

REF 410300

IVD For in vitro Diagnostic Use



### INTENDED USE

The Revogene® C. difficile assay performed on the Revogene instrument is a qualitative *in vitro* diagnostic test that utilizes automated sample processing and real-time polymerase chain reaction (PCR) to detect the toxin B (*tcdB*) gene of toxicogenic *Clostridium difficile* (*C. difficile*) in unformed (liquid or soft) stool specimens obtained from patients suspected of having *C. difficile* infection (CDI). The Revogene C. difficile assay is intended to aid in the diagnosis of CDI.

### SUMMARY AND EXPLANATION

*C. difficile* is a gram-positive bacillus, strict anaerobic spore forming, which is part of the normal intestinal flora in 1-3% of adults and up to 45% of infants<sup>1,2</sup>. In patients taking antibiotics in high doses or for long periods, the normal intestinal flora (bacteria) can be destroyed, allowing *C. difficile* to overgrow. In such cases, *C. difficile* produces toxins that can damage the intestines and cause mild to severe diarrhea and potentially fatal intestinal disorders such as pseudomembranous colitis (inflammation of the large intestine), toxic megacolon and sepsis<sup>3,4,5,6</sup>.

*C. difficile* infection (CDI) is the leading cause of infectious diarrhea in hospitals and long-term care facilities in industrialized countries.

*C. difficile* is shed in feces. People can become infected if they touch items or surfaces that are contaminated with feces and then touch their mouth or nose. Health care workers can spread the bacteria to other patients or contaminate surfaces through hand contact.

The epidemiology of CDI has changed over the last decade<sup>7,8</sup>. Epidemic strains (BI / NAP1 / 027) of virulent *C. difficile* cause serious diseases that often require colectomy resulting in an increased mortality<sup>4,5</sup>. These strains are more likely to spread in hospitals due of antimicrobial resistance and spore formation.

The guidelines of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recommend the use of a *C. difficile* diagnostic for patients presenting clinical (e.g. unformed stool) and epidemiological risk factors since the rapid identification of infections with *C. difficile* is of major importance on the management of the disease<sup>9</sup>.

Rapid, sensitive and specific diagnostic tests are necessary tools for the early detection of the disease and the quick implementation of effective infection control measures in the fight against CDI. Empiric treatment without a precise CDI diagnostic is inappropriate as even in an epidemic environment, only about 30% of hospitalized patients will acquire a CDI<sup>10</sup>. The efficiency and effectiveness of CDI diagnosis remains a challenge for the clinician and microbiologist.

The Revogene C. difficile assay can provide results from up to eight specimens in approximately 70 minutes. The assay minimizes operator intervention from the time the single-use disposable microfluidic cartridge (named PIE hereinafter) containing the sample is placed into the Revogene carousel until results are available.

### PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

The Revogene automates sample homogenization, sample dilution, cell lysis, DNA amplification and detection of the amplified PCR products. User intervention is only required for discharging the patient specimen into the Sample Buffer Tube (SBT), transferring the sample from SBT into the PIE, and loading/unloading the PIEs into the Revogene carousel.

Each PIE is a completely integrated closed device in which a sample is dispensed and processed through different microfluidic chambers and channels which allow for the sample processing (i.e. sample homogenization, sample dilution, and cell lysis) and subsequent real-time PCR steps. The liquid from a single sample is transferred by centrifugation from one chamber to the next in sequence and all reagents specific for the PCR reaction are incorporated and dried within the PCR well(s) (Figure 1).

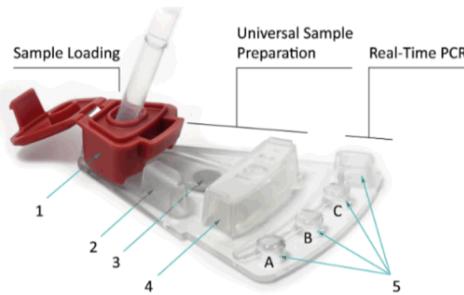


Figure 1. Top View of a PIE.  
1: Sample Loading chamber, 2: Overflow chamber,  
3: Homogenization chamber, 4: Dilution/Lysis chamber,  
5: Three PCR wells (A to C from left to right) and one Waste Chamber (at the right end).

A Process Control (PrC) is incorporated into each PIE to verify sample processing and amplification steps. The PrC allows for the verification of potential inhibitor substances as well as microfluidic, instrument or reagent failure. The amplified products are detected in real time using target-specific TaqMan® chemistry-based probes. No operator intervention is necessary once a PIE is loaded into the Revogene.

The Revogene can process from one up to eight samples simultaneously in the same run. The carousel must contain eight PIEs to maintain thermodynamic balance within the run. At run completion, the results are computed by the system from measured fluorescent signals and embedded calculation algorithms. Results that are displayed on the touchscreen may be printed, transferred and/or stored by the user using the USB port or the connectivity option.

### REAGENTS AND MATERIALS

The *C. difficile* kit contains sufficient reagents and materials to process 24 specimens. The kit contains the following materials:

1. 24 Disposable Transfer Loops (LOOP): LOOP consists of a single-use 5 microliters ( $\mu$ L) loop for transferring the unformed (liquid or soft) stool specimen to the SBT.
2. 24 Disposable Transfer Tools (DTT): DTT consists of a single-use transfer pipette for transferring the sample from the SBT to the PIE.
3. 24 Sample Buffer Tubes (SBT): Barcode-labeled tube containing TE 1X buffered solution (Tris-HCl pH 8.0/EDTA.Na<sub>2</sub>) as a dilution and preservation buffer for sample.
4. 24 Individual pouches containing one (1) *C. difficile* PIE: Barcode-labeled integrated device, composed of dried reagents allowing sample process and real-time PCR steps for PrC DNA and *C. difficile* toxin B gene DNA simultaneous amplification/detection.

### MATERIALS/EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Revogene® (cat# 610210)
2. Disposable gloves; powderless
3. Vortex mixer with a maximal speed of at least 3200 rpm
4. Sample rack (cat# 132539; optional)
5. MOCK PIE (cat# 610208; optional)

### WARNING AND PRECAUTIONS

1. This product can only be used on the Revogene.
2. Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken upon arrival.
3. Do not use *C. difficile* PIEs if the protective pouches are open or broken upon arrival.
4. Do not interchange DTT, SBT, and PIE between kit lots.
5. Each single-use LOOP, DTT and *C. difficile* PIE are used to process one sample. Do not reuse LOOP, DTT or PIE.
6. Always handle specimens as if they are infectious and in accordance with Good Laboratory Practices such as those described in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories<sup>11</sup> and in CLSI Document M29-A4<sup>12</sup>.
7. Wear disposable powderless gloves while handling specimens and thoroughly wash hands afterwards.
8. The *C. difficile* PIE contains dried reagents. The protective pouch should not be opened until ready to perform the test.
9. Dispose of unused materials and reagents and waste, including used PIEs, in accordance with country, federal, provincial, state and local regulations.
10. Do not open or break apart the PIE after use to avoid contamination with amplification products and/or infectious particles.
11. Do not use a PIE that has been dropped, shaken or inverted after the sample has been loaded as this may cause invalid results.
12. The *C. difficile* assay does not provide susceptibility results. Additional time is required to culture and perform susceptibility testing.
13. Do not use a kit that has passed its stated expiration date.
14. Do not refrigerate the loaded PIE.
15. An amount of stool exceeding the recommended amount may inhibit the *C. difficile* assay.
16. Each run must be performed with eight PIEs in the Revogene carousel to maintain thermodynamic and mechanical balance within the run.

## **HAZARD AND PRECAUTIONARY STATEMENTS**

There are no known hazards associated with this product.

## **STORAGE AND STABILITY**

1. Collected specimens should be stored between 2 C and 25 C during transport.
2. Stool specimens can be stored at 25 C for up to 2 days, or at 2-8 C for up to 4 days. Inoculated SBT can be stored at 25 C for up to 2 days, or at 2-8 C for up to 3 days.
3. Store the *C. difficile* kit at 2-25 C. The expiration date is indicated on the kit box label.
4. Do not open a pouch until ready to perform testing. Use the PIE within 1 hour after opening the pouch.

## **INSTRUCTION FOR USE**

### **SPECIMEN COLLECTION AND TRANSPORT**

Specimen type: Unformed (liquid or soft) stool specimens obtained from patients suspected of having CDI.

Collect the unformed stool in a dry, clean container according to the local guidelines or procedures.

1. Transfer liquid or soft stool (but not urine) into the container. Avoid mixing toilet paper, water or soap with the specimen.
2. Label the container with the specimen or patient identification (ID) and send to the laboratory for testing (refer to Storage and Stability section).

