju »Izvajanje dodatnih kontrolnih postopkov« v navodilih za uporabo.

Notranja kontrola **cobas**® Liat® Cdiff je pakirana v vsaki testni epruveti **cobas**® Cdiff in se izvaja skupaj z vsakim vzorcem med celotnim potekom testa.

Pozitivna kontrola

Pozitivna kontrola **cobas**® Liat® Cdiff vsebuje nekužne plazmide DNA s tarčnim zaporedjem *C. difficile*. Pozitivna kontrola **cobas**® Liat® Cdiff potrdi integriteto reagentov v testni epruveti **cobas**® Cdiff in ustrezno delovanje analizatorja **cobas**® Liat. Če so rezultati pozitivne kontrole **cobas**® Liat® Cdiff pogosto neveljavni, se za tehnično pomoč obrnite na lokalnega predstavnika družbe Roche.

Negativna kontrola

Negativna kontrola **cobas**® Liat® ne vsebuje tarče in spremlja morebitno kontaminacijo tarče v delovnem procesu ali okolju. Če so rezultati negativne kontrole **cobas**® Liat® pogosto neveljavni, se za tehnično pomoč obrnite na lokalnega predstavnika družbe Roche.

Notranji nadzor

Notranja kontrola celotnega organizma (Bti) je vključena v testno epruveto in se samodejno doda vsem vzorcem na začetku priprave vzorca. Notranja kontrola **cobas**® Liat® Cdiff je kemično inaktivirana bakterija, ki je vključena v vsako testno epruveto **cobas**® Cdiff in se obdela skupaj z vsakim vzorcem. Notranja kontrola preverja ustrezno obdelavo tarčnih bakterij v vseh korakih testa ter spremlja prisotnost inhibitorjev pri pripravi vzorca in reakciji PCR. Notranja kontrola **cobas**® Liat® Cdiff mora biti pozitivna v negativnem vzorcu in je lahko negativna ali pozitivna v pozitivnem vzorcu Cdiff.

Razlaga rezultatov

Opomba: Validacijo vseh vzorcev in kontrolnih postopkov določi sistem cobas® Liat®.

Rezultati pri izvajanju postopka »Add Lot« (Dodaj serijo) so razloženi, kot je prikazano v Pregl. 7.

Pregl. 7. Razlaga rezultatov testov cobas® Cdiff pri izvajanju postopka »Add Lot« (Dodaj serijo)

Prikaz na analizatorju cobas® Liat®	Izpis in razlaga poročila o rezultatih
Negative Control Valid	Negative Control Valid Kontrola je negativna za prisotnost DNA <i>C. difficile</i> .
Negative Control Invalid. Repeat Run	Negative Control Invalid Rezultat je neveljaven. Negativno kontrolo je treba ponovno testirati, da bi dobili veljaven rezultat. Ponovite postopek.
Positive Control Valid	Positive Control Valid Kontrola je pozitivna za prisotnost DNA <i>C. difficile</i> .
Positive Control Invalid. Repeat Run	Positive Control Invalid Rezultat je neveljaven. Pozitivno kontrolo je treba ponovno testirati, da bi dobili veljaven rezultat. Ponovite postopek.

Rezultati vzorca so razloženi, kot je prikazano v Pregl. 8.

Pregl. 8. Razlaga rezultatov testov cobas® Cdiff pri testiranju kliničnega vzorca

Prikaz na analizatorju cobas® Liat®	Izpis in razlaga poročila o rezultatih
Cdiff Detected	Cdiff Detected Vzorec je pozitiven za prisotnost DNA <i>C. difficile</i> .
Cdiff Not Detected	Cdiff Not Detected* Vzorec je negativen za DNA <i>C. difficile</i> oziroma ta ne more biti zaznana, če je prisotna.
Assay Invalid	Assay Invalid** Rezultat je neveljaven. Izvirni vzorec je treba ponovno testirati, da bi dobili veljaven rezultat. Glejte »Predlagan postopek ponovnega testiranja«.
Assay Aborted by User	Assay Aborted by User Postopek je prekinil uporabnik. Izvirni vzorec je treba ponovno testirati, da bi dobili veljaven rezultat. Glejte »Predlagan postopek ponovnega testiranja«.
Assay Aborted by System	Assay Aborted by System Postopek je prekinil sistem. Izvirni vzorec je treba ponovno testirati, da bi dobili veljaven rezultat. Glejte »Predlagan postopek ponovnega testiranja«.

* Negativen rezultat ne izključuje prisotnosti DNA *C. difficile*, saj so rezultati odvisni od ustreznega odvzema vzorca, odsotnosti inhibitorjev in zadostne količine DNA, da bi jo bilo mogoče odkriti.

** Neveljavne rezultate lahko dobimo, če vzorec vsebuje odvečno blato ali moteče snovi, ki preprečujejo ekstrakcijo in/ali pomnoževanje ter detekcijo tarčnih nukleinskih kislin. Glejte »Postopkovne omejitve« za znane moteče snovi. Ne zadosten volumen vzorca lahko prav tako povzroči neveljavne rezultate. Minimalni volumen blata/suspenzije sredstva cobas® PCR Media, potrebnega za test cobas® Cdiff je 0,2 ml.

