

cobas[®] Cdiff Test

per l'utilizzo con il sistema cobas[®] 4800

Per uso diagnostico *in vitro*



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

INDICE GENERALE

Uso previsto	4
Riassunto e spiegazione del test / Principi della procedura	4
Premessa: screening del batterio <i>C. difficile</i>	4
Spiegazione del test	5
Principi della procedura	5
Preparazione del campione	5
Amplificazione mediante PCR e rilevazione con TaqMan®	5
Amplificazione selettiva	6
Materiali, reagenti e campioni	7
Materiali e reagenti forniti	7
Conservazione e gestione dei reagenti	12
Materiali aggiuntivi necessari	13
Materiali opzionali	13
Strumentazione e software necessari ma non forniti	13
Precauzioni e requisiti per l'uso	14
Avvertimenti e precauzioni	14
Buone pratiche di laboratorio	14
Contaminazione	15
Integrità	15
Smaltimento	15
Fuoriuscite e pulizia	15
Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni	16
Prelievo dei campioni	16
Conservazione e stabilità dei campioni durante il trasporto	16
Procedura del test	17
Esecuzione del test	17
Flusso di lavoro	17
Istruzioni per l'uso	17

Risultati	21
Controllo di qualità e validità dei risultati	21
Controllo Positivo	21
Controllo Negativo	21
Controllo Interno	21
Interpretazione dei risultati	22
Elenco dei flag dei risultati	23
Limiti della procedura	23
Valutazione delle prestazioni non cliniche	25
Sensibilità analitica	25
Identificazione dei genotipi di <i>C. difficile</i>	25
Precisione	27
Specificità analitica	28
Interferenze	30
Prestazioni cliniche con i campioni clinici	32
Informazioni supplementari	34
Caratteristiche specifiche del saggio	34
Simboli	35
Assistenza tecnica	36
Produttore e importatore	36
Marchi e brevetti	36
Copyright	36
Bibliografia	37
Revisione del documento	39

Uso previsto

Il test **cobas®** Cdiff eseguito sul sistema **cobas®** 4800 è un test diagnostico qualitativo *in vitro* automatizzato che utilizza la reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*: PCR) per la determinazione diretta del gene della tossina B (*tcdB*) di *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) tossinogenico nei campioni di feci informi (liquide o molli) ottenuti da pazienti con sospetta infezione da *C. difficile* (CDI). Il test **cobas®** Cdiff è da intendersi come ausilio per la diagnosi di CDI negli esseri umani, in associazione con i fattori di rischio clinici ed epidemiologici.

Riassunto e spiegazione del test / Principi della procedura

Premessa: screening del batterio *C. difficile*

Il *Clostridium difficile* è un bacillo Gram-positivo anaerobio e sporigeno che, alla fine degli anni '70, venne identificato come agente eziologico della colite pseudomembranosa, o colite associata ad antibiotici.^{1,2} È ritenuto responsabile del 15-20% dei casi di diarrea associata all'uso di antibiotici e alla quasi totalità dei casi di colite pseudomembranosa associata all'uso di antibiotici.³ Nell'ultimo decennio l'incidenza dell'infezione da *C. difficile* (CDI) è aumentata progressivamente, ponendo un problema clinico di una certa rilevanza nei Paesi sviluppati. Negli ospedali per acuti, negli Stati Uniti, i tassi di incidenza erano compresi tra 30 e 40 casi su una popolazione di 100.000 degenti, ma nel 2005 l'incidenza è salita a oltre 80 casi su 100.000.⁴ In precedenza esistevano già riscontri di epidemie di CDI.⁵ Il costo diretto associato alla CDI era di 6.326 dollari USA per caso.⁶

L'aumento dell'incidenza è stato in parte spiegato dalla comparsa di un ceppo presumibilmente ipervirulento, classificato come ribotipo 027/pulsotipo nordamericano 1 (NAP1) e tossinotipo III. I ceppi tossigeni di *C. difficile* producono in genere due tossine: la tossina A (una enterotossina) e la tossina B (una citotossina).⁷ Una piccola percentuale di ceppi produce soltanto la tossina B.⁸

Di recente è stato osservato un aumento della virulenza nei ceppi che producono un'altra tossina, denominata tossina binaria, portatrice di una delezione nel gene regolatore negativo *tcdC*.^{9,10} Questi ultimi ceppi hanno esibito una maggiore virulenza *in vitro* e sembrano essere la causa di maggiore morbilità e mortalità negli esseri umani.^{11,12}

Dopo la colonizzazione con *C. difficile* tossigeno, i pazienti possono diventare portatori asintomatici o sviluppare la patologia del colon. Le manifestazioni cliniche di CDI possono variare da diarrea lieve-moderata a colite pseudomembranosa con esito potenzialmente mortale, caratterizzata da forti dolori addominali, diarrea abbondante e sintomi sistemici quali febbre, anoressia, nausea e malessere.

La diagnosi di CDI solitamente si fonda sulla dimostrazione della presenza delle tossine A e/o B nei campioni di feci. La dimostrazione dell'effetto citopatico su un monostrato cellulare, dovuto all'azione della tossina B, è considerata da molti la "prova del nove".^{13, 14} È possibile dimostrare l'effetto citopatico attraverso l'incubazione diretta del sopranatante fecale sul monostrato cellulare o; in alternativa, facendo crescere isolati di *C. difficile* in brodo selettivo e ottenendo così il sopranatante da sottoporre poi a incubazione sul monostrato cellulare (coltura tossigena).¹⁵ Entrambe queste tecniche consentono di ottenere un risultato definitivo in 48-72 ore almeno. Gli immunodosaggi per la ricerca delle tossine A e B sono ampiamente utilizzati perché generano risultati positivi in meno di 4 ore, tuttavia la sensibilità di questi test è notevolmente inferiore a quella della coltura tissutale.¹⁶ Rispetto ai criteri clinici a sostegno della CDI, la PCR ha dimostrato una sensibilità, una specificità e valori predittivi positivi e negativi rispettivamente del 93,3%, 97,4%, 75,5%, e 99,4% e l'ottenimento dei risultati in meno di 4 ore.¹⁵

La PCR è il test rapido ottimale per la determinazione della tossina di *C. difficile* con un test singolo.¹⁷⁻²⁰ Nonostante l'aumento significativo dell'incidenza e del livello di severità della CDI, il metronidazolo o la vancomicina continuano ad essere la prima scelta per il trattamento farmacologico degli episodi acuti e delle infezioni ricorrenti.²¹

Le misure per il controllo dell'infezione includono l'uso prudente degli antimicrobici, la prevenzione delle infezioni crociate e la sorveglianza attiva dei casi.²² Eseguire ripetuti test per verificare il successo della cura non è consigliato, in quanto la presenza delle tossine potrebbe protrarsi nel tempo senza che vi siano manifestazioni di sintomi clinici.

Di conseguenza c'è bisogno di un sistema di rilevazione rapida e automatica del *C. difficile*. Potenzialmente i test molecolari possono abbreviare in modo significativo i tempi di identificazione dell'infezione e consentire l'attuazione immediata di una terapia antimicrobica e l'adozione tempestiva delle misure opportune per il controllo dell'infezione.¹⁷⁻²⁰

Spiegazione del test

Il test **cobas®** Cdiff si basa su due procedure principali: (1) preparazione automatica dei campioni per estrarre gli acidi nucleici dai campioni di feci informi; (2) amplificazione mediante PCR delle sequenze di DNA target utilizzando primer specifici per *C. difficile* e rilevazione real-time delle sonde di rilevazione oligonucleotidiche fluorescenti scisse, specifiche per *C. difficile*. Durante la procedura di preparazione automatica, a tutti i campioni viene aggiunto un controllo interno contenente una sequenza di DNA randomizzata non correlata. Il controllo interno viene sottoposto ad amplificazione e rilevazione insieme ad ogni campione a scopo di verifica della regolarità della procedura.

Principi della procedura

Preparazione del campione

La preparazione dei campioni per il test **cobas®** Cdiff avviene in modo automatico sullo strumento **cobas® x 480**. Gli organismi vengono lisati con agente caotropico, proteinasi K e reagenti SDS. Gli acidi nucleici liberati, insieme al DNA del controllo interno aggiunto, formano legami con le biglie magnetiche. Vengono sottoposti a lavaggio ed eluizione in un piccolo volume di tampone. Lo strumento preleva un'aliquota del materiale eluito e prepara la reazione PCR con un reagente Master Mix attivato.

Amplificazione mediante PCR e rilevazione con TaqMan®

Le fasi del ciclo PCR e la rilevazione del segnale target si svolgono sull'analizzatore **cobas® z 480**. Il reagente Master Mix contiene coppie di primer e sonde specifiche per due target: la tossina B e il controllo interno. Se sono presenti sequenze dell'acido nucleico target, l'amplificazione con i primer corrispondenti viene avviata da una DNA polimerasi termostabile e vengono generati i prodotti della PCR (amplicone). Questi prodotti vengono riconosciuti da sonde TaqMan specifiche, che contengono un colorante fluorescente e un quencher. In condizioni normali il quencher sopprime la fluorescenza del colorante. Tuttavia se è presente il prodotto della PCR, la sonda ibridizza con il prodotto e viene scissa dall'attività di esonucleasi 5' > 3' della polimerasi. Questa reazione determina l'emissione di fluorescenza dal colorante. Il segnale viene registrato in tempo reale durante ogni ciclo di PCR dall'analizzatore **cobas® z 480**. Il segnale viene interpretato dal software del sistema **cobas® 4800** e refertato come risultato finale.