### **SAMPLE PREPARATION AND HANDLING**

**NOTE 1:** Start the test within 1 hour after opening the pouch containing the PIE.

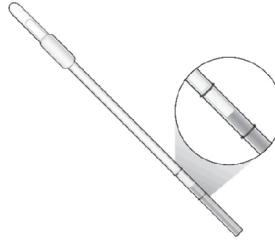
#### **SBT PREPARATION**

1. For each specimen to be tested, obtain one LOOP and one SBT from the kit box.
2. Identify (or label) the SBT with the appropriate specimen identification without obscuring or writing over the barcodes. Place the SBT on the Sample rack, if used.
3. Vortex the specimen at maximal speed for 15 seconds. Dip the provided LOOP into the stool. Remove any excess of soft stool present on the outside of the loop in order to take approximately 5  $\mu$ L.
4. Remove the cap from the SBT, shake the LOOP into the SBT for 2-3 seconds and/or swirl to dislodge sample from the loop. Make sure that only one SBT is open at once.
5. Replace the cap on the SBT, tightly close the SBT cap, and place it on the Sample rack, if used.
6. Prepare any additional specimens for testing by repeating steps 1 to 5 then proceed to step 7.
7. When all samples are prepared, proceed to *C. difficile* PIE preparation (next section).

#### **PIE PREPARATION**

**NOTE 1:** Process one sample at a time:

8. Vortex the SBT for 15 seconds at maximal speed.
9. Unseal the PIE pouch and remove the PIE.
10. Place the *C. difficile* PIE on the Sample rack, if used.
11. Obtain one DTT from the kit box and aspirate the Sample Buffer by squeezing the entire bulb. The liquid level into the DTT must be anywhere between the two marks (**Figure 2**). If the liquid level is not between the two marks, discharge the SB volume completely in the SBT by squeezing the entire bulb and repeat step 11.
12. Discharge completely the SB into the Sample Loading Chamber of the PIE (**Figure 1**).
13. Close the cap of the PIE tightly, making sure the cap lock is well in place. Do not refrigerate the loaded PIE. Make sure that only one PIE is open at once.
14. Repeat steps 8 to 13 for any additional samples then proceed to step 15.
15. The stool specimens and the inoculated SBT can be stored at 2-8 C or at 25 C within the timeframe defined in the **Storage and Stability** section.



**Figure 2.**  
Representation of an Appropriate Sample Buffer Level Using the Disposable Transfer Tool (DTT).

### **REVOGENE OPERATION**

**NOTE 1:** A maximum of eight samples can be processed simultaneously in a single run using the Revogene (including External Controls).

**NOTE 2:** Each run must be performed with eight PIES in the Revogene. When less than eight samples are processed, the empty places must be filled with MOCK PIES\*.

**NOTE 3:** Refer to the Revogene Operator's Manual<sup>13</sup> for further information regarding Revogene set-up and operation.

1. Power on the Revogene (if not already done). The software will launch automatically.
2. Log in by entering the <Username> and <Password> and tap <Login>. The main menu will appear automatically.
3. Tap <Setup Run>.
4. Enter the sample identification using either the barcode scanner or manual entry. Manual entry can be done by tapping the pencil icon of the <Scan or Enter Sample ID> line.
5. Enter the SBT and *C. difficile* PIE barcodes using the Revogene barcode scanner. Gently positioning the PIE vertically in front of the scanner. Alternatively, SBT and PIE barcodes may be entered manually (tap the pencil icon of their respective lines). Handle the PIE carefully without dropping, shaking or inverting it.
6. (Optional) Tap the pencil icon of the <Add Comments> line and type a comment.
7. Insert the *C. difficile* PIE into the Revogene, at any position of the carousel. The software will automatically associate sample and SBT to the correct *C. difficile* PIE.
8. Confirm that the PIE is inserted into instrument by tapping <OK> on the <Insert PIE into Instrument> line and repeat steps 4 to 8 for all samples.
9. When all *C. difficile* PIES are inserted into instrument and MOCK PIES when necessary, tap <Next>.
10. Scan the retention ring and place it on the carousel. Close the instrument lid.
11. Initiate the test run by tapping <Start>.

\*If MOCK PIES are not available, use unused assay PIES filled with un-inoculated SB (BLANK) or with External Controls.

### **VIEWING AND EXPORTING RESULTS**

**NOTE 1:** Refer to the Revogene Operator's Manual<sup>13</sup> for further information regarding the acquisition of test results.

1. Once the run is completed, the lid opens automatically.
2. Tap the home icon.
3. If the Revogene has logged-out, re-enter <Username> and <Password> and tap <Login>. The main menu will appear automatically.
4. Tap <Results> icon to access test results.
5. Tap <Last Run> to see the latest test results.
6. From the <Last Run>, select samples for which results report(s) has (have) to be exported. All samples can be selected in one time by clicking the first box to the left of the "Sample ID" column.
7. Tap <Export> and save where appropriate (e.g. USB key).
8. Remove the retention ring and *C. difficile* PIES from the Revogene. Used *C. difficile* PIES should be discarded in appropriate waste containers according to the institution's standard practices.

### **REPEAT TESTING PROCEDURE**

#### **UNRESOLVED OR INDETERMINATE RESULT FOR A SPECIMEN**

When an Unresolved (JNR) or an Indeterminate (IND) result is obtained for a specimen, a repeat test from the corresponding inoculated SBT must be performed within the specified timeframe described in the **Storage and Stability** section. Only one repeat testing from the SBT is allowed.

Vortex the SBT for a minimum of 15 seconds at maximal speed using a vortex mixer. Using a new pouch, follow steps 9 to 13 of the **Sample Preparation and Handling / PIE Preparation** section, then follow the **Revogene Operation** section.

#### **UNRESOLVED, INDETERMINATE, FALSE NEGATIVE OR FALSE POSITIVE RESULT FOR AN EXTERNAL CONTROL**

When an unresolved, an indeterminate, a false negative or a false positive result is obtained for an External Control, the run is invalid. Specimens included in the run should be repeated using the corresponding inoculated SBT, along with freshly prepared External Controls, within the specified timeframe described in the **Storage and Stability** section. Refer to the next **Quality Control** section for preparation of fresh External Controls.

For the repeat testing using the corresponding inoculated SBT, vortex the SBT for a minimum of 15 seconds at maximal speed using a vortex mixer. Using a new pouch, follow steps 9 to 13 of the **Sample Preparation and Handling / PIE Preparation** section, then follow the **Revogene Operation** section.

## QUALITY CONTROL

**Quality control procedures monitor the accuracy and precision of the analytical process. Each laboratory must establish the number, type and frequency of testing control materials per applicable regulations or accrediting agencies. The procedure described below may be employed, if appropriate, based on local policies and procedures.**

**NOTE 1:** Separate LOOP, DTT, SBT and PIE must be used for each External Control preparation.

1. Each *C. difficile* PIE contains a Process Control (PrC) that verifies for sample homogenization, sample dilution, cell lysis, inhibition of DNA amplification and assay reagents failure.
2. Good laboratory practice recommends the use of control materials. User should follow the appropriate guidelines concerning the running of External Controls. It is recommended that one Positive External Control and one Negative External Control should run at least on a daily basis until adequate process validation is achieved with the *C. difficile* assay on the Revogene in each laboratory setting.
3. External Control materials are not provided by Meridian Bioscience, Inc. External Controls are not used by the Revogene software for the purpose of sample test result interpretation. External Controls are treated as if they are specimens.
4. Various types of External Controls are recommended to allow the user to select the most appropriate for its laboratory quality control program. Process and test External Control preparations according to the **Sample Preparation and Handling** section.

### External Positive Control:

1. A freshly prepared cell suspension of a toxigenic *C. difficile* strain, bearing the *tcdB* gene, from commercially available control material (e.g., ATCC® 43255™) prepared at  $0.5 \pm 0.05$  McFarland and diluted 1/2 in saline (e.g., BD BBL™ Prepared Saline Solution, cat# 221819) is recommended for use as a Positive External Control.
2. Alternatively, a previously characterized stool specimen positive for toxigenic *C. difficile* could also be used as a Positive External Control.

### External Negative Control:

1. A freshly prepared cell suspension of a non-toxigenic *C. difficile* strain from commercially available control material (e.g., ATCC® 43593™) prepared at  $0.5 \pm 0.05$  McFarland in saline (e.g., BD BBL™ Prepared Saline Solution, cat# 221819) is recommended for use as a Negative External Control.
2. Alternatively, a previously characterized stool specimen negative for toxigenic *C. difficile* could also be used as a Negative External Control.

## RESULTS INTERPRETATION

The results are computed by the Revogene from measured fluorescent signals and embedded calculation algorithms and are available on the "Results" window. Possible results are:

Sample	Symbol displayed on user screen	Overall reported result	Interpretation
Patient Specimen		Positive	Toxigenic <i>C. difficile</i> target DNA detected.
		Negative	Toxigenic <i>C. difficile</i> target DNA not detected.
		Indeterminate	No reportable result due to possible Revogene detection error during the assay processing, the data analysis, or if the run is interrupted by the user. Repeat testing must be performed (refer to the <b>Repeat Testing Procedure</b> section for further guidance).
		Unresolved	Amplification/detection failure for the Process Control as well as for the toxigenic <i>C. difficile</i> target DNA. Could be caused by inhibitory specimens, microfluidic or reagent failure. Repeat testing must be performed (refer to the <b>Repeat Testing Procedure</b> section for further guidance).
Positive External Control		Positive	Valid Positive External Control result.
		Negative	An External Positive Control that yields a negative result is indicative of a specimen handling/preparation problem. <b>The run is invalid.</b> Review the specimen handling/preparation technique.
		Indeterminate	Incorrect Positive External Control result. <b>The run is invalid.</b> Repeat testing must be performed (refer to the <b>Repeat Testing Procedure</b> section for further guidance).
		Unresolved	Incorrect Positive External Control result. <b>The run is invalid.</b> Repeat testing must be performed (refer to the <b>Repeat Testing Procedure</b> section for further guidance).
Negative External Control		Positive	An External Negative Control that yields a positive test result is indicative of a specimen handling and/or contamination event. <b>The run is invalid.</b> Review the specimen handling technique.
		Negative	Valid Negative External Control result.
		Indeterminate	Incorrect Negative External Control result. <b>The run is invalid.</b> Repeat testing must be performed (refer to the <b>Repeat Testing Procedure</b> section for further guidance).
		Unresolved	Incorrect Negative External Control result. <b>The run is invalid.</b> Repeat testing must be performed (refer to the <b>Repeat Testing Procedure</b> section for further guidance).

### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The *C. difficile* assay must only be used with the Revogene by trained personnel.
2. The *C. difficile* assay is not intended to differentiate carriers of *C. difficile* from those with *C. difficile* infection.
3. The *C. difficile* assay does not provide susceptibility results. Culture isolates are needed for performing susceptibility testing.
4. Performance characteristics of the *C. difficile* assay were established with unformed (liquid or soft) stool specimens collected from patients suspected of having *C. difficile* infection. Use of the *C. difficile* assay for clinical specimen types other than those specified has not been evaluated and performance characteristics are not established.
5. Results from the *C. difficile* assay should be used as an adjunct to clinical observations and other information available to the physician.
6. Assay results may be affected by concurrent antimicrobial therapy as *C. difficile* DNA may continue to be detected.
7. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. It is, however, indicative for the presence of toxigenic *C. difficile* DNA.
8. Erroneous test results may occur from improper specimen collection, handling or storage, technical error or sample mix-up. Careful compliance with the instructions of this insert, the Revogene Operator's Manual<sup>13</sup> and to established guidelines is necessary to avoid erroneous results.
9. A negative result does not rule out the possibility of *C. difficile* colonization. False negative results may occur when the *C. difficile* concentration is below the limit of detection of the assay. If the patient has signs or symptoms of infection, other laboratory tests and clinical information should be used to confirm the negative result.
10. Contamination or false negative results may occur if a PIE cap is incorrectly closed.
11. While there are no known strains/isolates of toxigenic *C. difficile* lacking the *tcdB* gene, the occurrence of such a strain could lead to an erroneous result using the *C. difficile* assay.
12. Mutations or polymorphisms in primer- or probe-binding regions may affect detection of *C. difficile* *tcdB* gene variants, resulting in a false negative result with the *C. difficile* assay.
13. Calcium Carbonate (e.g. Tums<sup>®</sup>) or Aluminum Hydroxide/Magnesium Hydroxide (e.g. Stomaa<sup>®</sup>) may potentially inhibit the detection of toxigenic *C. difficile* when either of these substances is present in sample buffer at a concentration of  $> 0.5$  mg/mL or  $> 0.5$   $\mu$ M/L respectively.
14. Presence of *Clostridium sordellii* at a load of  $> 10^5$  CFU/mL of sample buffer may lead to detection of false positive results.
15. A combinatory effect of *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Helicobacter pylori*, at  $\geq 10^6$  CFU/mL in sample buffer, may have an inhibitory effect on the detection of toxigenic *C. difficile*.
16. A combinatory effect of *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Vibrio parahaemolyticus*, at  $\geq 10^6$  CFU/mL in sample buffer, may have an inhibitory effect on the detection of toxigenic *C. difficile*.

### EXPECTED VALUES

The prevalence of *C. difficile* infection (CDI) depends upon a variety of factors including predisposition for infection due to prior therapy with broad-spectrum antibiotics, the presence of symptoms and the standard of care test. In a combined prospective and retrospective study, specimens were collected at 8 geographically diverse clinical sites from 2 581 subjects in the range of age between 0–2 years old to more than 60 years old. Of the 2 461 specimens that met all inclusion criteria without meeting any of the exclusion criteria, 333 were positive based on the combined results of direct and enriched toxigenic culture for an observed prevalence of 13.5% [333/2461; 95%CI: 12.2 – 15%]. The percentage of positive results observed with the Revogene *C. difficile* assay in the study population was 11.5% [283/2461; 95%CI: 10.3 – 12.8%].

### CLINICAL PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The clinical performance of the Revogene *C. difficile* assay was established in an Independent Ethics Committee (IEC)- approved, prospective and retrospective, multi-site, investigation comparing the results with toxigenic culture using leftover, de-identified, unformed (liquid or soft) stool specimens from subjects suspected of having CDI. Two thousand five hundred and eighty-one (2581) specimens were prospectively collected at seven geographically diverse sites across the US and Canada between February 4, 2017 and July 15, 2017 from symptomatic eligible subjects. Only specimens that met the study inclusion criteria and did not meet any of the exclusion criteria were enrolled. Two thousand four hundred and sixty-three (2463) specimens were used to establish the performance of the Revogene *C. difficile* test by comparison with Combined Direct and Enriched Culture method. All 2463 freshly collected specimens were tested in culture, 798 were tested with Revogene *C. difficile* assay as fresh specimens and a subset of 1665 specimens were frozen to be tested later with the Revogene *C. difficile* assay.

The toxigenic culture was performed at a central reference laboratory and the Revogene *C. difficile* assay was performed at the seven proficient designated sites. The toxigenic culture method included direct and enriched culture followed by cytotoxicity testing. The direct culture method consisted in the transfer of a swab of the stool specimen from Anaerobic Transport Medium to pre-reduced selective anaerobic media, a standard cycloserine cefoxitin and fructose agar plate (CCFA), followed by cytotoxicity testing on *C. difficile* colonies isolated from stool. Briefly, colonies isolated in direct cultures that were morphologically resembling *C. difficile* (i.e. yellow ground-glass-like in appearance with barnyard-like odor) were confirmed for their identity by aero intolerance test on chocolate agar plates and a blood agar plate (BAP) under anaerobic conditions.

Once colonies were identified, a second BAP plate containing a vancomycin (5 mcg) disc was plated, and an inoculum loop was used to inoculate an anaerobic chopped meat broth. The inoculated broth was incubated anaerobically at 35-37 C for 48h for cytotoxicity testing using Cell Cytotoxicity Neutralization Assay (CCNA; Cytotoxicity Assay for *Clostridium difficile* Toxin, Diagnostic Hybrids). For the enriched culture method, the same swab that was utilized to inoculate the CCFA plate was used to inoculate a cycloserine cefoxitin mannitol broth with taurocholate and lysozyme (CCMB-TAL) tube. The enrichment broth was sub-cultured on another CCFA plate and followed the same procedure used for the direct method. A specimen was considered positive for toxigenic *C. difficile* if *C. difficile* was recovered from stool either by direct or enriched culture and if bacterial isolates tested positive by CCNA. If *C. difficile* was isolated from the direct culture and the isolate tested positive by cytotoxicity testing, the enrichment culture was not further analyzed. Specimens were classified as negative for toxigenic *C. difficile* only if they tested negative by both direct, and combined culture i.e. direct and enriched culture.

The sensitivity, specificity, Positive Predictive Value (PPV) and Negative Predictive Value (NPV) values were calculated by comparing Revogene *C. difficile* assay results with the combined results of direct and enriched culture method (Reference Method). Discrepant analysis was performed on a portion of specimens with discordant results between the Revogene *C. difficile* assay and combined culture method, using four Sites' Routine PCR Assay. Finally, the Positive Percent Agreement (PPA) and Negative Percent Agreement (NPA) were determined comparing the Revogene *C. difficile* assay with the direct culture results.

## RESULTS

The study population demographics are presented in **Table 1**.

**Table 1.** Study population demographics of all compliant specimens at all levels

Subjects	All Subjects N=2461	Fresh N=797	Frozen N=1664
<b>Source of specimen</b>			
In-patient	1804 (73.3%)	617 (77.4%)	1187 (71.3%)
Out-patient	420 (17.1%)	123 (15.4%)	297 (17.8%)
Emergency room	234 (9.5%)	57 (7.2%)	177 (10.6%)
Missing	3 (0.1%)	0 (0.0%)	3 (0.2%)
<b>Age Class</b>			
<2	9 (0.4%)	4 (0.5%)	5 (0.3%)
3-18	105 (4.3%)	30 (3.8%)	75 (4.5%)
19-60	1199 (48.7%)	399 (50.1%)	800 (48.1%)
> 60	1148 (46.6%)	364 (45.7%)	784 (47.1%)

Of the 798 fresh and 1665 frozen eligible specimens that were compliant at the specimen and PCR level, 9 and 13 were respectively reported unresolved at initial testing (1.1% for the fresh specimens and 0.8% for the frozen specimens) and only one fresh specimen remained unresolved following repeat testing. The unresolved rate after repeat testing was 0.1% (1/798) for the fresh specimens and 0.0% (0/1665) for the frozen specimens.