Rezultati pri izvajanju dodatnih kontrol po postopku »Add Lot« (Dodaj serijo) so razloženi, kot je prikazano v Pregl. 9 in Pregl. 10.

Pregl. 9. Razlaga rezultatov testa **cobas® Cdiff** pri izvajanju pozitivne kontrole

Prikaz na analizatorju cobas® Liat®	Izpis in razlaga poročila o rezultatih
Positive Control Valid	Positive Control Valid Kontrola je pozitivna za prisotnost DNA <i>C. difficile</i> .
Positive Control Invalid	Positive Control Invalid Rezultat je neveljaven. Pozitivno kontrolo je treba ponovno testirati, da bi dobili veljaven rezultat. Ponovite postopek.

Pregl. 10. Razlaga rezultatov testa **cobas® Cdiff** pri izvajanju negativne kontrole

Prikaz na analizatorju cobas® Liat®	Izpis in razlaga poročila o rezultatih
Negative Control Valid	Negative Control Valid Kontrola je negativna za prisotnost DNA <i>C. difficile</i> .
Negative Control Invalid	Negative Control Invalid Rezultat je neveljaven. Negativno kontrolo je treba ponovno testirati, da bi dobili veljaven rezultat. Ponovite postopek.

Predlagan postopek ponovnega testiranja

Neveljavne in neuspešne/prekinjene postopke lahko enkrat ponovite z uporabo istega sekundarnega vzorca. Če je ponovitev še vedno neveljavna, se lahko iz primarnega vzorca blata pripravi nov sekundarni vzorec. Če je to izvedljivo, pridobite nov primarni vzorec in ponovno opravite test **cobas® Cdiff**.

Omejitve postopka

- Test **cobas® Cdiff** je validiran samo za uporabo z neformiranimi ali delno formiranimi vzorci blata, ki so preneseni v epruveto s sredstvom **cobas® PCR Media** v skladu s tem dokumentom z navodili za uporabo (imenovanim tudi navodila za uporabo).
- Zanesljivi rezultati so odvisni od ustreznega odvzema, transporta, shranjevanja in obdelave vzorca. Upoštevajte postopke v tem dokumentu z navodili za uporabo testa **cobas® Cdiff** in uporabniškem vodniku za sistem **cobas® Liat®**.
- Odkrivanje DNA *C. difficile* je odvisno od števila organizmov, prisotnih v vzorcu, nanj pa lahko vplivajo metode odvzema/obdelave vzorca, zgodovina hospitalizacije, režim zdravljenja z antibiotiki in sevi *C. difficile*.
- Zaradi interference različnih snovi se lahko pojavijo lažno negativni ali neveljavni rezultati. Testu **cobas® Cdiff** je priložena interna kontrola za pomoč pri prepoznavanju vzorcev s snovmi, ki lahko motijo izolacijo nukleinskih kislin in pomnoževanje PCR. Znanе motnje med drugim vključujejo naslednje:
 - Vzorci, ki vsebujejo več kot 50 % (m/v) mucina, lahko dajo lažno negativne rezultate.
- Pozitiven rezultat kaže na prisotnost DNA *C. difficile* in ne nujno organizmov, ki so sposobni preživetja. Zato tega testa ni priporočljivo uporabljati za spremljanje zdravljenja ali kot test ozdravitve.
- Mutacije ali polimorfizmi v območjih vezave začetnega oligonukleotida ali sonde lahko vplivajo na odkrivanje novih ali neznanih različic, kar povzroči lažno negativen rezultat s testom **cobas® Cdiff**.
- Napovedna vrednost testa je odvisna od razširjenosti bolezni v posamezni populaciji.
- Uporaba tega izdelka mora biti omejena na osebe, usposobljene za uporabo sistema **cobas® Liat®**.

Ocena učinkovitosti

Analitska občutljivost

Analitska občutljivost (meja zaznavanja ali LoD) za test **cobas**® Cdiff je bila določena z analizo kvantificiranih kultur *C. difficile*, razredčenih na več ravni koncentracije v negativni suspenziji blata v sredstvu **cobas**® PCR Media. Vse ravni so bile testirane v treh ponovitvah, vsaka z dvema edinstvenima serijama testnih epruvet **cobas**® Cdiff. Najnižja raven s 100-odstotno stopnjo zadetkov je bila testirana z dodatnimi ponovitvami, da se potrdi raven LoD. Če je bila skupna stopnja zadetkov za to raven manjša od 95 %, je bila z dodatnimi ponovitvami testirana višja raven panela. Končna raven LoD je bila potrjena z vsaj 21 dodatnimi ponovitvami. LoD za ta test je opredeljena kot ciljna koncentracija, ki jo je mogoče zaznati kot pozitivno v ≥ 95 % testiranih ponovitev na podlagi rezultatov, pridobljenih z najslabšo serijo reagentov.

Rezultati študije analitske občutljivosti so prikazani v Pregl. 11.