Amplificazione selettiva

Per ottenere l'amplificazione selettiva dell'acido nucleico target dal campione, il test **cobas**® Cdiff si avvale dell'azione dell'enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) e del trifosfato di deossiuridina (dUTP). L'enzima AmpErase riconosce e catalizza la reazione di distruzione dei filamenti di DNA contenenti deossiuridina²³ ma non del DNA contenente deossitimidina. La deossiuridina non è presente nel DNA naturale, ma è sempre presente nell'amplicone perché il trifosfato di deossiuridina è uno dei dNTP utilizzati nel reagente Master Mix e, di conseguenza, soltanto l'amplicone contiene deossiuridina. La deossiuridina rende l'amplicone contaminante suscettibile alla distruzione da parte dell'enzima AmpErase prima dell'amplificazione del DNA target. L'enzima AmpErase contenuto nel reagente Master Mix catalizza la scissione del DNA contenente deossiuridina in corrispondenza dei residui di deossiuridina, aprendo la catena di deossiribosio nella posizione C1. Quando viene riscaldata nella prima fase del ciclo termico (pH alcalino del reagente Master Mix), la catena del DNA amplicone si spezza in corrispondenza della posizione della deossiuridina, rendendo il DNA non amplificabile. L'AmpErase è inattivo a temperature superiori a 55°C (cioè durante tutte le fasi del ciclo termico) e di conseguenza non distrugge l'amplicone target. È dimostrato che il test **cobas**® Cdiff rende inattive almeno 1000 copie dell'amplicone *C. difficile* contenente deossiuridina ad ogni ciclo di PCR.

Materiali, reagenti e campioni

Materiali e reagenti forniti

Kit/Cassette	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per test	Simbolo di sicurezza e avvertimento
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Kit di preparazione dei campioni per il sistema cobas® 4800) 240 test (P/N: 05235782190)	MGP (Biglie magnetiche per il sistema cobas® 4800) Biglie magnetiche 93% Isopropanolo	10 × 4,5 ml	 PERICOLO H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili. H319 Provoca grave irritazione oculare. H336 Può provocare sonnolenza o vertigini. P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare. P233 Tenere il recipiente ben chiuso. P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. P280 Indossare guanti/Proteggere gli occhi/il viso. P303 + P361 + P353 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia. P370 + P378 In caso di incendio: estinguere con sabbia asciutta, polvere chimica secca o schiuma resistente all'alcol.
	EB (Tampone di eluizione per il sistema cobas® 4800) Tampone Tris 0,09% Sodio azide	10 × 18 ml	N/D

Kit/Cassette	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per test	Simbolo di sicurezza e avvertimento
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Kit di preparazione dei campioni per il sistema cobas® 4800) 960 test (P/N: 05235804190)	MGP (Biglie magnetiche per il sistema cobas® 4800) Biglie magnetiche 93% Isopropanolo	10 x 13,5 ml	 PERICOLO H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili. H319 Provoca grave irritazione oculare. H336 Può provocare sonnolenza o vertigini. P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare. P233 Tenere il recipiente ben chiuso. P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. P280 Indossare guanti/Proteggere gli occhi/il viso. P303 + P361 + P353 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia. P370 + P378 In caso di incendio: estinguere con sabbia asciutta, polvere chimica secca o schiuma resistente all'alcol.
	EB (Tampone di eluizione per il sistema cobas® 4800) Tampone Tris 0,09% Sodio azide	10 x 18 ml	N/D

Kit/Cassette	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per test	Simbolo di sicurezza e avvertimento
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Kit di lisi 1 per il sistema cobas® 4800) 240 test (P/N: 06768253190)	LYS-1 (Tampone di lisi 1 per il sistema cobas® 4800) Citrato di sodio 5% Polidocanolo 42,6% Tiocianato di guanidinio Ditiotreitolo	10 × 10 ml	 PERICOLO H302 + H332 Nocivo se ingerito o inalato. H317 Può provocare una reazione allergica cutanea. H318 Provoca gravi lesioni oculari. H334 Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato. H412 Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. EUH032 A contatto con acidi libera gas molto tossici. P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. P280 Indossare guanti/Proteggere gli occhi/il viso. P284 Indossare un apparecchio di protezione respiratoria. P304 + P340 + P312 IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. P305 + P351 + P338 + P310 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P342 + P311 In caso di sintomi respiratori: Contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.
	PK (Proteinasi K per il sistema cobas® 4800) Tampone Tris EDTA Cloruro di calcio Acetato di calcio < 2,0% Proteinasi K Glicerolo	10 × 0,9 ml	
	SDS Reagente SDS per il sistema cobas® 4800) Tampone Tris Dodecil solfato di sodio 0,09% Sodio azide	10 × 3 ml	

Kit/Cassette	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per test	Simbolo di sicurezza e avvertimento
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Kit di lisi 1 per il sistema cobas® 4800) 960 test (P/N: 06768270190)	LYS-1 (Tampone di lisi 1 per il sistema cobas® 4800) Citrato di sodio 5% Polidocanolo 42,6% Tiocianato di guanidinio Ditiotreitolo	10 × 36 ml	 PERICOLO H302 + H332 Nocivo se ingerito o inalato. H317 Può provocare una reazione allergica cutanea. H318 Provoca gravi lesioni oculari. H334 Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato. H412 Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. EUH032 A contatto con acidi libera gas molto tossici. P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. P280 Indossare guanti/Proteggere gli occhi/il viso. P284 Indossare un apparecchio di protezione respiratoria. P304 + P340 + P312 IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. P305 + P351 + P338 + P310 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P342 + P311 In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.
	PK (Proteinasi K per il sistema cobas® 4800) Tampone Tris EDTA Cloruro di calcio Acetato di calcio < 2,0% Proteinasi K Glicerolo	20 × 1,2 ml	
	SDS Reagente SDS per il sistema cobas® 4800) Tampone Tris Dodecil solfato di sodio 0,09% Sodio azide	10 × 9 ml	

Kit/Cassette	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per test	Simbolo di sicurezza e avvertimento
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Kit del tampone di lavaggio per il sistema cobas® 4800) 240 test (P/N: 05235863190)	WB (Tampone di lavaggio per il sistema cobas® 4800) Citrato di sodio diidrato 0,05% N-Metilisotiazolone-HCl	10 × 55 ml	N/D
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Kit del tampone di lavaggio per il sistema cobas® 4800) 960 test (P/N: 05235871190)	WB (Tampone di lavaggio per il sistema cobas® 4800) Citrato di sodio diidrato 0,05% N-Metilisotiazolone-HCl	10 × 200 ml	N/D
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 (Kit di controllo interno 1 per il sistema cobas® 4800) 20 sedute (P/N: 06768318190)	IC-1 (Controllo interno 1 per il sistema cobas® 4800) Tampone Tris EDTA < 0,01% Poly rA RNA (sintetico) 0,05% Sodio azide < 0,01% DNA del controllo interno sintetico, non infettivo, incapsulato in proteina di rivestimento batteriofago Lambda	20 × 0,5 ml	N/D
cobas® 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit (Kit di amplificazione/ rilevazione cobas® 4800 Cdiff) 80 test (P/N: 06768237190)	Cdiff MMX (Master Mix cobas® Cdiff) Tampone tricina EDTA DMSO Acetato di potassio Idrossido di potassio Tween 20 < 0,19% dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0,01% Primer upstream e downstream <i>C. difficile</i> e IC < 0,01% Sonde fluorescenti per <i>C. difficile</i> e sonde fluorescenti per IC < 0,01% Aptamero oligonucleotidico < 0,01% DNA polimerasi Z05 (batterica) < 0,02% Enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (batterico) 0,09% Sodio azide	10 × 0,3 ml	N/D

Kit/Cassette	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per test	Simbolo di sicurezza e avvertimento
cobas® 4800 Cdiff Controls and Cofactor Kit (Kit di controllo e cofattore cobas® 4800 Cdiff) 10 sedute (P/N: 06768300190)	Cdiff (+) C (Controllo positivo cobas® Cdiff) Tampone Tris EDTA < 0,01% Poly rA RNA (sintetico) 0,05% Sodio azide < 0,01% DNA plasmidico non infettivo (batterico) contenente una sequenza di <i>C. difficile</i>	10 × 0,5 ml	N/D
	(-) C (Controllo negativo cobas® 4800) Tampone Tris EDTA 0,05% Sodio azide < 0,01% Poly rA RNA (sintetico)	10 × 0,5 ml	N/D
	Cofactor-3 (Cofattore-3 cobas® 4800) Acetato di manganese Acetato di magnesio Albumina di siero bovino da plasma bovino di origine USA 0,09% Sodio azide	10 × 1,7 ml	N/D

Conservazione e gestione dei reagenti

Reagente	Temperatura di conservazione	Tempo di conservazione
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Kit di preparazione dei campioni per il sistema cobas® 4800)	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Kit di lisi 1 per il sistema cobas® 4800)	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 (Kit di controllo interno 1 per il sistema cobas® 4800)	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® 4800 Cdiff Amplification/Detection Kit (Kit di amplificazione/rilevazione cobas® 4800 Cdiff)	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® 4800 Cdiff Controls and Cofactor Kit (Kit di controllo e cofattore cobas® 4800 Cdiff)	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Kit del tampone di lavaggio per il sistema cobas® 4800)	15-25°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata

Nota: Non congelare i reagenti.