Of the 798 fresh and 1665 frozen eligible specimens that were compliant at the specimen and PCR level, 12 and 28 were respectively reported indeterminate at initial testing (1.5% for the fresh specimens and 1.7% for the frozen specimens) and only one frozen specimen remained indeterminate following repeat testing. The indeterminate rate after repeat testing was 0.0% (0/798) for the fresh specimen and 0.1% (1/1665) for the frozen specimens.

The overall initial non-reportable rate was 2.6% (21/798) and 0.1% (1/798) after repeat testing for the fresh specimens. The overall initial non-reportable rate was 2.5% (41/1665) and 0.1% (1/1665) after repeat testing for the frozen specimens.

### COMPARISON WITH COMBINED DIRECT AND ENRICHED CULTURE

The clinical performance of the Revogene *C. difficile* assay compared to the combined results of direct and enriched toxigenic culture are presented in **Table 2** for fresh specimens and **Table 3** for frozen specimens.

Of the 2463 eligible specimens, 2461 had valid results for direct toxigenic culture, enriched toxigenic culture and the Revogene *C. difficile* assay. Of the 2461 specimens, 333 were positive based on the combined results of direct and enriched toxigenic culture for an observed prevalence of 13.5% [333/2461; 95%CI: 12.2 – 15.0%].

Performance characteristics of the *C. difficile* assay obtained with the fresh stool specimens demonstrated 80.5% sensitivity (91/113; 95%CI: 72.0 – 87.4) and 97.1% specificity (664/684; 95%CI: 95.5 – 98.2%) in comparison to the Reference Method (Combined Direct and Enriched Culture method) obtained with fresh stool specimens (**Table 2**).

**Table 2.** Overall Performance Characteristics of the Revogene *C. difficile* Assay in Comparison to the Reference Method (Combined Direct and Enriched Culture method) obtained with fresh stool specimens.

Overall performance Fresh stool		Reference Method		
C. difficile assay	Positive	Positive	Negative	Total
	Negative	22 <sup>a</sup>	664	686
	Total	113	684	797

Sensitivity: 80.5% (91/113; 95% CI: 72.0 – 87.4%)

Specificity: 97.1% (664/684; 95% CI: 95.5 – 98.2%)

PPV: 82.0% (91/113; 95% CI: 73.6 – 88.6%)

NPV: 96.8% (664/686; 95% CI: 95.2 – 98.0%)

<sup>a</sup>Of the 20 specimens with false-positive Revogene *C. difficile* test results relative to the combined direct and enrichment culture 8 were positive and 4 were negative by a second NAAT method (Sites' Routine PCR Assay).

<sup>b</sup>Of the 22 specimens with false-negative Revogene *C. difficile* test results relative to the combined direct and enrichment culture 13 were negative and 4 were positive by a second NAAT method (Sites' Routine PCR Assay).

Performance characteristics of the *C. difficile* assay obtained with the frozen stool specimens demonstrated 87.3% sensitivity (192/220; 95%CI: 82.1 – 91.4%) and 97.3% specificity (1405/1444; 95%CI: 96.3 – 98.1%) in comparison to the reference method (**Table 3**).

**Table 3.** Overall Performance Characteristics of the Revogene *C. difficile* Assay in Comparison to the Reference Method (Combined Direct and Enriched Culture method) obtained with frozen stool specimens.

Overall performance Frozen stool		Reference Method		
C. difficile assay	Positive	Positive	Negative	Total
	Negative	28 <sup>b</sup>	1405	1433
	Total	220	1444	1664

Sensitivity: 87.3% (192/220; 95% CI: 82.1 – 91.4%)

Specificity: 97.3% (1405/1444; 95% CI: 96.3 – 98.1%)

PPV: 83.1% (192/231; 95% CI: 77.7 – 87.7%)

NPV: 98.0% (1405/1433; 95% CI: 97.2 – 98.7%)

<sup>a</sup>Of the 39 specimens with false-positive Revogene *C. difficile* test results relative to the combined direct and enrichment culture 17 were positive and 15 were negative by a second NAAT method (Sites' Routine PCR Assay).

<sup>b</sup>Of the 28 specimens with false-negative Revogene *C. difficile* test results relative to the combined direct and enrichment culture 14 were negative and 12 were positive by a second NAAT method (Sites' Routine PCR Assay).

### COMPARISON WITH DIRECT CULTURE

The clinical agreement of the Revogene *C. difficile* assay compared to the results of direct toxigenic culture are presented in **Table 4** for fresh specimens and **Table 5** for frozen specimens.

**Table 4.** Overall Performance Characteristics of the Revogene *C. difficile* Assay in Comparison to the Direct Culture method obtained with fresh stool specimens.

Overall performance Fresh stool		Direct culture Method		
C. difficile assay	Positive	Positive	Negative	Total
	Negative	3	683	686
	Total	66	731	797

PPA: 95.5% (63/66; 95% CI: 87.3 – 99.1%)

NPA: 93.4% (683/731; 95% CI: 91.4 – 95.1%)

**Table 5.** Overall Performance Characteristics of the Revogene *C. difficile* Assay in Comparison to the Direct Culture method obtained with frozen stool specimens.

Overall performance Frozen stool		Direct culture Method		
C. difficile assay	Positive	Positive	Negative	Total
	Negative	8	1425	1433
	Total	168	1496	1664

PPA: 95.2% (160/168; 95% CI: 90.8 – 97.9%)

NPA: 95.3% (1425/1496; 95% CI: 94.1 – 96.3%)

### ANALYTICAL PERFORMANCE CHARACTERISTICS

#### ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity (Limit of Detection or LoD) of the *C. difficile* assay was determined using clinical liquid stool matrix previously tested negative for toxigenic *C. difficile* and spiked with various concentrations of toxigenic *C. difficile* bacterial suspensions. Two strains of toxigenic *C. difficile* (ATCC® 43255™, Ribotype 087, Toxinotype 0 and ATCC® BAA-1805™, NAP1, Ribotype 027, Toxinotype IIb) were tested in 24 replicates per concentration. The LoD is defined as the lowest concentration at which 95% or more of all replicates tested positive. In regards to the two strains tested, the LoD of the *C. difficile* assay was 1 500 CFU/mL of sample buffer (SB). Results are summarized in **Table 6**.

**Table 6.** LoD of the *C. difficile* Assay

Toxigenic <i>C. difficile</i> strain ATCC® number	LoD (CFU/mL of SB)
ATCC® 43255™	1 500
ATCC® BAA-1805™	1 500

**INCLUSIVITY**

Inclusivity of the *C. difficile* assay was determined for 20 strains of toxigenic *C. difficile* representing 8 different toxinotypes from diverse geographic origins. Each strain was tested from a quantitated cell culture spiked in a toxigenic *C. difficile*-negative liquid stool matrix at a load of 3 750 CFU/mL of SB, corresponding to two to three times the LoD value of ATCC® 43255™ strain. Three replicates per strain were tested using 3 different *C. difficile* kit lots. All toxigenic *C. difficile* strains tested were detected at 3 750 CFU/mL SB. Strains tested are described in **Table 7**.

**Table 7.** Toxigenic *C. difficile* Strains Tested for Inclusivity with the *C. difficile* assay

Toxigenic <i>C. difficile</i> strains	Toxinotype
ATCC® 9689™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 700792™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 17858™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1382™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 51695™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 43600™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 43599™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 43596™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 43594™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1804™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 17857™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1873™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1870™	(Toxinotype IIIB, NAP1, A+, B+)
ATCC® BAA-1803™	(Toxinotype IIIC, NAP1, A+, B+)
ATCC® BAA-1875™	(Toxinotype V, A+, B+)
ATCC® 43598™	(Toxinotype VIII, A-, B+)
CCUG 8864	(Toxinotype X, A-, B+)
ATCC® BAA-1812™	(Toxinotype XII, A+, B+)
ATCC® BAA-1814™	(Toxinotype XXII, A+, B+)
ATCC® BAA-2155™	(Toxinotype XXII, A+, B+)

In addition, an *in silico* analysis was performed on July 20<sup>th</sup>, 2017 to assess inclusivity of the primers and probe of the *C. difficile* assay target regarding 52 toxigenic *C. difficile* strains listed in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. The alignment results showed no mismatch with the selected 52 sequences. The analysis predicted the detection of all these toxigenic *C. difficile* strains.

**CROSS-REACTIVITY**

The cross-reactivity of the *C. difficile* assay was assessed with high loads of organisms that are not targeted by the test, or phylogenetically related to *C. difficile*, or non-toxigenic *C. difficile* strains, or present in the normal intestinal flora. The study included 50 bacteria, 1 yeast, 7 viruses and human DNA (**Table 8**). Bacteria and yeast were tested at a load of ≥ 10<sup>6</sup> CFU/mL of SB. Nucleic acids from 6 viruses and human DNA were tested at a load of ≥ 10<sup>5</sup> DNA or RNA copies/mL of SB. These organisms were tested using quantitated cell cultures or nucleic acid solutions spiked in a *C. difficile*-negative liquid stool matrix. Each organism was tested in PCR triplicates.