Pregl. 11. Test **cobas**® Cdiff – LoD (meja zaznavanja)

ID seva	Toksinotip	Tip REA*	Tip PFG†	Ribotip	Fenotip	LoD (CFU/vzorec)
ATCC 43255 (VPI 10463)	0	N/A	N/A	87	A+B+CDT-	90
R12087 (CD196)	III	BI	NAP1	27	A+B+CDT+	45

* Restriksijska endonukleazna analiza. † Gelska elektroforeza v utripajočem polju.

Zaznavanje genotipov *C. difficile*

Meja zaznavanja testa **cobas**® Cdiff na 37 toksičnih sevih, ki predstavljajo dodatne toksinotipe, je bila preverjena s testiranjem treh ponovitev na sev pri trikratni stopnji LoD (270 CFU/vzorec) za ATCC 43255. Razredčitve in testni vzorci so bili pripravljeni na podoben način kot v zgoraj opisani študiji meje zaznavanja (LoD).

Vseh 37 toksičnih sevov (Pregl. 12) je bilo v tej študiji zaznanih kot 100-% pozitivnih, kar potrjuje, da lahko test **cobas**® Cdiff zazna te toksinotipe *C. difficile*.

Pregl. 12. Povzetek rezultatov preverjanja toksičnega *C. difficile*

	Sev Cdiff	Toksinotip	Ribotip	Stopnja zadetkov
1	ATCC# BAA-1382, 630	0	12	100,00 %
2	EX 623	I	102	100,00 %
3	AC 008	II	103	100,00 %
4	2004118, CDC-204118 (NAP-1)	III	27	100,00 %
5	SE 844	IIIa	80	100,00 %
6	CH6230	IIIc	N/A	100,00 %
7	P43	IV	N/A	100,00 %
8	55767	IV	23	100,00 %
9	2748-06	V	78	100,00 %
10	SE 881	V	45	100,00 %
11	SE 1203	VI	33	100,00 %
12	57267	VII	63	100,00 %
13	ATCC# 43598, 1470	VIII	17	100,00 %
14	51680	IX	19	100,00 %
15	CCUG 8864/STCC20309	X	36	100,00 %
16	F15	XII	N/A	100,00 %
17	IS 25	XII	56	100,00 %

	Sev Cdiff	Toksinotip	Ribotip	Stopnja zadetkov
18	R 9367	XIII	70	100,00 %
19	R 10870	XIV (novi XIVa)	111	100,00 %
20	R 9385	XV (novi XIVb)	122	100,00 %
21	SUC36	XVI	78	100,00 %
22	No 1313	XVII	232	100,00 %
23	K095	XVIII	14	100,00 %
24	TR13	XIX	N/A	100,00 %
25	TR14	XX	N/A	100,00 %
26	CH6223	XXI	N/A	100,00 %
27	CD07-468	XXII	N/A	100,00 %
28	8785	XXIII (novi IXc)	N/A	100,00 %
29	597B	XXIV	131	100,00 %
30	7325	XXV	27	100,00 %
31	7459	XXVI	N/A	100,00 %
32	KK2443/2006	XXVII	N/A	100,00 %
33	CD08-070	XXVIII	126	100,00 %
34	CD07-140	XXIX	56	100,00 %
35	ES 130	XXX	N/A	100,00 %
36	WA 151	XXXI	N/A	100,00 %
37	173070	XXXII	N/A	100,00 %

Natančnost

Izvedena je bila interna študija natančnosti s panelom, sestavljenim iz kulture *C. difficile* ATCC 43255, razredčenim v negativni suspenziji blata v sredstvu cobas® PCR Media do ravni koncentracije pod mejo zaznavanja (LoD), blizu LoD in nad LoD testa cobas® Cdiff. Preizkušena je bila tudi negativna raven, sestavljena samo iz negativne suspenzije blata v sredstvu cobas® PCR Media. V študiji so bile uporabljene tri edinstvene serije reagentov za teste cobas® Cdiff in šest instrumentov za skupno 192 testov v 12 dneh. Opis panelov natančnosti in povzetek študije je prikazan v Pregl. 13.

Analiza komponent variance (Pregl. 14) je pokazala, da je večina variabilnosti ciljnih vrednosti Ct posledica naključnih in instrumentalnih dejavnikov (67 % oziroma 32 %) pri koncentracijah na ravni ali okoli LoD. Pri koncentracijah nad LoD je večina variabilnosti vrednosti Ct posledica naključnih dejavnikov in dejavnikov med serijami (58 % oziroma 20 %). Rezultati (Pregl. 15) kažejo, da je skupni CV (%) ciljnih vrednosti Ct znašal 2,4 % za raven koncentracije pri LoD in 2,3 % za raven koncentracije nad LoD.