La data di scadenza del reagente è basata sul tempo coordinato universale (UTC). L'ora locale della scadenza del reagente può discostarsi di ±12 ore, a seconda del fuso orario locale in relazione all'UTC.

Materiali aggiuntivi necessari

Materiali	P/N
Puntali CORE da 1000 µl, rack da 96	04639642001
Vaschetta per reagenti da 50 ml	05232732001
Vaschetta per reagenti da 200 ml	05232759001
Piastra di estrazione (a pozzetti profondi) per il sistema cobas® 4800	05232716001
Piastra per PCR (a micropozzetti) da 0,3 ml e pellicola adesiva per il sistema cobas® 4800	05232724001
Applicatore per pellicola adesiva	04900383001
Rack da 24 posizioni	04639502001
Sacchetto per rifiuti solidi	05530873001 (piccolo) o 04691989001 (grande)
Manica di smaltimento in plastica Hamilton STAR	04639669001
cobas® PCR Media and Swab Sample Kit	07051891190
cobas® PCR Media Uni Swab Sample Kit	07958030190
Guanti monouso, senza talco	È ammesso l'uso di guanti senza talco monouso di qualsiasi marca.
Miscelatore vortex (monoprovetta)	È ammesso l'uso di un miscelatore vortex di qualsiasi marca.
Centrifuga dotata di cestello basculante con RCF minimo di 1500	È ammesso l'uso di una centrifuga di qualsiasi marca.

Per maggiori informazioni sui prodotti venduti separatamente, rivolgersi al rappresentante Roche locale.

Materiali opzionali

Materiali	P/N
Copertura o coperchio per piastre a pozzetti profondi	Roche 04789288001 o Hamilton 6474-01
Tappi, colore neutro (per ritappare i campioni dopo la seduta)	Roche P/N 07958056190 per ritappare dopo l'analisi i campioni contenuti nei tubi da 13 ml a fondo tondo

Per maggiori informazioni sui materiali opzionali, rivolgersi al rappresentante Roche locale.

Strumentazione e software necessari ma non forniti

Strumentazione e software necessari, non forniti
Sistema cobas® 4800 Strumento cobas® x 480 Analizzatore cobas® z 480 Unità di controllo
Software cobas® Cdiff AP versione 1.0.1 o successiva per il sistema cobas® 4800
Software di applicazione (Core) versione 2.2.0 o successiva per il sistema cobas® 4800

Per maggiori informazioni sui prodotti venduti separatamente, rivolgersi al rappresentante Roche locale.

Precauzioni e requisiti per l'uso

Avvertimenti e precauzioni

Com'è auspicabile per qualsiasi procedura di analisi, per lo svolgimento di questo test è necessario attenersi alla buona pratica di laboratorio. Data l'elevata sensibilità analitica di questo test, prestare attenzione affinché i reagenti, i campioni e le miscele di amplificazione siano esenti da contaminazioni.

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Evitare la contaminazione dei reagenti e dei campioni con batteri e DNA.
- Le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) sono disponibili su richiesta presso la sede Roche locale.
- Il reagente LYS-1 contiene guanidina tiocianato. Impedire il contatto diretto tra la guanidina tiocianato e l'ipoclorito di sodio (candeggina) o altri reagenti fortemente reattivi, ad esempio acidi o basici. Queste miscele possono rilasciare un gas nocivo.
- Il reagente MGP contiene isopropanolo ed è facilmente infiammabile. Tenere al riparo da fiamme libere e da ambienti dove si possono verificare scintille.
- Impedire che il reagente MGP sia esposto a fonti di campi magnetici.
- I reagenti EB, Cdiff MMX, SDS, Cofactor-3, (-)C, Cdiff (+)C e IC-1 contengono sodio azide.
- Per ulteriori avvertimenti, precauzioni e procedure volte a ridurre il rischio di contaminazione per il **cobas® x 480** instrument o il **cobas® z 480** analyzer, consultare l'Assistenza Utente del **cobas® 4800** System. In caso di sospetta contaminazione, eseguire la pulizia e la manutenzione settimanale seguendo le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del **cobas® 4800** System.
- Qualora dovessero verificarsi incidenti gravi durante l'uso di questo test, inviare una segnalazione all'autorità competente locale e al produttore.

Nota: per istruzioni specifiche, vedere la sezione “Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni”.

Buone pratiche di laboratorio

- Non pipettare con la bocca.
- Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro del laboratorio.
- Dopo avere manipolato i campioni e i reagenti del kit, lavarsi accuratamente le mani.
- Durante la manipolazione dei reagenti, indossare camici da laboratorio, guanti monouso e una protezione adeguata per gli occhi. Evitare il contatto di questi materiali con la pelle, gli occhi o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua. Intervenire tempestivamente per prevenire possibili ustioni. In caso di fuoriuscita del reagente, diluire il liquido con acqua prima di asciugare.
- Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro del laboratorio con una soluzione fresca a base di ipoclorito di sodio al 0,5% e acqua deionizzata o distillata (candeggina per uso domestico diluita 1:10). Successivamente pulire la superficie con etanolo al 70%.

Contaminazione

- Per evitare contaminazioni è necessario indossare i guanti, che dovranno essere sostituiti dopo avere manipolato i campioni e prima di utilizzare i reagenti **cobas®** Cdiff. Evitare di contaminare i guanti durante la manipolazione dei campioni e dei controlli. Indossare guanti, camici da laboratorio e protezioni per gli occhi durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti del kit.
- Evitare la contaminazione dei reagenti con batteri e ribonucleasi.
- Potrebbero essere generati risultati falsi positivi senza un'adeguata prevenzione del carryover durante la manipolazione dei campioni.
- I campioni devono essere manipolati come se fossero infettivi, adottando le procedure di sicurezza del laboratorio delineate in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*²⁴ e nel documento CLSI M29-A4.²⁵

Integrità

- Non utilizzare i kit dopo le date di scadenza.
- Non combinare i reagenti.
- Non utilizzare i materiali di consumo dopo la data di scadenza.
- Non utilizzare reagenti o contenitori visibilmente danneggiati o con segni di perdite.
- Tutti i materiali di consumo sono monouso. Non riutilizzare.
- La manutenzione di tutte le apparecchiature deve essere conforme alle istruzioni fornite dal produttore.

Smaltimento

- I reagenti **cobas®** 4800 e i reagenti specifici del test **cobas®** Cdiff contengono sodio azide (vedere **“Avvertimenti e precauzioni”**). La sodio azide può reagire con le tubature di piombo e rame formando azidi metallici altamente esplosivi. Quando le soluzioni contenenti sodio azide vengono smaltite nei lavelli del laboratorio, è necessario sciacquare gli scarichi con abbondante acqua fredda per impedire l'accumulo di azidi.
- Smaltire i reagenti inutilizzati e i materiali di scarto nel rispetto delle leggi vigenti.

Nota: per lo smaltimento dei rifiuti liquidi, consultare l'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System**.

Fuoriuscite e pulizia

- Il reagente LYS-1 contiene guanidina tiocianato. In caso di fuoriuscita di liquido contenente guanidina tiocianato, pulire con acqua e un detergente da laboratorio idoneo. Se il liquido fuoriuscito contiene agenti potenzialmente infettivi, pulire la superficie interessata PRIMA con acqua e un detergente da laboratorio e poi con ipoclorito di sodio allo 0,5%.
- Se fuoriesce un liquido sul **cobas®** 4800 instrument, pulire attenendosi alle istruzioni contenute nell'Assistenza Utente - **cobas®** 4800 System.
- Non utilizzare una soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina) per pulire lo strumento **cobas® x 480** o l'analizzatore **cobas® z 480**. Pulire il **cobas® x 480** instrument o il **cobas® z 480** analyzer attenendosi alle procedure descritte nell'Assistenza Utente del **cobas®** 4800 System appropriato.

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

Nota: manipolare tutti i campioni come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.

Prelievo dei campioni

Raccogliere i campioni di feci informi in un contenitore sterile. La raccolta dei campioni deve avvenire nel rispetto delle procedure operative standard approvate dalla propria organizzazione.