Under the conditions of the study, *Clostridium sordellii* was detected by the *C. difficile* assay at a load of approximately 10<sup>6</sup> CFU/mL of SB for one replicate out of 3, but was found non-reactive at a load of approximately 10<sup>5</sup> CFU/mL of SB. *Clostridium novyi* and *Clostridium scindens* strains produced false positive reactions in one replicate out of six tested at approximately 10<sup>6</sup> CFU/mL of SB. No reactivity was observed for three replicates tested at 10<sup>5</sup> CFU/mL of SB. *Enterococcus faecalis* strain produced false positive reactions in one replicate out of three tested at approximately 10<sup>7</sup> CFU/mL of SB. No reactivity was observed for three replicates tested at 10<sup>6</sup> CFU/mL of SB. The other organisms and nucleic acids tested were found non-reactive with the *C. difficile* assay.

For the Coxsackievirus only, the cross-reactivity with primers and probes of the *C. difficile* assay was evaluated by an *in silico* analysis performed on all strain sequences of Coxsackievirus contained in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database between February 7<sup>th</sup>, 2017 and August 11<sup>th</sup>, 2017. The analysis suggested that the Coxsackievirus strains should not be reactive with the *C. difficile* assay.

**Table 8.** List of Organisms Tested for Cross-Reactivity with the *C. difficile* Assay

Bacteria	
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> ( <i>Campylobacter coli</i> )	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>
<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Clostridium novyi</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Flavonifractor plautii</i> ( <i>Clostridium orbiscindens</i> )	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Clostridium scindens</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Clostridium difficile</i> (non-toxigenic) – ATCC® 43593™	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Clostridium difficile</i> (non-toxigenic) – ATCC® 43601™	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizona</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Shigella boydii</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella sonnei</i>
Yeast	
<i>Candida albicans</i>	
Viruses	
Human Adenovirus 1 (DNA)	Rotavirus (RNA)
Enterovirus D68 (RNA)	Norovirus (RNA)
Echovirus 4 (RNA)	Human Herpes virus 5 (Cytomegalovirus) (DNA)
Coxsackievirus ( <i>in silico</i> )	Human gDNA
Human DNA	
	Human gDNA

#### INTERFERING ORGANISMS

The potentially inhibitory effect of 30 organisms, that may be present in the normal intestinal flora and which are not targeted by the test, was assessed using organisms selected from the cross-reactivity study (**Table 8**). Each organism category (i.e., bacteria, yeast, viruses) was represented with a special attention to include the most frequent causative agents of intestinal tract infections. Groups of 2 to 6 organisms were prepared in toxicogenic *C. difficile*-negative liquid stool matrix, and tested in duplicate in presence of either 3 750 CFU/mL of SB of the toxicogenic *C. difficile* ATCC® 43255™ strain or 4 500 CFU/mL of SB of the toxicogenic *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ strain, to assess their potential interference on detection of toxicogenic *C. difficile* or PrC. Each organism within group was diluted to reach a load of  $\geq 10^6$  CFU/mL of SB for bacterium and yeast, and  $\geq 10^5$  copies/mL of SB for virus. The 30 organisms included in the study are presented in **Table 9**.

**Table 9.** List of Organisms Tested for Interference with the *C. difficile* Assay

Group 1	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> ( <i>Campylobacter coli</i> )	
Group 2	
<i>Candida albicans</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Clostridium difficile</i> (non- toxicogenic) – ATCC® 43593™	<i>Clostridium difficile</i> (non- toxicogenic) – ATCC® 43601™
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium sordellii</i>
Group 3	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
<i>Helicobacter pylori</i>	
Group 4	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
Group 5	
<i>Shigella boydii</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Shigella sonnei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Group 6	
Rotavirus (RNA)	Norovirus (RNA)

None of the 30 organisms present at  $\geq 10^6$  CFU/mL of SB for bacteria and yeast and  $\geq 10^5$  copies/mL of SB for viruses interfered with detection of PrC and with the toxicogenic *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ strain.

Group 3 and group 5 showed a potentially inhibitory effect on detection of the toxicogenic *C. difficile* strain ATCC® 43255™. Nevertheless, when each bacterium from these groups was tested individually at a load of  $\geq 10^6$  CFU/mL of SB in presence of *C. difficile* strain ATCC® 43255™, none interfered.

#### INTERFERING SUBSTANCES

The potentially inhibitory effect of 16 exogenous and 5 endogenous substances that may be present in the intestinal tract was assessed using toxicogenic *C. difficile* negative samples and toxicogenic *C. difficile* strains ATCC® 43255™ and ATCC® BAA-1805™ at two to three times the LoD (3 750 CFU/mL of SB and 4 500 CFU/mL of SB respectively) in presence of liquid stool matrix. Substances were tested at their potentially highest concentration that could be found in a stool specimen. The results for the 21 substances are presented in **Table 10**.

Results demonstrated no reportable interference on PrC. Calcium Carbonate (e.g. Tums®) and Aluminum Hydroxide/Magnesium Hydroxide (e.g. Stomax®) showed a potentially inhibitory effect on the detection of toxicogenic *C. difficile* when either of these substances was present in SBT at a concentration of 5 mg/mL (0.5% W/V) and 5 µL/mL (0.5% V/V) respectively. When tested at 0.5 mg/mL (0.05% W/V) or 0.5 µL/mL (0.05% V/V) respectively, these substances showed no reportable interference with the *C. difficile* assay.

**Table 10.** List of Exogenous and Endogenous Substances Tested with the *C. difficile* Assay.

Exogenous substances		
Substance (commercial name)	Concentration or amount in SBT <sup>1</sup>	Results <sup>2</sup>
Vaginal antifungal / anti-itch (Nystatin)	0.5% W/V	NI
Creams / ointments (Personnelle Hydrocortisone cream)	0.5% V/V	NI
Anti-hemorrhoidal creams / ointments (Preparation H®)	0.5% V/V	NI
Antacids (Tums®)	0.5% W/V	I <sup>3</sup>
Antacids (Stomax®)	0.5% V/V	I <sup>4</sup>
Enemas (Life BRAND® Heavy Mineral Oil USP)	0.5% V/V	NI
Enemas (Mesalazine or 5-aminosalicylic Acid)	0.5% W/V	NI
Condom with spermicidal lubricant (Trojan® with spermicidal lubricant condom)	Square of 2 mm <sup>2</sup>	NI
Anti-diarrheal medication (Pepto Bismol™)	0.5% V/V	NI
Anti-diarrheal medication (Imodium®)	0.5% V/V	NI
Laxatives (Senokot®)	0.5% V/V	NI
Oral and topical antibiotics (Vancomycin)	0.5% V/V	NI
Oral and topical antibiotics (Metronidazole)	0.5% W/V	NI
Non-steroidal anti- inflammatory (Aleve®)	0.5% W/V	NI
Moist towelettes (Equate™ Flushable Moist Wipes)	Square of 2 mm <sup>2</sup>	NI
Moist towelettes (Wet Ones®)	Square of 2 mm <sup>2</sup>	NI
Endogenous substances		
Substance	Concentration or amount in SBT <sup>1</sup>	Results <sup>2</sup>
Fecal fat, triglycerides mix (C2-C10)	0.5% V/V	NI
Fecal fat, Palmitic acid	1.0% W/V	NI
Fecal fat, Stearic acid	0.5% W/V	NI
Whole blood	0.5% V/V	NI
Mucus	0.5% V/V	NI

<sup>1</sup>W/V: Weight/Volume; V/V: Volume/Volume

<sup>2</sup> I: Interference with the *C. difficile* assay; NI: No Interference with the *C. difficile* assay

<sup>3</sup> No Interference at 0.05% W/V

<sup>4</sup> No interference at 0.05% V/V

#### CARRY-OVER AND CROSS-CONTAMINATION

The within-run and between-run carry-over and cross-contamination were assessed using positive samples prepared in a toxicogenic *C. difficile*-negative liquid stool matrix to reach a final concentration of  $> 10^7$  CFU/mL of SB of the toxicogenic *C. difficile* ATCC® 43255™ strain. True negative samples, prepared with the toxicogenic *C. difficile*-negative liquid stool matrix only, were also tested.

For the within-run study, a total of 10 runs were performed by two operators with the *C. difficile* assay on one Revogene. Four (4) high positive samples and 4 negative samples were tested by alternating positive and negative samples in each run. For the between-run study, a run of 8 replicates of high positive samples followed by a run of 8 replicates of negative samples were performed by two operators, for a total of 10 runs on one Revogene.

Absence of carry-over and cross-contamination was demonstrated.

#### REPRODUCIBILITY / PRECISION

##### REPRODUCIBILITY

Between-site reproducibility study was performed on three sites, by two operators per site, over five distinct days using one *C. difficile* assay kit lot.

Between-lot reproducibility study was performed on one site, by two operators, over 15 days using three *C. difficile* assay kit lots (5 days per kit lot). For each reproducibility study, a total of 120 replicates for negative samples and 90 replicates for each category of positive samples, all prepared in a toxicogenic *C. difficile*-negative liquid stool matrix, were tested. Two toxicogenic *C. difficile* strains were used for positive samples: ATCC® 43255™ (toxinotype 0, Ribotype 087) and ATCC® BAA-1805™ (toxinotype IIb, NAP1, Ribotype 027).