Pregl. 13. Notranja analiza pozitivne stopnje študije natančnosti

Enota panela	N testiranih	N pozitivnih	Stopnja pozitivnih	95 % CL	
				Zgornja	Spodnja
Negativno	48	0	0,0 %	0,0 %	7,4 %
< 1 × LoD	48	33	68,8 %	54,7 %	80,1 %
~1 × LoD	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
~3 × LoD	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %

LoD = meja zaznavanja

Pregl. 14. Analiza komponent variance Ct za enote panela natančnosti

Stopnja	Povprečni Ct	Komponente variance/odstotni prispevek k skupni vrednosti				Skupno
		Serija	Instrument	Dan	Naključno	
~1 × LoD	31,8	0,008	0,189	0	0,398	0,595
		1 %	32 %	0 %	67 %	100,00 %
~3 × LoD	30,3	0,097	0,049	0,055	0,274	0,476
		20 %	10 %	12 %	58 %	100,00 %

LoD = meja zaznavanja

Pregl. 15. Analiza standardnih odklonov Ct in koeficientov variacije (%) za enote panela natančnosti

Stopnja	Povprečni Ct	Komponente SD/odstotek CV				Skupno
		Serija	Instrument	Dan	Naključno	
~1 × LoD	31,8	0,089	0,434	0	0,631	0,771
		0,30 %	1,40 %	0 %	2,00 %	2,40 %
~3 × LoD	30,3	0,312	0,222	0,234	0,524	0,69
		1,00 %	0,70 %	0,80 %	1,70 %	2,30 %

LoD = meja zaznavanja

Analitska specifičnost

Za oceno analitske specifičnosti testa **cobas® Cdiff** so bili testirani naslednji paneli organizmov:

- 1) 118 bakterij, glivic in virusov, ki jih je mogoče najti v vzorcih blata, ter ena vrsta človeških celic (Pregl. 16)
- 2) 32 organizmov iz rodu *Clostridium*, vključno z netoksičnim *C. difficile* (Pregl. 17)

Analitska specifičnost za *Clostridium botulinum* je bila predvidena s programom BLAST proti bazi nukleotidnih zaporedij GenBank, da bi posnemali korak ustvarjanja amplikonov PCR.

Vse bakterije in človeške celice so bile dodane do 1×10^6 enot*/ml, vsi virusi pa do 1×10^5 enot*/ml ekvivalenta v matrici blata. Testiranje je bilo opravljeno s samimi organizmi ali z dvema toksičnima izolatoma *C. difficile*, ki sta bila prisotna posamezno, pri 3-kratni meji zaznavanja (LoD) **cobas® Cdiff**. Rezultati so pokazali, da nobeden od teh organizmov ni oviral odkrivanja predvidenih tarč Cdiff. Nobeden od njih ni dal lažno pozitivnih rezultatov, če ni bilo predvidene tarče *C. difficile*.

* Bakterije so bile kvantificirane v enotah, ki tvorijo kolonije (CFU)/ml, človeške celice so bile kvantificirane v celicah/ml, virusi pa v TCID₅₀/ml, razen *Chlamydia trachomatis*, ki je bila kvantificirana v IFU/ml.

Pregl. 16. Testirani mikroorganizmi in človeške celice

<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 35655	<i>Alcaligenes faecalis</i> podvr. <i>faecalis</i> ATCC 15554
<i>Alcaligenes faecalis</i> podvr. <i>faecalis</i> ATCC 8750	<i>Anaerococcus tetradius</i>	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13472	<i>Bacteroides caccae</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Bacteroides merdae</i>	<i>Bacteroides stercoris</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Campylobacter coli</i> ATCC 33559	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43479
<i>Campylobacter jejuni</i> podvr. <i>jejuni</i> ATCC 33292	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida catenulata</i>
<i>Cedecea davisae</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i> serotipa L2 LGVII454	<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 faecium</i> van A	<i>Enterococcus faecalis</i> van B
<i>Enterococcus gallinarum</i> van C	<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700927
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Escherichia hermannii</i>	<i>Fusobacterium varium</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Človeške celice HCT-15	<i>Helicobacter fennelliae</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> podvr. <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> ATCC 15313
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC BAA-839	<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> ATCC 25933
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	<i>Proteus penneri</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>
<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 35554
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 33584	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Ruminococcus bromii</i>
<i>Salmonella enterica</i> serotipa <i>Choleraesuis</i> ATCC 7001	<i>Salmonella enterica</i> podvr. <i>arizonae</i> ATCC 13314 (prej imenovana <i>Salmonella choleraesuis</i> podvr. <i>arizonae</i>)	<i>Salmonella enterica</i> podvr. <i>enterica</i> CMCC 1975
<i>Salmonella enterica</i> podvr. <i>enterica</i> serotipa <i>Typhi</i> ATCC 19430	<i>Salmonella enterica</i> podvr. <i>enterica</i> serotipa <i>Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Serratia liquefaciens</i> CMCC 169
<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC 27592	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100
<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</i> sp. sev V8 ATCC 12973	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Trabulsiella guamensis</i>
<i>Veillonella parvula</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Yersinia bercovieri</i>	<i>Yersinia rohdei</i>	Citomegalovirus (HHV5)
Humani adenovirus tipa 41	Humani virus Cocksackie A4	Humani virus Cocksackie B4
Humani ehovirus 11	Humani eterovirus 71	Humani rotavirus
Norovirus GII	-	-

Pregl. 17. Organizmi iz rodu *Clostridium*, vključno z netoksičnim *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> , serološka skupina B (netoksična)	<i>Clostridioides difficile</i> , serološka skupina I (netoksična)	<i>Clostridioides difficile</i> (ES 1103) (netoksičen tip Xla)**
<i>Clostridioides difficile</i> (6035/06) (netoksičen tip Xla)**	<i>Clostridioides difficile</i> (F14) (netoksičen tip Xlb)**	<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> (preimenovan v <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> ATCC 15579	<i>Clostridium sporogenes</i> CCRI 11128	<i>Clostridium symbiosum</i>
<i>Clostridium tertium</i>	<i>Clostridium tetani</i>	-

* Na osnovi analize programa BLAST.