Conservazione e stabilità dei campioni durante il trasporto

I campioni di feci informi sono stabili a 2-30°C per 2 giorni, o a 2-8°C per 7 giorni, o a -20°C sono stabili per 60 giorni prima dello svolgimento del test sul sistema **cobas**® 4800 (la stabilità è stata dimostrata eseguendo i test sui campioni dopo un periodo ininterrotto di conservazione a 30°C ± 1°C per 2 giorni, seguito da un periodo di conservazione a 2-8°C per 5 giorni, seguito da un periodo di conservazione a -20°C per 60 giorni).

I campioni di feci in terreno di trasporto **cobas**® PCR Media sono stabili a 2-8°C per 60 giorni o a 30°C per 7 giorni prima dello svolgimento del test sul sistema **cobas**® 4800.

Il trasporto dei campioni di *C. difficile* deve avvenire nel rispetto di tutti i regolamenti locali, regionali e nazionali per il trasporto di agenti eziologici.

Procedura del test

Esecuzione del test

Flusso di lavoro

Figura 1. Flusso di lavoro **cobas®** Cdiff

1	Avviare il sistema.
2	Eseguire la manutenzione dello strumento.
3	Prendere i campioni e i reagenti dal luogo in cui sono conservati.
4	Avviare la seduta: • Caricare i rack con i campioni.
5	Con sistema LIS: confermare il work order Senza sistema LIS: creare il work order
6	Caricare il materiale di consumo (piastra di estrazione, piastra per PCR, rack per puntali) e reagenti
7	Avviare la seduta per la preparazione dei campioni
8	Scaricare e coprire la piastra per PCR
9	Rimuovere i campioni, i reagenti usati e la piastra di estrazione.
10	Caricare la piastra per PCR sull'analizzatore
11	Rivedere i risultati
12	Con sistema LIS: inviare i risultati al sistema LIS
13	Scaricare tutto il materiale dall'analizzatore

Istruzioni per l'uso

Tutti i reagenti, ad eccezione di Cdiff MMX e Cofactor-3, devono raggiungere la temperatura ambiente prima di essere caricati sullo strumento **cobas® x 480**. I reagenti Cdiff MMX e Cofactor-3 possono essere prelevati direttamente dal luogo in cui sono conservati a 2-8°C, in quanto potranno raggiungere la temperatura ambiente sullo strumento **cobas® x 480** prima del loro utilizzo nella seduta.

Nota: per istruzioni operative dettagliate, consultare l'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System**.

Dimensioni della seduta

Il sistema **cobas® 4800** è progettato per supportare sedute di batch misti con i test **cobas®** MRSA/SA, **cobas®** Cdiff e **cobas®** HSV 1 e 2. Il kit generico **cobas® 4800 System Sample Preparation Kit**, il kit generico **cobas® 4800 System Lysis Kit 1** e il kit generico **cobas® 4800 System Wash Buffer Kit** sono disponibili in due formati, ognuno sufficiente per 10 sedute da 24 o 96 campioni al massimo, compresi i controlli e i campioni di analisi per tutti i test da eseguire. Il kit di rilevazione/amplificazione **cobas® 4800** è sufficiente per analizzare fino a 80 campioni, compresi i controlli Cdiff e i campioni umani. È possibile utilizzare più flaconi di reagente Master Mix **cobas® 4800 Cdiff** in una seduta, purché siano dello stesso formato. Il kit generico di controllo interno 1 per il sistema **cobas® 4800** e i kit di controllo e co-fattore **cobas® 4800 Cdiff** sono disponibili in un unico formato, compatibile con tutte le configurazioni delle sedute. Ogni seduta contenente campioni di *C. difficile* deve includere anche un controllo positivo **cobas® 4800 Cdiff** e un controllo negativo **cobas® 4800** (vedere la sezione “**Controllo di qualità**”). Una seduta analitica singola può includere al massimo 94 campioni e 2 controlli.

Nota: sebbene non sia un uso ottimale dei reagenti, è possibile utilizzare un reagente generico da 96 test per una seduta con 1-22 campioni. Non è tuttavia possibile mescolare formati diversi del kit WB (tampone di lavaggio per il sistema cobas® 4800), del kit di preparazione dei campioni per il sistema cobas® 4800 e del kit di lisi 1 per il sistema cobas® 4800. Ad esempio, se all'inizio della seduta viene letto il codice a barre di un flacone di reagente WB da 96 test, anche gli altri due kit dovranno essere nei formati da 96 test.

Flusso di lavoro

Il test cobas® Cdiff viene eseguito con il flusso di lavoro completo configurato nel software cobas® 4800. Dopo la preparazione dei campioni sul cobas® x 480 instrument, è prevista la fase di amplificazione/rilevazione sul cobas® z 480 analyzer. La seduta può essere limitata ai soli campioni Cdiff o includere batch misti con i test cobas® MRSA/SA e/o cobas® HSV 1 e 2. Per maggiori dettagli, consultare l'Assistenza Utente del cobas® 4800 System.

Trasferimento dei campioni su una provetta cobas® PCR Media

1. Utilizzare un tampone di prelievo in poliestere per trasferire il campione di feci nella provetta cobas® PCR Media (gettare via il secondo tampone di prelievo contenuto nella confezione, se presente). Evitando di toccare il lato del contenitore, immergere tutta la punta in poliestere nel campione, quindi rimuovere il tampone di prelievo inoculato e inserirlo prontamente nella provetta cobas® PCR Media. Non analizzare il campione se le feci raccolte non sono sufficienti per l'immersione completa della punta del tampone di prelievo.

2. Spezzare l'asticella del tampone di prelievo in corrispondenza del segno grigio, facendo leva contro il lato della provetta. Tappare la provetta e agitare in vortex per almeno 5 secondi. Stappare le provette e sistamarle su un rack per campioni con 24 posizioni. Gettare via i tappi.

Nota: Il test cobas® Cdiff è approvato per l'uso con cobas® PCR Media Kit, cobas® PCR Media Uni Swab Sample Kit e cobas® PCR Media Dual Swab Sample Kit. Non utilizzare altri dispositivi o terreni di trasporto.

Nota: utilizzare esclusivamente un tampone di prelievo in poliestere per il trasferimento del campione. Evitare di trasferire una quantità eccessiva di feci nella provetta cobas® PCR Media, altrimenti potrebbero formarsi grumi e i risultati potrebbero non essere validi.

Nota: per poter eseguire il trattamento sullo strumento cobas® x 480, è necessario trasferire i campioni di feci in provette cobas® PCR Media provviste di etichette con codice a barre. Fare riferimento all'Assistenza Utente del cobas® 4800 System per conoscere le corrette procedure per i codici a barre e consultare un elenco dei codici a barre supportati dal cobas® 4800 System.

Nota: per prevenire la contaminazione crociata delle sospensioni di campioni fecali in cobas® PCR Media, è opportuno utilizzare tappi di un altro colore (neutro, vedere "Materiali opzionali") per i contenitori cobas® PCR Media e tappare nuovamente i campioni dopo il trattamento.

Nota: il volume di cobas® PCR Media fornito è sufficiente per sottoporre la sospensione fecale a svariati test sul sistema cobas® 4800. Per poter eseguire una seduta cobas® Cdiff, è necessario un volume minimo di 3 ml di sospensione fecale in una provetta cobas® PCR Media.

Esecuzione del test cobas® Cdiff

Nota: è possibile eseguire sedute in batch miste con i test cobas® MRSA/SA e cobas® Cdiff e/o cobas® HSV 1 e 2. Per maggiori informazioni, consultare l'Assistenza Utente del cobas® 4800 System.

1. Eseguire l'avvio del sistema e le procedure di manutenzione seguendo le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System**.
2. Raccogliere tutti i reagenti e il materiale di consumo necessario. Tutti i reagenti, ad eccezione di **cobas® Cdiff MMX** e **Cofactor-3**, devono avere raggiunto la temperatura ambiente all'avvio della seduta.

Nota: tutti i reagenti e tutte le vaschette per reagenti sono monouso e sono provvisti di codice a barre. Il software cobas® 4800 tiene traccia dell'uso dei reagenti e delle vaschette e rifiuta i reagenti e le vaschette già utilizzati.

3. Avviare una nuova seduta e definire il work order. È possibile creare il work order in tre modi:
 - Utilizzando il Sample Editor prima di caricare il rack per campioni sullo strumento **cobas® x 480** (pulsante "Editor" sulla destra del menu principale). È possibile salvare, modificare e ricaricare i work order secondo necessità.
 - Utilizzando la procedura guidata per creare una nuova seduta e caricare i campioni sullo strumento **cobas® x 480** seguendo le istruzioni visualizzate. Il codice a barre dei campioni viene letto automaticamente. Devono invece essere specificati i risultati richiesti per ogni campione.
 - Utilizzando il sistema LIS della propria organizzazione.

Per maggiori dettagli, consultare l'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System**. Quando si selezionano i risultati richiesti, scegliere l'opzione "Cdiff".