Sample categories were described as follows:

1. Low positive (LP): ATCC® 43255™ and ATCC® BAA-1805™ strains were spiked at 2 438 CFU/mL and 2 925 CFU/mL of SB, respectively
2. Moderate positive (MP): ATCC® 43255™ and ATCC® BAA-1805™ strains were spiked at 3 750 and 4 500 CFU/mL of SB, respectively
3. True negative (TN): samples without toxicogenic *C. difficile* strain

Results for each sample category tested during the between- site and the between-lot reproducibility studies are shown in **Tables 11** and **12** respectively. For the between-site reproducibility, the overall percent agreement was 100% for TN, LP and MP of toxicogenic *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ strain. The overall percent agreement for LP and MP of toxicogenic *C. difficile* ATCC® 43255™ strain was 94.4% and 96.7% respectively (**Table 11**). For the between-lot reproducibility, the overall percent agreement was 100% for TN and MP of toxicogenic *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ strain categories and 98.9% for LP. The overall percent agreement for LP and MP of toxicogenic *C. difficile* ATCC® 43255™ strain was 91.1% and 96.7% respectively (**Table 12**).

Overall mean Cycle threshold (Ct) values with variance components (SD and %CV) are shown in **Tables 11** and **12**.

Table 11. Between-Site Reproducibility Study Results using One *C. difficile* Assay kit Lot

Category	Toxigenic <i>C. difficile</i> strain (ATCC® number)	Site 1		Site 2		Site 3		Overall Results/ Total	Overall Percent Agreement <sup>1</sup>	Overall 95% CI	Ct Values <sup>2</sup>		
		Results/ Total	Percent Agreement	Results/ Total	Percent Agreement	Results/ Total	Percent Agreement				Overall Mean	SD	%CV
LP	ATCC® 43255™	27/30	90.0%	28/30	93.3%	30/30	100%	85/90	94.4%	87.5% - 98.2%	38.48	1.56	4.05
	ATCC® BAA- 1805™	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%	96.7% - 100%	36.37	2.74	7.54
MP	ATCC® 43255™	29/30	96.7%	29/30	96.7%	29/30	96.7%	87/90	96.7%	90.6% - 99.3%	37.68	1.63	4.32
	ATCC® BAA- 1805™	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%	96.7% - 100%	36.57	1.65	4.52
TN	N/A	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	97.5% - 100%	33.09	1.02	3.09

<sup>1</sup> For the TN category, percent agreement was calculated for negative results.<sup>2</sup> For the LP and MP categories, Ct values reported are for the toxigenic *C. difficile* target. For the TN category, Ct values reported are for the PrC.Table 12. Between-Lot Reproducibility Study Results on One Site using Three *C. difficile* Assay Kit Lots

Category	Toxigenic <i>C. difficile</i> strain (ATCC® number)	Lot 1		Lot 2		Lot 3		Overall Results/ Total	Overall Percent Agreement <sup>1</sup>	Overall 95% CI	Ct Values <sup>2</sup>		
		Results/ Total	Percent Agreement	Results/ Total	Percent Agreement	Results/ Total	Percent Agreement				Overall Mean	SD	%CV
LP	ATCC® 43255™	27/30	90.0%	27/30	90.0%	28/30	93.3%	82/90	91.1%	83.2%-96.1%	38.57	1.72	4.46
	ATCC® BAA- 1805™	30/30	100%	29/30	96.7%	30/30	100%	89/90	98.9%	94.0%-100%	37.02	1.98	5.35
MP	ATCC® 43255™	29/30	96.7%	30/30	100%	28/30	93.3%	87/90	96.7%	90.6%-99.3%	37.55	2.16	5.75
	ATCC® BAA- 1805™	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%	96.7%-100%	36.86	1.31	3.56
TN	N/A	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	97.5%-100%	33.21	0.90	2.71

<sup>1</sup> For the TN category, percent agreement was calculated for negative results.<sup>2</sup> For the LP and MP categories, Ct values reported are for the toxigenic *C. difficile* target. For the TN category, Ct values reported are for the PrC.

#### PRECISION

Precision study was performed on one site, by two operators, over 12 days using one *C. difficile* assay kit lot.For each category, all samples were prepared in a toxigenic *C. difficile*-negative liquid stool matrix. Two toxigenic *C. difficile* strains were used for positive samples: ATCC® 43255™ (toxinotype 0, Ribotype 087) and ATCC® BAA-1805™ (toxinotype IIIb, NAP1, Ribotype 027).

Sample categories were described as follows:

1. Low positive (LP): ATCC® 43255™ and ATCC® BAA-1805™ strains were spiked at 2 438 CFU/mL and 2 925 CFU/mL of SB, respectively
2. Moderate positive (MP): ATCC® 43255™ and ATCC® BAA-1805™ strains were spiked at 3 750 and 4 500 CFU/mL of SB, respectively
3. True negative (TN): samples without toxigenic *C. difficile* strain

Precision study results for TN and LP of toxigenic ATCC® BAA-1805™ strain demonstrated 100% agreement and 97.2% for MP. Precision study results for LP and MP of toxigenic *C. difficile* ATCC® 43255™ strain categories, demonstrated agreement of 88.9% and 95.8% respectively (Table 13).Table 13. Precision Study Percent Agreement on One Site using One *C. difficile* Assay Kit Lot

Category	Toxigenic <i>C. difficile</i> strain ATCC® number	Overall Percent Agreement <sup>1</sup>	Overall 95% CI
LP	ATCC® 43255™	88.9%	79.3%-95.1%
	ATCC® BAA-1805™	100%	95.9%-100%
MP	ATCC® 43255™	95.8%	88.3%-99.1%
	ATCC® BAA-1805™	97.2%	90.3%-99.7%
TN	N/A	100%	96.9%-100%

<sup>1</sup> For the TN category, percent agreement was calculated for negative results.

#### E-LABELING

Documentation related to this product can be accessed online at [www.meridianbioscience.com/pi](http://www.meridianbioscience.com/pi). Additionally, paper copies are available upon request by contacting your local distributor or via the phone number listed on the kit box.



## C. difficile

Per l'uso con il Revogene®

REF 410300

IVD Per l'uso diagnostic *in vitro*



### USO PREVISTO

La procedura analitica Revogene® C. difficile eseguita sul Revogene è un test diagnostico *in vitro* qualitativo che utilizza il trattamento automatizzato dei campioni e la reazione a catena della polimerasi (PCR) in tempo reale per rilevare il gene della tossina B (*tcdB*) del Clostridium difficile (C. difficile) tossicogeno in campioni di fuci (liquide o molli) non formate ottenuti da pazienti con sospetta infezione da C. difficile (CDI). La procedura analitica Revogene C. difficile è indicata per agevolare la diagnosi della CDI.

### RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

Il C. difficile è un bacillo gram-positivo, sporigeno strettamente anaerobico ed è parte della normale flora intestinale nell'1-3% degli adulti e fino nel 45% dei bambini<sup>1,2</sup>. Nei pazienti che assumono antibiotici in alte dosi o per lunghi periodi, la normale flora intestinale (batteri) può essere distrutta, consentendo al C. difficile di crescere eccessivamente. In questi casi, il C. difficile produce tossine che possono danneggiare l'intestino e causare diarrea da lieve a grave e disturbi intestinali potenzialmente mortali, come colite pseudomembranosa (infiammazione dell'intestino crasso), megacolon tossico e sepsi<sup>3,4,5,6</sup>.

L'infezione da C. difficile (CDI) è la causa principale della diarrea infettiva negli ospedali e nelle strutture di cura a lungo termine nei paesi industrializzati.

Il C. difficile viene rilasciato nelle feci. Le persone possono essere contagiate se toccano oggetti o superfici contaminati dalle feci e poi si toccano la bocca o il naso. Gli operatori sanitari possono trasmettere i batteri ad altri pazienti o contaminare le superfici tramite il contatto con le mani.

L'epidemiologia della CDI è cambiata durante gli ultimi dieci anni<sup>7,8</sup>. I ceppi epidemici (BI / NAP1 / 027) del C. difficile virulento causano gravi malattie che spesso richiedono una colectomia che dà luogo a un aumento della mortalità<sup>4,5</sup>. Questi ceppi hanno maggiori possibilità di propagarsi negli ospedali a causa della resistenza antimicrobica e della formazione di spore.

Le linee guida del Centro per la prevenzione e il controllo delle malattie (CDC) consigliano l'utilizzo della diagnostica del C. difficile nei pazienti che presentano fattori di rischio clinici (per es., fuci non formate) ed epidemiologici poiché la rapida identificazione di infezioni da C. difficile è di grande importanza nella gestione della malattia<sup>9</sup>.