** V to preglednico so vključeni trije netoksični sevi Cdiff (toksinotip XI), testirani med študijo vključitve, ki jih test **cobas**® Cdiff ni zaznal.

Interferenca

Osemintrideset pogosto uporabljenih zdravil ter maščoba v blatu, polna kri in mucin so bili testirani za morebitne učinke interference s testom **cobas**® Cdiff. Vse snovi so bile testirane v koncentracijah, ki so bile višje od tistih, za katere se lahko upravičeno pričakuje, da bodo zbrane z brisom v vzorcu blata. Količina moteče snovi je izražena kot koncentracija v primarnem vzorcu blata. Dva izolata *C. difficile* sta bila povečana na 3-kratno mejo zaznavanja (LoD) testa **cobas**® Cdiff in uporabljena kot tarči v testih. Pri eksogenih snoveh ni bilo opaziti interference. Pri fekalnih maščobah ni bilo opažene interference do 39 % (m/v), pri polni krvi ni bilo opažene interference do 100 % (m/v), pri mucinu pa ni bilo opažene interference do 50 % (m/v). Ti rezultati so povzeti v Pregl. 18.

Pregl. 18. Rezultati testiranja motečih snovi

Snov	Koncentracija
Fekalna maščoba	0,22–39 % (m/v)
Polna kri	100 % (m/v)
Mucin	50 % (m/v)
Aleve	100 % (m/v)
Mylanta	100 % (m/v)
Anusol	100 % (m/v)
Dulcolax	23 %* (m/v)
Odvajalo Equate	50 %* (m/v)
Hidrokortizon Equate	100 % (m/v)
Barijev sulfat E-Z-HD	100 % (m/v)
Fleet	100 % (m/v)
Glicerinske svečke	100 % (m/v)
Svečke Graval	100 % (m/v)
Kontracepcijsko sredstvo Gynol II	10 %* (m/v)
Imodium	100 % (m/v)
Kaopectate	100 % (m/v)
Gel K-Y	100 % (m/v)
Metronidazol	100 % (m/v)
Mikonazol	100 % (m/v)
Mineralno olje	100 % (m/v)
Krema Monistat	100 % (m/v)
Monistat Complete Care	100 % (m/v)
Mazilo z nistatinom	100 % (m/v)
Palmitinska kislina	100 % (m/v)
Pedia Lax	100 % (m/v)
Pepto Bismol	25 %* (m/v)
Nepozebnik	50 %* (m/v)
Krema za hemeroide s pripravkom H	100 % (m/v)
Mazilo za hemeroide s pripravkom H	100 % (m/v)
Dramamin	12,5 %* (m/v)
Sterična kislina	100 % (m/v)
Natrijev dokusat	100 % (m/v)
Tums	50 %* (m/v)
Rektalna suspenzija z mezalaminom	100 % (m/v)
Krema proti srbečici Vagisil	12,5 %* (m/v)
Vankomicin	100 % (m/v)
Vazelin	100 % (m/v)
Krema za sončenje	100 % (m/v)
Vaginalni vstavek Monistat	100 % (m/v)
Vaginalno kontracepcijsko mazilo	100 %
Spermicidni kondomi	100 %

Klinična učinkovitost z uporabo kliničnih vzorcev

Učinkovitost testa **cobas® Cdiff** je bila primerjana s komercialno dostopnim primerjalnim testom nukleinskih kislin (NAT), ki predstavlja zadnje stanje tehničnega razvoja, pri čemer je bilo kot referenčna metoda uporabljeno testiranje citotoksičnosti tkivnih kultur na izolatih *C. difficile* iz neposredne in obogatene kulture. Štiristo dvainštirideset prospektivno odvzetih vzorcev blata z dveh lokacij in 284 zamrznjenih arhiviranih vzorcev blata s petih lokacij je bilo testiranih s testom **cobas® Cdiff** in primerjalno metodo NAT. Drugi alikvot vzorcev je bil poslan v referenčni laboratorij za testiranje citotoksičnosti tkivnih kultur.