4. Caricare i campioni e definire/selezionare il work order oppure utilizzare il sistema LIS. L'opzione "Unload sample carriers after transferring to deep well plate" è selezionata per impostazione predefinita. Questa opzione consente all'operatore di scaricare i rack con i campioni rimanenti subito dopo avere trasferito le aliquote necessarie delle sospensioni fecali sullo strumento **cobas® x 480**. I contenitori con le sospensioni fecali devono essere richiusi con un nuovo tappo (vedere "**Materiali opzionali**") in caso di conservazione.
5. Seguire la procedura guidata per caricare il materiale di consumo. Non aggiungere o rimuovere singoli puntali da un rack parzialmente utilizzato, poiché il software tiene il conto dei puntali rimanenti. Se i puntali disponibili non sono sufficienti per la seduta, viene generato un allarme.
6. Caricare i reagenti per la preparazione dei campioni nelle apposite vaschette provviste di codice a barre. Le vaschette per reagenti sono disponibili in due formati: 200 ml e 50 ml. Seguire la procedura guidata per selezionare la vaschetta per reagenti del formato desiderato. Il codice a barre delle vaschette per reagenti deve essere rivolto verso il lato destro del rack. Caricare i reagenti necessari per la preparazione dei campioni seguendo il metodo "scan-scan-pour-place":
 - "Scan": scansionare il codice a barre dei flaconi dei reagenti.
 - "Scan": scansionare il codice a barre delle vaschette per reagenti.
 - "Pour": versare il reagente nella vaschetta.
 - Collocare la vaschetta piena di reagente nella posizione prevista sul rack per reagenti.

Nota: il cronometro interno del sistema cobas® 4800 registra il tempo di permanenza dei reagenti sullo strumento. Dopo la scansione del tampone di lavaggio (WB), è necessario completare il caricamento e fare clic sul pulsante “Start” entro 1 ora. Nella scheda “Workplace” compare un cronometro del tempo residuo. Il sistema non permetterà alla seduta di iniziare se il tempo è scaduto.

Nota: per garantire un trasferimento accurato delle biglie magnetiche (magnetic glass particles, MGP), agitare con vigore il flacone MGP immediatamente prima di versarlo nella vaschetta per reagenti.

7. Caricare i reagenti di amplificazione/rilevazione (Cdiff MMX e Cofactor-3), la proteinasi K (PK) e i controlli [Cdiff (+) C, IC e (-) C] direttamente sui rack per reagenti. Per prevenire il rischio di contaminazione, è necessario cambiare i guanti dopo avere manipolato i controlli positivi.

Nota: la procedura guidata calcola il numero e il formato ottimale dei reagenti cobas® Cdiff MMX da utilizzare. Il risultato di questo calcolo viene riportato nella colonna “Kit size” della schermata di caricamento dei reagenti MMX e Cofactor. Per utilizzare un diverso formato del reagente cobas® Cdiff MMX, fare clic sul pulsante “Change kit size”.

8. Avviare la preparazione dei campioni facendo clic su “Start Run”.
9. Se la seduta di preparazione dei campioni termina correttamente, vengono visualizzati i pulsanti “Sample Preparation results” e “Unload”. Se lo si desidera, è possibile selezionare il pulsante “Sample Preparation results” per rivedere i risultati e quindi selezionare “Unload” per scaricare i rack per piastre. In alternativa è possibile selezionare “Unload” per scaricare il rack per piastre senza rivedere i risultati. Consultare l'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System**.
10. Seguire le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System** per sigillare la piastra per PCR, trasferirla sull'analizzatore **cobas® z 480** e avviare la seduta di amplificazione e rilevazione.

Nota: il cronometro interno del sistema cobas® 4800 registra il tempo trascorso dopo l'aggiunta dei campioni preparati alla soluzione Master Mix attivata. L'amplificazione e la rilevazione devono iniziare il prima possibile e comunque entro e non oltre 90 minuti dalla fine della seduta sul cobas® x 480 instrument. Nella scheda “Workplace” viene visualizzato un cronometro del tempo residuo. Il sistema annullerà la seduta allo scadere del tempo.

11. Al termine della seduta di amplificazione e rilevazione, scaricare la micropiastra dal **cobas® z 480 analyzer**.
12. Seguire le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System** per rivedere e accettare i risultati.

Risultati

Controllo di qualità e validità dei risultati

Ogni seduta deve includere un set di controlli positivi e negativi del test **cobas**® Cdiff. Ogni seduta deve generare risultati validi sia per il controllo positivo che per il controllo negativo, affinché il software **cobas**® 4800 possa mostrare i risultati dei campioni sottoposti al test **cobas**® Cdiff nella stessa seduta.

Controllo Positivo

Il controllo Cdiff (+) contiene plasmidi di DNA di *C. difficile* non infettivi. Il controllo Cdiff (+) verifica la regolarità delle fasi di estrazione, amplificazione e rilevazione dell'acido nucleico in una determinata seduta del test. Il risultato del controllo Cdiff (+) deve essere "Valid". Se i risultati del controllo Cdiff (+) sono costantemente non validi, rivolgersi all'ufficio Roche locale per richiedere assistenza tecnica.

Controllo Negativo

Il risultato del controllo (-) deve essere "Valid". Se i risultati del controllo (-) sono costantemente non validi, rivolgersi all'ufficio Roche locale per richiedere assistenza tecnica.

Controllo Interno

Il Controllo Interno (Internal Control, IC) è un batteriofago lambda ricombinante che contiene le sequenze e i target randomizzati per i primer e le sonde IC-specifici. Durante la preparazione dei campioni sullo strumento **cobas**® x 480, l'IC viene aggiunto a tutti i campioni e ai controlli (positivi e negativi). L'IC verifica la regolarità delle fasi di estrazione, amplificazione e rilevazione dell'acido nucleico per un determinato tipo di campione. L'IC deve inoltre attestare la validità dei controlli della seduta.

Interpretazione dei risultati

Nota: la validazione di test e sedute compete al software cobas® 4800.

Nota: una seduta valida può includere sia risultati validi che risultati non validi.

Se una seduta è valida, i risultati dei campioni possono essere interpretati con le modalità descritte nella Tabella 1.

Tabella 1 Interpretazione dei risultati del test **cobas®** Cdiff

Test cobas® Cdiff	Report e interpretazione dei risultati
POS Cdiff	Cdiff positivo Il campione è positivo alla presenza di DNA di <i>C. difficile</i> .
NEG Cdiff	Cdiff negativo* L'eventuale presenza di DNA di <i>C. difficile</i> non è stata rilevata.
Invalid	Non valido Il risultato non è valido. Analizzare nuovamente il campione originale per ottenere un risultato valido. Richiudere con un nuovo tappo la provetta contenente la sospensione fecale che ha prodotto il risultato non valido, quindi agitare in vortex per 5 secondi. Aggiungere 0,5 ml di sospensione fecale agitata in vortex a una nuova provetta cobas® PCR Media contenente il terreno di trasporto. Tappare la provetta diluita e agitare in vortex per almeno 5 secondi. Stappare la provetta diluita e collocarla su un rack per campioni con 24 posizioni.
Failed	Nessun risultato per il campione Consultare l'Assistenza Utente del cobas® 4800 System per istruzioni sull'interpretazione dei flag e le azioni consigliate. Raramente, quando si verifica un errore di pipettamento (ad esempio, per un grumo o un altro tipo di ostruzione), la provetta contenente la sospensione fecale del campione originale deve essere richiusa con un nuovo tappo e centrifugata. Accelerare fino a 1800 RCF (o 1800 × g) e quindi arrestare la centrifuga. Assicurarsi che la provetta non venga agitata o miscelata dopo la centrifugazione. Stappare la provetta e collocarla su un rack per campioni con 24 posizioni.

* Un risultato negativo non esclude la presenza del DNA di *C. difficile*, poiché i risultati sono influenzati dal metodo di raccolta del campione, dalla presenza o assenza di inibitori e dal volume di DNA da rilevare.

Si potrebbero ottenere risultati non validi se il campione contenesse una quantità eccessiva di feci o sostanze inibitorie che impediscono l'estrazione e/o l'amplificazione/rilevazione dell'acido nucleico target. Per un elenco delle sostanze interferenti note, consultare la sezione **"Limiti della procedura"**.

Nota: il volume minimo di sospensione fecale necessaria per lo svolgimento del test **cobas®** Cdiff è di 3 ml.

Elenco dei flag dei risultati

La tabella seguente riporta gli avvisi (flag) rilevanti ai fini dell'interpretazione dei risultati.

Tabella 2 Elenco dei flag per il test **cobas® Cdiff**

Test cobas® Cdiff	Test cobas® Cdiff	Report e interpretazione dei risultati
R20	Il controllo positivo non è valido.	Un controllo esterno non è valido. 1. Ripetere l'intera seduta utilizzando reagenti nuovi. 2. Se il problema persiste, contattare l'assistenza tecnica Roche.
R21	Il controllo negativo non è valido.	Un controllo esterno non è valido. 1. Ripetere l'intera seduta utilizzando reagenti nuovi. 2. Se il problema persiste, contattare l'assistenza tecnica Roche.
X3	Errore: rilevato coagulo. Il campione non è stato analizzato.	Verificare che i campioni siano stati manipolati conformemente alla descrizione del flusso di lavoro. 1. Verificare se il campione contiene coaguli. 2. Ripetere l'analisi del campione.
X4	Errore: errore di pipettamento. Il campione non è stato analizzato.	La causa più probabile è che il volume del campione è insufficiente oppure si è verificato un errore meccanico durante il pipettamento. 1. Verificare che il volume del campione sia sufficiente. 2. Verificare che la piastra di espulsione puntali sia nella posizione corretta. 3. Ripetere l'analisi del campione.