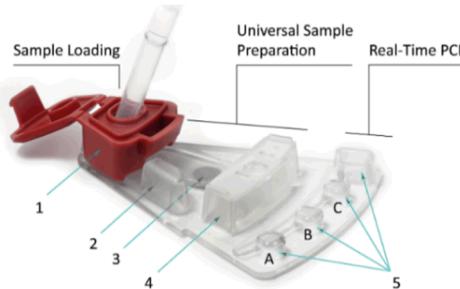
I test diagnostici specifici, rapidi e sensibili sono strumenti necessari per l'individuazione precoce della malattia e la rapida implementazione di efficaci misure di controllo delle infezioni nella lotta contro la CDI. Il trattamento empirico senza una diagnosi precisa di CDI è inadatto poiché persino in un ambiente epidemico soltanto il 30% circa dei pazienti ricoverati contrae la CDI<sup>10</sup>. L'efficienza e l'efficacia della diagnosi di CDI restano sfide impegnative per il medico e il microbiologo.

La procedura analitica Revogene C. difficile può fornire risultati ottenuti da un massimo di otto campioni in 70 minuti circa. Tale procedura riduce al minimo l'intervento dell'operatore dal momento in cui la cartuccia microfluidica monouso (di seguito denominata PIE) che contiene il campione viene posizionata nel carosello del Revogene fino all'ottenimento dei risultati.

### PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il Revogene automatizza l'omogeneizzazione e la diluizione dei campioni, nonché la lisi delle cellule, l'amplificazione del DNA e l'identificazione dei prodotti PCR amplificati. L'intervento dell'utente è richiesto solo per rilasciare il campione del paziente nella Sample Buffer Tube (SBT) con il trasferimento del campione dall'SBT nella PIE e il caricamento/scaricamento delle PIE nel carosello del Revogene.

Ogni PIE è un dispositivo chiuso completamente integrato in cui un campione viene distribuito e trattato attraverso vari canali e camere microfluidici, che consentono il trattamento del campione (ovvero, omogeneizzazione e diluizione del campione e lisi delle cellule) e successive fasi di PCR in tempo reale. Il liquido di un singolo campione viene trasferito tramite centrifugazione da una camera alla successiva, in sequenza, e tutti i reagenti specifici per la reazione PCR vengono incorporati ed essiccati all'interno dei pozetti PCR (Figura 1).



**Figura 1. Vista dall'alto di una cartuccia PIE**  
1: Camera di caricamento del campione, 2: Camera di troppo pieno, 3: Camera di omogeneizzazione contenente PrC,  
4: Camera di diluizione/lisi, 5: Tre (3) pozetti per PCR (da A a C da sinistra a destra) e una (1) camera di scarico (all'estremità destra).

In ogni PIE è incorporato un controllo di processo (PrC) per verificare le fasi di trattamento del campione e amplificazione. Il PrC consente la verifica di potenziali sostanze inibitorie, oltre del guasto di elementi microfluidici, di strumenti o di reagenti. I prodotti amplificati vengono individuati in tempo reale tramite sonde basate sulla chimica TaqMan® con target specifico. Non è necessario alcun intervento di operatori una volta caricata una PIE nel Revogene.

Il Revogene è in grado di trattare da uno a otto campioni simultaneamente durante la stessa analisi. Il carosello deve contenere otto PIE per mantenere l'equilibrio termodinamico nel ciclo. Al termine di un'analisi, i risultati vengono calcolati dal sistema in base ai segnali fluorescenti misurati e agli algoritmi di calcolo incorporati. I risultati che vengono visualizzati sul touchscreen possono essere stampati, trasferiti e/o archiviati dall'utente impiegando la porta USB o l'opzione di connettività.

### REAGENTI E MATERIALI

Il kit C. difficile contiene reagenti e materiali sufficienti per elaborare 24 campioni. Il kit contiene i seguenti materiali:

1. 24 Disposable Transfer Loop (LOOP): il LOOP è costituito da un loop monouso da 5 microlitri ( $\mu$ L) per il trasferimento del campione di fuci non formate (liquide o molli) nella SBT
2. 24 Disposable Transfer Tool (DTT): il DTT è una pipetta di trasferimento monouso per il trasferimento del campione dalla SBT alla PIE.
3. 24 Sample Buffer Tube (SBT): provetta con codice a barre contenente soluzione tamponata TE 1X (Tris-HCl pH 8.0/EDTA.Na2) come tampone di diluizione e conservazione per campioni.
4. 24 buste singole contenenti una (1) PIE C. difficile: dispositivo integrato con codice a barre, composto dai reagenti essiccati necessari per le fasi di elaborazione dei campioni e di PCR in tempo reale per l'amplificazione e il rilevamento simultanei del DNA del PrC e del DNA del gene della tossina B di C. difficile.

### MATERIALI/APPARCCHIATURE NECESSARI MA NON FORNITI

1. Revogene® (n. cat. 610210)
2. Guanti monouso senza polvere
3. Mixer Vortex con velocità massima di almeno 3 200 giri/min
4. Supporto per campioni (n. cat. 132539; opzionale)
5. MOCK PIE (n. cat. 610208; opzionale)

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Questo prodotto può essere utilizzato solo nel Revogene.
- Non utilizzare il kit se alla consegna l'etichetta che sigilla la confezione esterna non è integra.
- Non utilizzare le PIE C. difficile se alla consegna le buste protettive sono aperte o non integre.
- Non abbinare DTT, SBT e PIE provenienti da diversi lotti di kit.
- Ogni LOOP, DTT e PIE C. difficile monouso viene utilizzato per il trattamento di un campione. Non riutilizzare LOOP, DTT o PIE.
- Maneggiare i campioni sempre come se fossero contagiosi e conformemente alle Buone pratiche di laboratorio, come quelle descritte nella biosicurezza di laboratori biomedici e microbiologici<sup>11</sup> e nel documento CLSI M29-A4<sup>12</sup>.
- Indossare guanti senza polvere monouso quando si maneggiano campioni e lavarsi le mani accuratamente dopo la manipolazione.
- La PIE C. difficile contiene reagenti essiccati. La busta protettiva non deve essere aperta finché non si è pronti a eseguire il test.
- Smaltire i materiali e i reagenti inutilizzati e i rifiuti, comprese le PIE usate, conformemente alle normative nazionali, federali, provinciali, statali e locali.
- Non aprire o disfare la PIE dopo l'uso per evitare la contaminazione con prodotti di amplificazione e/o particelle contagiose.
- Non utilizzare una PIE che sia stata fatta cadere, agitata o capovolta dopo il caricamento del campione, poiché ciò potrebbe dare risultati non validi.
- La procedura analitica C. difficile non fornisce risultati di suscettibilità. Per la coltura e per eseguire test di suscettibilità sono necessari tempi più lunghi.
- Non usare kit oltre la data di scadenza indicata.
- Non refrigerare la PIE caricata.
- Una quantità eccessiva di feci rispetto alla quantità consigliata può inibire la procedura analitica C. difficile.
- Ogni analisi deve essere eseguita con otto PIE nel carosello del Revogene per mantenere l'equilibrio termodinamico e meccanico durante l'analisi.

## DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Per le nostre attuali conoscenze, non ci sono rischi associati a questo prodotto.

## CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Durante il trasporto i campioni raccolti devono essere conservati a una temperatura tra 2 C e 25 C.
- I campioni di feci possono essere conservati a 25 C per un massimo di 2 giorni o a 2-8 C per un massimo di 4 giorni. L'SBT inoculata può essere conservata a 25 C per un massimo di 2 giorni o a 2-8 C per un massimo di 3 giorni.
- Conservare il kit C. difficile a 2-25 C. La data di scadenza è riportata sull'etichetta del kit.
- Non aprire una busta finché non si è pronti a eseguire il test. Usare la PIE entro 1 ora dall'apertura della busta.

## ISTRUZIONI PER L'USO

### RACCOLTA E TRASPORTO DEI CAMPIONI

Tipo di campioni: campioni di feci non formate (liquide o molli) ottenuti da pazienti con sospetto di CDI.

Raccogliere le feci non formate in un contenitore asciutto e pulito conformemente alle linee guida o procedure locali.

- Trasferire le feci liquide o molli (ma non l'urina) nel contenitore. Evitare di mescolare carta igienica, acqua o sapone con il campione.
- Etichettare il contenitore con l'ID del paziente o del campione e inviarlo al laboratorio per il test (consultare la sezione Conservazione e stabilità).

### PREPARAZIONE E GESTIONE DEI CAMPIONI

**NOTA 1:** iniziare il test entro 1 ora dall'apertura della busta contenente la PIE.

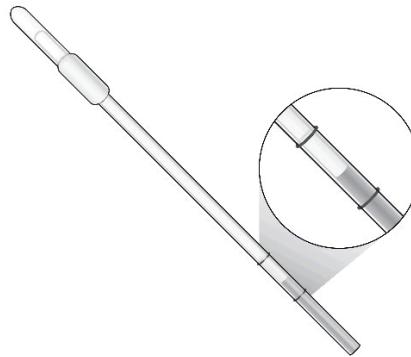
#### PREPARAZIONE DELL'SBT

- Per ogni campione da analizzare, estrarre un LOOP e una SBT dalla confezione del kit.
- Identificare (o etichettare) l'SBT con l'identificazione appropriata del campione senza nascondere o scrivere sui codici a barre. Collocare l'SBT nel supporto per campioni Revogene, se utilizzato.
- Trattare il campione con il mixer Vortex a velocità massima per 15 secondi. Immergere nelle feci il LOOP fornito. Rimuovere le feci molli in eccesso presenti sul lato esterno dell'anello, in modo da prelevare 5 µL circa.
- Rimuovere il tappo dall'SBT, agitare il LOOP nell'SBT per 2-3 secondi e/o vorticare per rimuovere il campione dall'anello. Assicurarsi che solo un'SBT alla volta sia aperta.
- Riposizionare il tappo sull'SBT, chiudere saldamente il tappo dell'SBT e collucciarla sul supporto per campioni Revogene, se utilizzato.
- Preparare i campioni aggiuntivi per il test ripetendo le fasi da 1 a 5, quindi passare alla fase 7.
- Alla fine della preparazione di tutti i campioni, passare alla preparazione della PIE C. difficile (sezione successiva).