Test **cobas® Cdiff** in primerjalni test NAT, ki predstavlja zadnje stanje tehničnega razvoja, sta bila izvedena v skladu s proizvajalčevimi navodili. Preskus citotoksičnosti v tkivnih kulturah je bil opravljen z neposrednimi postopki in postopki obogatene kulture. Če povzamemo, vsak vzorec blata je bil najprej inokuliran na predhodno reducirani cikloserin-cefoksitin-fruktozni agar (CCFA-HT) in bujon CCMB TAL. Bujon CCMB TAL je bil inkubiran 48–72 ur in 5 dni subkultiviran na agarju Brucella pri 35 °C. Če je bilo kolonije *C. difficile* težko izolirati, so bili organizmi subkultivirani na agarju CCFA-VA. Sumljive kolonije so bile identificirane kot *C. difficile* z barvanjem po Gramu, aerotoleranco in testom Pro-Disk ter inokulirane v anaerobni bujon iz sesekljanega mesa. Supernatante, pridobljene iz anaerobnega bujona iz sesekljanega mesa, so bili nato obdelani za odkrivanje toksina B *C. difficile* z uporabo testa citotoksičnosti tkivnih kultur (test C. DIFFICILE TOX-B, Techlab).

S kombinirano direktno in obogateno kulturo je bilo pozitivnih 155 vzorcev *C. difficile* (prevalenca: 21,3 %). Učinkovitost testa **cobas® Cdiff** in primerjalnega testa NAT v primerjavi s kulturo je prikazana v Pregl. 19 do Pregl. 21. Prikazana je korelacija z rezultati neposredne kulture ter s kombiniranimi rezultati neposredne in obogatene kulture. »Kombinirani rezultati« pomenijo, da če je rezultat neposredne ali obogatene kulture pozitiven ali če sta oba pozitivna, se vzorec šteje za pozitivnega za kombinirani rezultat kulture. Šele če sta rezultata neposredne in obogatene kulture negativna, se vzorec šteje kot negativen za rezultat kombinirane kulture.

Korelacija testa **cobas® Cdiff** s kulturo

Učinkovitost testa **cobas® Cdiff** v primerjavi z neposredno kulturo ter kombinirana neposredna in obogatena kultura je prikazana v Pregl. 19 in Pregl. 20.

Pregl. 19. **cobas® Cdiff** v primerjavi z neposredno kulturo

		Neposredna kultura		
		Pozitivno	Negativno	Skupno
cobas® Cdiff	Pozitivno	129	21	150
	Negativno	9	567	576
	Skupno	138	588	726
Občutljivost	93,5 % (natančno 95-% 2-stranski interval zaupanja 88,1–96,5 %)			
Specifičnost	96,4 % (natančno 95-% 2-stranski interval zaupanja 94,6–97,7 %)			
Negativna napovedna vrednost	98,4 % (natančno 95-% 2-stranski interval zaupanja 97,1–99,3 %)			
Pozitivna napovedna vrednost	86,0 % (natančno 95-% 2-stranski interval zaupanja 79,5–90,7 %)			

Pregl. 20. cobas® Cdiff v primerjavi z neposredno in obogateno kulturo

		Neposredna in obogatena kultura		
		Pozitivno	Negativno	Skupno
cobas® Cdiff	Pozitivno	139	11	150
	Negativno	14	562	576
	Skupno	153	573	726
Občutljivost		90,8 % (natančno 95-% 2-stranski interval zaupanja 85,2–94,5 %)		
Specifičnost		98,1 % (natančno 95-% 2-stranski interval zaupanja 96,6–98,9 %)		
Negativna napovedna vrednost		97,6 % (natančno 95-% 2-stranski interval zaupanja 96,0–98,5 %)		
Pozitivna napovedna vrednost		92,7 % (natančno 95-% 2-stranski interval zaupanja 87,3–95,9 %)		

Korelacija testa cobas® Cdiff s primerjalnim testom NAT

Učinkovitost testa cobas® Cdiff v neposredni primerjavi s komercialno razpoložljivim primerjalnim testom NAT, ki predstavlja zadnje stanje tehničnega razvoja, je prikazana v Pregl. 21.

Pregl. 21. cobas® Cdiff v primerjavi s primerjalnim testom nukleinskih kislin (NAT)

		Primerjalni test NAT		
		Pozitivno	Negativno	Skupno
cobas® Cdiff	Pozitivno	145	5	150
	Negativno	6	570	576
	Skupno	151	575	726
Pozitivno ujemanje		96,0 % (natančno 95-% 2-stranski interval zaupanja 91,6–98,2 %)		
Negativno ujemanje		99,1 % (natančno 95-% 2-stranski interval zaupanja 98,0–99,6 %)		

Stopnja neveljavnosti

Stopnja neveljavnosti za test cobas® Cdiff je bila izračunana iz 978 rezultatov testiranja individualnih kliničnih vzorcev, kar vključuje 726 vzorcev v študiji korelacije. Dva izmed 978 testov sta imela neveljavna rezultata testa cobas® Cdiff. Po ponovnem testiranju je bil pri enem izmed dveh vzorcev rezultat veljaven, pri drugem pa je ostal neveljaven. Zato je bila začetna stopnja neveljavnih vzorcev za test cobas® Cdiff v tej skupini vzorcev 0,2 %, stopnja neveljavnih vzorcev pri ponovnem testiranju pa 0,1 %.