Limiti della procedura

1. Il test **cobas® Cdiff** è approvato per l'uso esclusivamente con campioni di feci informi, il cui trasferimento nel terreno di trasporto **cobas® PCR Media** sia avvenuto secondo le istruzioni contenute in questo documento.
2. L'affidabilità dei risultati dipende dall'adeguatezza delle procedure di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni. Rispettare tutte le procedure descritte nel presente documento di istruzioni per l'uso (definito anche foglio illustrativo) e nell'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System**.
3. L'identificazione del DNA di *C. difficile* dipende dal numero di organismi presenti nel campione e può essere condizionata dai metodi di raccolta e trattamento dei campioni, dall'ospedalizzazione pregressa del paziente, dal regime di terapia antibiotica seguito e dai ceppi di *C. difficile*.
4. L'interferenza di altre sostanze potrebbe determinare risultati falsi negativi o non validi. L'IC è incluso nel test **cobas® Cdiff** perché contribuisce all'identificazione dei campioni che contengono sostanze potenzialmente interferenti con l'estrazione dell'acido nucleico e con l'amplificazione mediante PCR. Segue un elenco di alcune delle sostanze interferenti note:
 - I campioni contenenti oltre il 25% (p/v) di mucina per tampone possono produrre risultati falsi negativi.

5. Un risultato positivo è indicativo della presenza del DNA di *C. difficile*, non necessariamente della presenza di organismi vitali. Pertanto un risultato positivo non significa necessariamente che la terapia di eradicazione non è stata efficace.
6. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame al primer o alla sonda possono influenzare l'identificazione di varianti nuove o sconosciute, generando un risultato falso negativo con il test **cobas® Cdiff**.
7. Il valore predittivo di un saggio dipende dalla prevalenza della patologia in una determinata popolazione.
8. L'aggiunta dell'enzima AmpErase alla soluzione Master Mix del test **cobas® 4800 Cdiff** consente l'amplificazione selettiva del DNA target, tuttavia per evitare la contaminazione dei reagenti e delle miscele di amplificazione è necessario attenersi scrupolosamente alle buone pratiche di laboratorio e alle procedure descritte nel presente foglio illustrativo.
9. L'uso di questo prodotto deve essere consentito esclusivamente a personale adeguatamente addestrato nelle tecniche PCR e nell'uso del sistema **cobas® 4800**.
10. Soltanto lo strumento **cobas® x 480** e l'analizzatore **cobas® z 480** sono stati approvati per l'uso con questo prodotto. Non è possibile utilizzare altri strumenti per la preparazione dei campioni o sistemi PCR con questo prodotto.
11. A causa delle differenze intrinseche tra le tecnologie, prima di passare da una tecnologia a un'altra è consigliabile svolgere studi correlazionali nel proprio laboratorio al fine di identificare tali differenze tra le tecnologie e verificare la nuova procedura. Non è dunque prevedibile una concordanza percentuale del 100% tra i risultati, proprio a causa delle differenze descritte tra le tecnologie.
12. La contaminazione crociata può essere la causa di risultati falsi positivi. Il sistema **cobas® 4800** è uno strumento automatizzato per PCR real-time progettato per ridurre al minimo il rischio di contaminazione crociata durante i processi di trattamento dei campioni, estrazione degli acidi nucleici, amplificazione e rilevazione. Per verificare la solidità del sistema e valutare il tasso teorico di contaminazione crociata del sistema, è stato effettuato uno studio simulato, non clinico, a scacchiera su un pannello di campioni creati artificialmente e alternati tra positivi alti e negativi. Per i campioni positivi alti, i valori Ct si sono manifestati prima di quanto venga osservato nel 95% dei pazienti infetti tra la popolazione destinataria del test. Il tasso di contaminazione crociata calcolato in questo studio a scacchiera è stato dello 0,24% (1 su 423). I tassi di contaminazione crociata in un ambiente clinico dipendono dalla proporzione di campioni positivi alti e dalla prevalenza della patologia. Nella routine clinica, i tassi di contaminazione crociata sono probabilmente molto più bassi di quelli osservati in questo studio e dovranno essere valutati in base all'ambiente d'uso.

Valutazione delle prestazioni non cliniche

Sensibilità analitica

Per determinare la sensibilità analitica (Limit of Detection, LOD) del test **cobas®** Cdiff sono state analizzate alcune colture di *C. difficile* diluite a più livelli di concentrazione su un fondo di sospensione fecale negativa in **cobas®** PCR Media. Il test **cobas®** Cdiff è stato ripetuto per tutti i livelli di concentrazione, utilizzando tre lotti univoci di reagenti **cobas®** Cdiff. Per ogni livello sono stati analizzati almeno 21 replicati per lotto di reagenti. Il limite di rilevazione (LOD) del test è definito come la concentrazione target a cui $\geq 95\%$ dei replicati è risultato positivo al test, sulla base dei risultati generati dal lotto di reagenti con le prestazioni peggiori.

I sette ceppi di *C. difficile* esaminati nello studio di sensibilità analitica sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3 Limite di rilevazione (LOD) del test **cobas®** Cdiff

ID ceppo	Tossinotipo	Tipo REA*	Tipo PFG†	Ribotipo	Fenotipo	LOD (CFU/tampone)	
						Per percentuale positivi	Per analisi Probit
ATCC 43255 (VPI 10463)	0	N/D	N/D	087	A+B+CDT-	113	90
ATCC BAA-1382 (630)	0	R 23	N/D	012	A+B+CDT-	81	83
CDC 204118	III	BI 8	NAP1	027	A+B+CDT+	54	42
R12087 (CD196)	III	BI	NAP1	027	A+B+CDT+	54	54
2748-06	V	N/D	N/D	078	N/D	54	45
ATCC 43598 (1470)	VIII	N/D	N/D	017	A-B+	225	130
F15	XII	N/D	N/D	N/D	N/D	54	59

*Analisi della riduzione di endonucleasi; †gel a campo pulsato

Identificazione dei genotipi di *C. difficile*

Per verificare il limite di rilevazione (LOD) del test **cobas®** Cdiff per 28 ceppi tossigeni rappresentativi di ulteriori tossinotipi, sono stati analizzati 40 replicati per livello per più livelli. La preparazione delle diluizioni e dei campioni di analisi è avvenuta secondo una modalità simile a quella descritta in precedenza per il limite di rilevazione (LOD). Nella Tabella 4 è riportato il livello minimo a cui è stato osservato un tasso di successo di almeno il 95%.

Tutti i 28 ceppi tossigeni (Tabella 4) sono risultati positivi in $\geq 95\%$ dei replicati analizzati a concentrazioni comprese tra 77,9 CFU/tampone e 460 CFU/tampone.

Tabella 4 Riepilogo dei risultati per *C. difficile* tossigeni

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

Precisione

Lo studio sulla precisione in-house è stato condotto con un pannello di colture di *C. difficile* diluite in sospensione fecale negativa su terreno di trasporto **cobas**® PCR Media fino a livelli di concentrazione inferiori, prossimi e superiori al limite di rilevazione (LOD) del test **cobas**® Cdiff. È stato inoltre analizzato un livello negativo composto esclusivamente dalla sospensione fecale su terreno di trasporto **cobas**® PCR Media. Per lo studio sono stati utilizzati tre lotti unici di reagenti **cobas**® Cdiff e tre strumenti per un totale di 36 sedute in 12 giorni. Nella Tabella 5 è riportata una descrizione del pannello dello studio di precisione e un riepilogo dei risultati. L'analisi delle componenti della varianza (Tabella 6) indica che la variabilità dei valori Ct è in gran parte imputabile a fattori che sono specifici della seduta (random) e a fattori che sono specifici dei diversi lotti utilizzati (rispettivamente 60,0% e 25,3%,) per un livello di concentrazione uguale o prossimo al valore LOD. Nel caso di un livello di concentrazione superiore al valore LOD, la variabilità dei valori Ct è in gran parte imputabile a a fattori che sono specifici della seduta (random) e a fattori che sono specifici dei diversi strumenti utilizzati (rispettivamente 72,5% e 24,7%). I risultati (Tabella 7) indicano un CV (%) dell'1,5% per i i valori Ct target nel caso di un livello di concentrazione uguale al valore LOD e dell'1,1% nel caso di un livello di concentrazione superiore al valore LOD.

Tabella 5 Analisi della percentuale di risultati positivi per lo studio di precisione in-house

Membro del pannello	N. test	N. positivi	Percentuale positivi	LC 95%	
				Inferiore	Superiore
Negativo	72	0	0,0%	0,0%	5,0%
< 1 x LOD	72	21	29,2%	19,0%	41,1%
~ 1 x LOD	72	72	100,0%	95,0%	100,0%
~ 3 x LOD	72	72	100,0%	95,0%	100,0%

LOD = Limite di rilevazione

Tabella 6 Analisi dei componenti della varianza per i membri del pannello dello studio di precisione

Livello	Media	Componenti varianza/Incidenza percentuale sul totale					Totale
		Lotto	Strumento	Formato kit	Giorno	Random	
~ 1 x LOD	38,5	0,0789	0,0189	0,0001	0,0270	0,1875	0,3123
		25,25%	6,04%	0,03%	8,65%	60,03%	100,00%
~ 3 x LOD	37,5	0,0047	0,0404	0,0000	0,0000	0,1188	0,1638
		2,84%	24,65%	0,00%	0,00%	72,51%	100,00%

LOD = Limite di rilevazione

Tabella 7 Analisi delle deviazioni standard e dei coefficienti di variazione (%) per i membri del pannello dello studio di precisione

Livello	Media	Componenti DS/CV (%)					Totale
		Lotto	Strumento	Formato kit	Giorno	Random	
~ 1 x LOD	38,5	0,28	0,14	0,01	0,16	0,43	0,56
		0,73%	0,36%	0,03%	0,43%	1,12%	1,45%
~ 3 x LOD	37,5	0,07	0,20	0,00	0,00	0,34	0,40
		0,18%	0,54%	0,00%	0,00%	0,92%	1,08%

LOD = Limite di rilevazione

Specificità analitica

Per valutare la specificità analitica del test **cobas**® Cdiff sono stati analizzati i seguenti pannelli di organismi: 1) 103 batteri, funghi e virus che si possono trovare nei campioni fecali, e una cellula umana (Tabella 8); 2) 28 organismi appartenenti al genere *Clostridiaceae*, tra cui *C. difficile* non tossinogenico (* con aggiunta di citomegalovirus (HHV5) a $2,0 \times 10^3$ PFU/ml, adenovirus umano tipo 40 a $2,2 \times 10^3$ PFU/ml e rotavirus umano a $9,8 \times 10^3$ PFU/ml per i test - Tabella 9).

Tutti i batteri e le cellule umane sono stati aggiunti a una concentrazione di 1×10^6 unità*/ml; tutti i virus sono stati aggiunti a una concentrazione di 1×10^5 unità*/ml, ad eccezione di citomegalovirus (HHV5), adenovirus umano tipo 40 e rotavirus umano, i quali sono stati aggiunti a concentrazioni più basse a causa dei limiti di concentrazione dei rispettivi stock. I test sono stati eseguiti con gli organismi da soli o in presenza di due isolati di *C. difficile*, ciascuno a $3 \times \text{LOD}$ del test **cobas**® Cdiff. I risultati dimostrano che nessuno degli organismi esaminati ha interferito con l'identificazione dei target di Cdiff previsti. Non è stato prodotto nessun risultato falso positivo da campioni in cui non era prevista la presenza del target *C. difficile*.

La specificità analitica del *Clostridium botulinum* è stata confermata con il programma BLAST, rispetto al database di sequenze nucleotidiche GenBank, per simulare la fase della PCR in cui viene generato l'amplicone.

* I valori di quantificazione per i batteri è espressa in unità formanti colonie (CFU/ml), per le cellule umane in cellule/ml e per i virus in unità formati placca (PFU/ml), con la sola eccezione dei microorganismi seguenti. La *Chlamydia trachomatis* è quantificata in corpi elementari (EB/ml). Il citomegalovirus, l'ecovirus umano e l'enterovirus umano sono quantificati in unità internazionali (UI/ml).

Tabella 8 Microorganismi e cellule umane

<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	<i>Anaerococcus tetradius</i>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13472	<i>Bacteroides caccae</i>
<i>Bacteroides merdae</i>	<i>Bacteroides stercoris</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Campylobacter coli</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida catenulata</i>	<i>Cedecea davisae</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar L2	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Citrobacter sedlakii</i>	<i>Collinsella aerofaciens</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Desulfovibrio piger</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>
<i>Eggerthella lenta</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Enterococcus cecorum</i>	<i>Enterococcus dispar</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i> vanA	<i>Enterococcus gallinarum</i> vanC
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Escherichia hermannii</i>
<i>Fusobacterium varium</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gemella morbillorum</i>
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Cellule umane</i> HCT-15	<i>Helicobacter fennelliae</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Leminorella 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> subsp. <i>choleraesuis</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (nome precedente <i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>arizonae</i>)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Shigella boydii</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Trabulsiella guamensis</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Yersinia bercovieri</i>
<i>Yersinia rohdei</i>	Citomegalovirus (HHV5)*	Adenovirus umano tipo 40*
Coxsackievirus umano A10	Enterovirus umano 11	Enterovirus umano 71
Rotavirus umano*	Norovirus GII	-

* Per eseguire i test sono state effettuate le seguenti aggiunte: citomegalovirus (HHV5) a $2,0 \times 10^3$ PFU/ml, adenovirus umano tipo 40 a $2,2 \times 10^3$ PFU/ml e rotavirus umano a $9,8 \times 10^3$ PFU/ml.

Tabella 9 Organismi del genere *Clostridiaceae*, inclusi *C. difficile* non tossigenico.

<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> sierogruppo B (non tossigeno)	<i>Clostridioides difficile</i> sierogruppo I (non tossigeno)	<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> (nuovo nome <i>Flavonifractor plautii</i>)	<i>Clostridium paraputrificum</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Clostridium ramosum</i>	<i>Clostridium scindens</i>	<i>Clostridium septicum</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Clostridium sphenoides</i>	<i>Clostridium spiroforme</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Clostridium symbiosum</i>	<i>Clostridium tertium</i>
<i>Clostridium tetani</i>	-	-

* Sulla base del programma BLAST.

Interferenze

Per studiare le potenziali interferenze con il test **cobas**® Cdiff, sono stati analizzati 26 farmaci comunemente utilizzati, oltre a grasso fecale, sangue intero e mucina. Tutte le sostanze sono state analizzate a livelli superiori a quelli verosimilmente raccolti da un normale tampone di feci. La quantità della sostanza interferente è espressa come concentrazione nel campione primario di feci. Due isolati di *C. difficile* sono stati arricchiti a una concentrazione pari a 3 volte il limite di rilevazione (LOD) del test **cobas**® Cdiff e sono stati utilizzati come target nei test. Non è stata osservata nessuna interferenza delle sostanze esogene. Non sono state osservate interferenze fino al 28% per il grasso fecale, fino al 50% per il sangue intero e fino al 25% per la mucina. I risultati sono riassunti nella Tabella 10.

Tabella 10 Risultati dei test con le sostanze interferenti

Sostanza	Concentrazione	Risultati
Grasso fecale	4 ~ 28% (p/v)	Nessuna interferenza
Sangue intero	25, 50% (v/v)	Nessuna interferenza
Mucina	25, 50% (p/v)	Nessuna interferenza fino al 25% (p/v)
Tums (comprese antiacido a base di carbonato di calcio)	10% (p/v)	Nessuna interferenza
Vancomicina	1% (p/v)	Nessuna interferenza
Metronidazolo	10% (p/v)	Nessuna interferenza
Imodium AD®	10% (p/v)	Nessuna interferenza
Emolliente per feci	10% (p/v)	Nessuna interferenza
Pepto-Bismol® (Procter & Gamble)	10% (v/v)	Nessuna interferenza
Nistatina unguento USP	10% (p/v)	Nessuna interferenza
Preparazione H® con Bio-Dyne® crema (Wyeth)	10% (p/v)	Nessuna interferenza
GYNOL II	10% (p/v)	Nessuna interferenza
Vagisil® crema antiprurito	10% (p/v)	Nessuna interferenza
Anusol® Plus	10% (p/v)	Nessuna interferenza
Crema solare	1% (p/v)	Nessuna interferenza
Monistat® 7	10% (p/v)	Nessuna interferenza
Vaseline™	10% (p/v)	Nessuna interferenza
SAB-Dimenhydrinate® supposte (SABEX®)	10% (p/v)	Nessuna interferenza
Olio minerale	10% (v/v)	Nessuna interferenza
Equate, lassativo vegetale naturale	10% (p/v)	Nessuna interferenza
Dulcolax®	10% (p/v)	Nessuna interferenza
Fleet® (CB Fleet Company)	10% (p/v)	Nessuna interferenza
K-Y Jelly/Gelée® (McNeil-PPC)	1% (p/v)	Nessuna interferenza
Afrin, spray nasale originale	10% (v/v)	Nessuna interferenza
Amamelide	Liquido da 1 salvietta umidificata/tampone	Nessuna interferenza
E-Z-HD™, solfato di bario ad alta densità per sospensioni (E-Z-EM Canada)	20% (p/v)	Nessuna interferenza
Acido palmitico	10% (p/v)	Nessuna interferenza
Acido stearico	10% (p/v)	Nessuna interferenza
Aleve	10% (p/v)	Nessuna interferenza

Prestazioni cliniche con i campioni clinici

Le prestazioni del test **cobas**® Cdiff sono state valutate rispetto a quelle di uno tra i più avanzati test di amplificazione degli acidi nucleici (Nucleic Acid Tests, NAT) a scopo di comparazione, provvisto di approvazione FDA e marchio CE, utilizzando come metodo di riferimento i test di citotossicità su coltura tissutale eseguiti su isolati di *C. difficile* da coltura diretta. I campioni di feci raccolti presso 3 ospedali/ambulatori sono stati analizzati con il test **cobas**® Cdiff e con il test NAT comparativo, quindi sono stati inviati a un laboratorio esterno per i test di citotossicità su coltura tissutale.