Kode napak

Naslednje kode napak, opisane v Pregl. 22, se lahko prikažejo v poročilu o rezultatih na podlagi razlage in postopka izračuna rezultata testa.

Pregl. 22. Kode in opredelitve napak

Koda napake	Vzorec	Negativna kontrola (Add Lot)	Pozitivna kontrola (Add Lot)
r0	Negativna ali neveljavna IC Ponovite postopek.	Negativna ali neveljavna IC Ponovite postopek.	Negativna ali neveljavna IC Ponovite postopek.
r1			
r3*			
r4			
x4**	Pozitiven Cdiff, medtem ko je IC negativna ali neveljavna Ponovite postopek.	N/A	Negativen ali neveljaven Cdiff in/ali IC Ponovite postopek.
FP	N/A	Pozitiven ali neveljaven Cdiff Ponovite postopek.	N/A
g0	N/A	N/A	Negativen ali neveljaven Cdiff Ponovite postopek.
g1			
g3			
g4			
x5	Volumen vzorca je prenizek.	Volumen vzorca je prenizek.	Volumen vzorca je prenizek.

Opomba*: Koda napake r3 se ne pojavi za pozitivno in negativno kontrolo.

Opomba**: Koda napake x4 se ne pojavi za pozitivno kontrolo (Add Lot). Pri pozitivni kontroli se lahko koda napake x4 sproži le, če pride do napake med dodatnimi pozitivnimi kontrolami po postopku »Add Lot« (glejte »Izvajanje dodatnih kontrolnih serij«).

Za dodatne informacije o napakah glejte veljavni uporabniški vodnik za sistem **cobas® Liat®**.

Dodatne informacije

Ključne lastnosti testa

Vrsta vzorca	Vzorci iz neformiranega blata
Potrebna količina vzorca	4,3 ml sredstva cobas ® PCR Media je priloženega vsakemu kompletu sredstva z eno palčko cobas ® PCR Media Uni Swab Sample Kit, za test cobas ® Cdiff pa je potrebnega najmanj 0,2 ml sredstva.
Trajanje testa	Rezultati so na voljo v ~20 minutah po vnosu vzorca v sistem.
Analitska občutljivost	Od 45 do 90 CFU/vzorec, odvisno od izolata
Specifičnost	Ni navzkrižne reaktivnosti s 149 tesno povezanimi organizmi ali organizmi, ki jih običajno najdemo v vzorcih blata
Vključenost	Vsi znani <i>C. difficile</i> (toksinotipi 0–XXXI, razen netoksičnih toksinotipov XI), vključno s hipervirulentnim epidemičnim sevom BI/NAP1/027

Simboli

Za označevanje diagnostičnih izdelkov za PCR družbe Roche se uporabljajo spodaj prikazani simboli.

Pregl. 23. Simboli, ki se uporabljajo za označevanje diagnostičnih izdelkov za PCR družbe Roche

Age/DOB	Starost ali datum rojstva		Pripomoček ni namenjen testiranju ob pacientu	QS IU/PCR	QS IU na reakcijo PCR, uporaba mednarodnih enot QS (IE) na reakcijo PCR pri izračunu rezultatov.
	Pomožna programska oprema		Pripomoček ni namenjen samotestiranju	SN	Serijska številka
Assigned Range [copies/mL]	Dodeljeno območje (kopije/mL)		Distributer (Opomba: Ustrezna država/regija je lahko označena pod simbolom.)	Site	Ustanova
Assigned Range [IU/mL]	Dodeljeno območje (IE/mL)		Ne uporabljajte ponovno	Procedure Standard	Standardni postopek
EC REP	Pooblaščen predstavnik v Evropski uniji		Ženska	STERILE EO	Sterilizirano z etilenoksidom
BARCODE	Podatkovni list s črtno kodo		Samo za ocenjevanje IVD učinkovitosti		Shranjujte v temnem prostoru
LOT	Koda serije	GTIN	Globalna trgovinska številka izdelka		Temperaturna omejitev
	Biološka tveganja		Uvoznik		Datoteka z opredelitvijo testa
REF	Referenčna številka	IVD	In vitro diagnostični medicinski pripomoček		Ta stran navzgor
	Oznaka skladnosti CE; ta pripomoček je skladen z veljavnimi zahtevami za oznako CE za in vitro diagnostični medicinski pripomoček	LLR	Spodnja meja dodeljenega območja	Procedure UltraSensitive	Ultrasenzitivni postopek
Collect Date	Datum odvzema		Moški	UDI	Edinstveni identifikator pripomočka
	Glejte navodila za uporabo		Proizvajalec	ULR	Zgornja meja dodeljenega območja
	Vsebina zadošča za <n> testov	CONTROL -	Negativna kontrola	Urine Fill Line	Linija za polnjenje urina
CONTENT	Vsebina kompleta		Nesterilno	Rx Only	Samo ZDA: Zvezni zakon dovoljuje prodajo in naročanje pripomočka samo zdravnikom.
CONTROL	Kontrola		Ime pacienta		Rok uporabnosti
	Datum proizvodnje		Številka pacienta		
	Pripomoček za testiranje ob pacientu		Odlepite tukaj		
	Pripomoček za samotestiranje	CONTROL +	Pozitivna kontrola		
		QS copies / PCR	Kopije QS na reakcijo PCR, uporaba kopij QS na reakcijo PCR pri izračunu rezultatov.		

Tehnična podpora

Za tehnično podporo (pomoč) se obrnite na lokalno podružnico:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Proizvajalec in uvoznik

Pregl. 24. Proizvajalec in uvoznik



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

Izdelano v ZDA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Blagovne znamke in patenti

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

Avtorska pravica

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Reference

1. Bartlett JG, Chang TW, Moon N, Onderdonk AB. Antibiotic-induced lethal enterocolitis in hamsters: studies with eleven agents and evidence to support the pathogenic role of toxin-producing Clostridia. *Am J Vet Res.* 1978;39(9):1525-1530.
2. Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. Clostridium difficile and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet.* 1978;1(8073):1063-1066.
3. Leffler D.A., Lamont J.T. Clostridium difficile Infection. *N Engl J Med* 2015; 372:1539-1548.
4. Bartlett J. G. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med.* 2002;346(5):334-9.
5. Vindigni S. M, Surawicz C. M. C. difficile Infection: Changing Epidemiology and Management Paradigms. *Clinical and Translational Gastroenterology.* 2015; 6, e99; doi:10.1038/ctg.2015.24.
6. Hensgens M. P., Keessen E. C., Squire M. M., Riley T. V., Koene M. G., de Boer E. Clostridium difficile infection in the community: a zoonotic disease? *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(7):635-45.
7. Kelly C. P., LaMont J. T. Clostridium difficile--more difficult than ever. *N Engl J Med.* 2008;359(18):1932-40.
8. Wolfhagen M. J., Torensma R., Fluit A. C., J Verhoef. Toxins A and B of Clostridium difficile. *FEMS Microbiol Rev.* 1994;13(1):59-64.
9. Johnson S., Sambol S. P., Brazier J. S., Delmee M., Avesani V., Merrigan M. International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile variants. *J Clin Microbiol.* 2003;41(4):1543-7.
10. Brecher S. M., Novak-Weekley S. M., E Nagy. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile infections: there is light at the end of the colon. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2013;57(8):1175-81.
11. Surawicz C. M., Brandt L. J., Binion D. G., Ananthakrishnan A. N., Curry S. R., H Gilligan P. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of Clostridium difficile infections. *The American journal of gastroenterology.* 2013;108(4):478-98; quiz 99.
12. Curry SR. Clostridium difficile. *Clinics in Laboratory Medicine.* June 2017; 37(2):341-6.
13. Sloan L. M., Duresko B. J., Gustafson D. R., Rosenblatt J. E. 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.
14. Deshpande A., Pasupuleti V., Rolston D. D., Jain A., Deshpande N., Pant C. 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.
15. Kufelnicka A. M., J Kirn T. Effective utilization of evolving methods for the laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis.* 2011;52(12):1451-7.
16. Tenover F. C., Baron E. J., Peterson L. R., H Persing D. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection can molecular amplification methods move us out of uncertainty? *J Mol Diagn.* 2011;13(6):573-82.
17. Peterson L. R., Mehta M. S., Patel P. A., Hacek D. M., Harazin M., Nagwekar P. Laboratory testing for Clostridium difficile infection: light at the end of the tunnel. *Am J Clin Pathol.* 2011;136(3):372-80.

18. Monaghan T., Boswell T., Mahida Y. Recent advances in Clostridium difficile-associated disease. Gut. 2008;57(6):850-60.
19. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene. 1990;93:125-128.
20. 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.
21. 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.

Revizije dokumenta

Informacije o revizijah dokumenta	
Doc Rev. 5.0 04/2024	Revidirano za zagotavljanje skladnosti z IVDR. Uskladitev in posodobitev referenc in postopkov v podporo programski opremi analizatorja cobas® Liat® 3.3. Posodobljene informacije o nevarnosti. Dodana je trditev o predvidenem uporabniku. Posodobljena preglednica 18 vključuje enote koncentracije in izključuje odvečne informacije. Posodobljen naslov razdelka Vključenost v naslov razdelka »Odkrivanje genotipov <i>C. difficile</i>«. Popravljen tipkarske napake in revizije splošnih pojasnil. Posodobljena stran z usklajenimi simboli. Posodobljen razdelek Blagovne znamke in patenti, vključno s povezavo. Dodane informacije glede opisa in uporabe kompletov pipet za prenos cobas® Liat® (12 pipet/paket, kat. št. 09329676001) Z morebitnimi vprašanji se obrnite na svojega lokalnega predstavnika družbe Roche.
Doc Rev. 6.0 07/2024	Posodobljene informacije o nevarnosti za test cobas® Cdiff. Posodobljeno za blagovno znamko cobas®. Posodobljena stran z usklajenimi simboli. Posodobljena izjava pristojnega organa. Odstranjena oznaka Rx samo s prve strani. Z morebitnimi vprašanji se obrnite na svojega lokalnega predstavnika družbe Roche.