Il test **cobas**® Cdiff e il test NAT comparativo sono stati eseguiti nel rispetto delle istruzioni dei rispettivi produttori. Il test di citotossicità su coltura tissutale è stato eseguito con la procedura di coltura diretta. Ogni campione di feci è stato inoculato in agar cicloserina-cefoxitina-fruttosio (CCFA-HT) pre-ridotto. Le colonie sospette sono state identificate come *C. difficile* mediante colorazione di Gram, aero-intolleranza e test pro-disk e quindi inoculate in brodo di carne tritata anaerobico. I sopranatanti ottenuti dal brodo di carne tritata anaerobico sono stati successivamente trattati per rilevare la tossina B di *C. difficile* mediante il test di citotossicità su coltura tissutale (C. DIFFICILE TOX-B test, Techlab).

In totale sono stati arruolati 1.434 soggetti in cinque siti. Di questi, 256 soggetti sono stati esclusi perché i risultati erano incompleti. Sono stati identificati 152 campioni positivi al *C. difficile* mediante coltura diretta (prevalenza: 11,9%). Le prestazioni del test **cobas**® Cdiff e del test NAT comparativo rispetto alla coltura diretta sono illustrate nella Tabella 11 e nella Tabella 12.

Tabella 11 Test **cobas**® Cdiff a confronto con la coltura diretta

		Coltura diretta		
		Positivi	Negativi	Totale
Test cobas® Cdiff	Positivi	147	30	177
	Negativi	5	1.096	1.101
	Totale	152	1.126	1.278

Sensibilità e specificità

I valori di sensibilità e specificità del test **cobas**® Cdiff rispetto alla coltura diretta sono rispettivamente del 96,7% (intervallo di confidenza bilaterale al 95%: 92,5-98,6%) e del 97,3% (intervallo di confidenza bilaterale al 95%: 96,2-98,1%).

Valori predittivi di risultati positivi e negativi

I valori predittivi di risultati positivi e negativi al test **cobas**® Cdiff rispetto ai campioni esaminati sono rispettivamente dell'83,1% (intervallo di confidenza bilaterale al 95%: 76,7-88,3%) e del 99,5% (intervallo di confidenza bilaterale al 95%: 98,9-99,9%).

Tabella 12 Test NAT comparativo a confronto con la coltura diretta

		Coltura diretta		
		Positivi	Negativi	Totale
Test NAT comparativo	Positivi	147	29	176
	Negativi	5	1.097	1.102
	Totale	152	1.126	1.278

Sensibilità e specificità

I valori di sensibilità e specificità del test NAT comparativo rispetto alla coltura diretta sono rispettivamente del 96,7% (intervallo di confidenza bilaterale al 95%: 92,5-98,6%) e del 97,4% (intervallo di confidenza bilaterale al 95%: 96,3-98,2%).

Correlazione con il test NAT comparativo

Nella Tabella 13 sono illustrate le prestazioni del test **cobas**® Cdiff in un confronto diretto con il test NAT comparativo dotato di approvazione FDA e marchio CE.

Tabella 13 Test **cobas**® Cdiff a confronto con il test NAT comparativo

		Test NAT comparativo		
		Positivi	Negativi	Totale
Test cobas® Cdiff	Positivi	167	10	177
	Negativi	9	1.092	1.101
	Totale	176	1.102	1.278

Concordanza percentuale dei risultati positivi e negativi

I valori di concordanza dei risultati positivi e negativi tra il test **cobas**® Cdiff e il test NAT comparativo sono rispettivamente del 94,9% (intervallo di confidenza bilaterale al 95%: 90,6-97,3%) e del 99,1% (intervallo di confidenza bilaterale al 95%: 98,3-99,5%).

Informazioni supplementari

Caratteristiche specifiche del saggio

Tipo di campione	Campioni di feci informi
Quantità di campione richiesta	4,3 ml di terreno di trasporto cobas ® PCR Media nella provetta primaria; minimo 3 ml per l'esecuzione di un test cobas ® Cdiff.
Durata del test	Risultati disponibili entro 2,5 ore dal caricamento del campione sul sistema (1-22 campioni).
Sensibilità analitica	Da 54 a 460 CFU/tampone, a seconda dell'isolato.
Specificità	Assenza di reattività crociata con 125 organismi strettamente correlati o organismi comunemente presenti nei campioni di feci.
Inclusività	Tutti i tipi di <i>C. difficile</i> noti (tossinotipi 0 ~ XXXI, tranne tossinotipi XI non tossigeni), compreso il ceppo ipervirulento BI/ NAP1/027 epidemico.

Simboli

I seguenti simboli appaiono su tutte le confezioni di prodotti diagnostici PCR di Roche.

Tabella 14 Simboli utilizzati sulle etichette dei prodotti diagnostici PCR di Roche

Age/DOB	Età o data di nascita		Dispositivo non idoneo ai test POC	QS IU/PCR	UI QS per reazione PCR; utilizzare le unità internazionali (UI) QS per la reazione PCR nel calcolo dei risultati.
	Software ausiliario		Dispositivo non idoneo all'autodiagnosi	SN	Numero di serie
Assigned Range [copies/mL]	Intervallo assegnato (copie/mL)		Distributore (Nota: il paese e/o la regione applicabili potrebbero essere indicati sotto il simbolo.)	Site	Laboratorio
Assigned Range [IU/mL]	Intervallo assegnato (UI/mL)		Non riutilizzare	Procedure Standard	Procedura standard
EC REP	Mandatario nella Comunità Europea		Femmina	STERILE EO	Sterilizzazione con ossido di etilene
BARCODE	Foglio di dati del barcode		Solo per valutazione delle prestazioni IVD		Conservare al buio
LOT	Codice del batch	GTIN	Global Trade Item Number		Limiti di temperatura
	Rischio biologico		Importatore		File di definizione del test
REF	Numero di catalogo	IVD	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>		Alto
	Contrassegno di conformità CE: questo dispositivo è conforme ai requisiti pertinenti del marchio CE relativamente ai dispositivi medico-diagnostici <i>in vitro</i>	LLR	Limite inferiore dell'intervallo assegnato	Procedure UltraSensitive	Procedura ultrasensibile
Collect Date	Data di raccolta		Maschio	UDI	Identificazione univoca del dispositivo
	Consultare le istruzioni per l'uso		Fabbricante	ULR	Limite superiore dell'intervallo assegnato
	Contenuto sufficiente per <n> test	CONTROL -	Controllo negativo	Urine Fill Line	Riga di riempimento urina
CONTENT	Contenuto del kit		Non sterile	Rx Only	Solo USA: la legge federale statunitense limita la vendita di questo dispositivo ai medici o su presentazione di prescrizione medica.
CONTROL	Controllo		Nome del paziente		Utilizzare entro la data
	Data di produzione		Numero del paziente		
	Dispositivo idoneo ai test POC		Staccare qui		
	Dispositivo idoneo all'autodiagnosi	CONTROL +	Controllo positivo		
		QS copies / PCR	Copie QS per reazione PCR; usare le copie QS per reazione PCR nel calcolo dei risultati.		

Assistenza tecnica

Per richiedere assistenza tecnica, contattare la nostra filiale locale:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Produttore e importatore

Tabella 15 Produttore e importatore



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

Prodotto in USA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

Marchi e brevetti

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

Copyright

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Bibliografia

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

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

Revisione del documento

Informazioni sulla revisione del documento	
Doc Rev 7.0 04/2023	Sostituzione di <i>Clostridium</i> con <i>Clostridioides</i> in tutto il documento. Rimozione di tutti i riferimenti al kit Cdiff 240T per obsolescenza. Aggiornamento della sezione Precauzioni e requisiti per l'uso per invitare l'utente a rivolgersi all'autorità locale competente. Aggiunta dell'avvertimento di "danneggiamento/perdite" nella sezione Integrità. Modifica del titolo della sezione Correlazionali in Prestazioni cliniche con i campioni clinici. Aggiunta di un collegamento al report sintetico sulla sicurezza e sulle prestazioni. Aggiunta del simbolo per la marcatura CE con il numero dell'organismo notificato. Aggiornamento della pagina dei simboli armonizzati. Aggiornamento agli Operatori Economici correnti. Aggiornamento della sezione Marchi e brevetti, collegamento incluso. Inserimento del simbolo Rx Only nella prima pagina. Aggiunta della dichiarazione "Prodotto in". Aggiunta della sezione Assistenza tecnica. Aggiornamento dei marchi cobas®. Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.

Per prendere visione del report sintetico sulla sicurezza e sulle prestazioni, utilizzare il seguente collegamento:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>