#### PREPARAZIONE DELLA PIE

**NOTA 1:** Elaborare un campione alla volta:

- Trattare con il mixer Vortex l'SBT per 15 secondi a velocità massima.
- Togliere il sigillo PIE sacchetto.
- Collocare la PIE C. difficile nel supporto per campioni Revogene, se utilizzato.
- Estrarre un DTT dalla confezione del kit e aspirare l'SB (Sample Buffer) comprimendo l'intero bulbo. Il livello del liquido nel DTT deve trovarsi in un punto qualsiasi tra i due contrassegni (**Figura 2**). Se il livello del liquido non si trova tra i due contrassegni, rilasciare il volume dell'SB completamente nell'SBT comprimendo l'intera pompetta e ripetere la fase 11.
- Rilasciare completamente l'SB nella camera di caricamento del campione della PIE (**Figura 1**).
- Chiudere saldamente il tappo della PIE, assicurandosi che il blocco del tappo sia bene in posizione. Non refrigerare la PIE caricata. Assicurarsi che solo una PIE alla volta sia aperta.
- Ripetere le fasi da 8 a 13 per qualsiasi campione aggiuntivo, quindi passare alla fase 15.
- I campioni di feci e l'SBT inoculata possono essere conservati a 2-8 C o a 25 C entro il periodo di tempo indicato nella sezione Conservazione e stabilità.



**Figura 2.**  
Rappresentazione di un livello di campione di tampone appropriato con il Disposable Transfer Tool (DTT).

#### FUNZIONAMENTO DEL REVOGENE

**NOTA 1:** un massimo di otto campioni può essere trattato simultaneamente durante un'unica analisi utilizzando il Revogene (inclusi i controlli esterni).

**NOTA 2:** ogni analisi deve essere eseguita con otto PIE nel Revogene. Quando vengono trattati meno di otto campioni, riempire i posti vuoti con MOCK PIE\*.

**NOTA 3:** consultare il Manuale dell'utente<sup>13</sup> del Revogene per ulteriori informazioni riguardanti l'impostazione e il funzionamento del Revogene.

- Accendere il Revogene (se non è già stato fatto). Il software viene lanciato automaticamente.
- Accedere immettendo il <Nome utente> e la <Password> e toccare <Accesso>. Il menu principale comparirà automaticamente.
- Toccare <Configura ciclo>.
- Immettere l'identificazione del campione utilizzando lo scanner dei codici a barre o immettendola manualmente. L'immissione manuale può essere eseguita toccando l'icona lapis della riga <Esegui scansione o immetti ID campione>.
- Immettere i codici a barre dell'SBT e della PIE C. difficile utilizzando lo scanner dei codici a barre del Revogene. Collocare con cautela la PIE verticalmente davanti allo scanner. Oppure, i codici a barre dell'SBT e della PIE possono essere immessi manualmente (toccare l'icona lapis delle loro rispettive righe). Maneggiare la PIE con cura, senza farla cadere, agitarla o capovolgendola.
- (Opzionale) Toccare l'icona lapis della riga <Aggiungi commenti> e digitare un commento.
- Inserire la PIE C. difficile nel Revogene, in una postazione qualsiasi del carosello. Il software associa automaticamente il campione e l'SBT alla PIE C. difficile corretta.
- Confermare che la PIE sia inserita nello strumento toccando <OK> sulla riga <Inserisci la PIE nello strumento> e ripetere le fasi da 4 a 8 per tutti i campioni.
- Quando tutte le PIE C. difficile sono state inserite nello strumento e le MOCK PIE sono state aggiunte come necessario, toccare <Avanti>.
- Eseguire la scansione dell'anello di ritenuta e collocarlo sul carosello. Chiudere il coperchio dello strumento.
- Iniziare l'analisi del test toccando <Avvio>.

\* Se MOCK PIE non sono disponibili, utilizzare PIE per la procedura analitica non usate riempite con SB non inoculato (VUOTO) o con controlli esterni.

## VISUALIZZAZIONE ED ESPORTAZIONE DEI RISULTATI

NOTA 1: consultare il Manuale dell'utente<sup>13</sup> del Revogene per ulteriori informazioni riguardanti l'acquisizione dei risultati del test.

1. Una volta completata l'analisi, il coperchio si apre automaticamente.
2. Toccare l'icona **casa**.
3. Se il Revogene si è disconnesso, immettere nuovamente il <nome utente> e la <password> e toccare <Accesso>. Il menu principale comparirà automaticamente.
4. Toccare l'icona <Risultati> per accedere ai risultati del test.
5. Toccare <Ultimo ciclo> per vedere i risultati del test più recente.
6. Da <Ultimo ciclo> selezionare i campioni per i quali si devono esportare i resoconti dei risultati. Tutti i campioni possono essere selezionati in una volta facendo clic sulla prima casella a sinistra della colonna "ID campione".
7. Toccare <Esporta> e salvare ove appropriato (per es., su chiavetta USB).
8. Rimuovere l'anello di ritenuta e le PIE C. difficile dal Revogene. Le PIE C. difficile utilizzate devono essere smaltite nei contenitori per rifiuti appropriati, conformemente alle prassi standard dell'istituto.

## PROCEDURA DI RIPETIZIONE DEL TEST

### RISULTATO IRRISOLTO O INDETERMINATO PER UN CAMPIONE

Quando un risultato irrisolto (UNR) o indeterminato (IND) viene ottenuto per un campione, deve essere ripetuto il test con l'SBT inoculata corrispondente entro il periodo di tempo specificato descritto nella sezione **Conservazione e stabilità**. È consentito ripetere solo un test con l'SBT.

Trattare l'SBT con il mixer Vortex per un minimo di 15 secondi a velocità massima. Utilizzare una nuova busta, seguire le fasi da 9 a 13 della sezione **Preparazione e gestione dei campioni/Preparazione della PIE**, quindi attenersi alla sezione **Funzionamento del Revogene**.

### RISULTATO IRRISOLTO, INDETERMINATO, FALSO NEGATIVO O FALSO POSITIVO PER UN CONTROLLO ESTERNO

Quando un risultato irrisolto, indeterminato, falso negativo o falso positivo viene ottenuto per un controllo esterno, l'analisi non è valida. I test dei campioni inclusi nell'analisi devono essere ripetuti utilizzando l'SBT inoculata corrispondente, insieme a controlli esterni appena preparati, entro il periodo di tempo specificato descritto nella sezione **Conservazione e stabilità**. Consultare la sezione seguente **Controllo di qualità** per la preparazione di controlli esterni freschi.

Per la ripetizione del test con l'SBT inoculata corrispondente, trattare l'SBT con il mixer Vortex per un minimo di 15 secondi a velocità massima. Utilizzare una nuova busta, seguire le fasi da 9 a 13 della sezione **Preparazione e gestione dei campioni/Preparazione della PIE**, quindi attenersi alla sezione **Funzionamento del Revogene**.

### CONTROLLO DI QUALITÀ

Le procedure del controllo di qualità monitorano l'accuracy e la precisione del processo analitico. Ogni laboratorio deve stabilire la quantità, il tipo e la frequenza dei materiali di controllo per i test in base alle normative applicabili o alle direttive degli enti di accreditamento. La procedura descritta di seguito può essere utilizzata, se pertinente, in base alle regole e alle procedure locali.

**NOTA 1: LOOP, DTT, SBT e PIE separati devono essere utilizzati per la preparazione di ogni controllo esterno.**

1. Ogni PIE C. difficile contiene un controllo di processo (PrC) che verifica l'omogeneizzazione e la diluizione dei campioni, la lisì delle cellule, l'inibizione dell'amplificazione del DNA e l'insuccesso dei reagenti della procedura analitica.
2. La buona pratica di laboratorio consiglia l'utilizzo di materiali di controllo. L'utente deve attenersi alle linee guida appropriate che riguardano l'esecuzione di controlli esterni. Si consiglia l'esecuzione di un Controllo esterno positivo e di un Controllo esterno negativo almeno quotidianamente, finché non viene raggiunta un'adeguata convalida del processo con la procedura analitica C. difficile sul Revogene in ogni ambiente di laboratorio.
3. I materiali di controllo esterno non sono forniti da Meridian Bioscience, Inc. I controlli esterni non vengono utilizzati dal software del Revogene per l'interpretazione dei risultati dei test dei campioni. I controlli esterni vengono trattati come se fossero campioni.
4. Si consigliano vari tipi di controlli esterni per consentire all'utente di selezionare il più appropriato per il suo programma di controllo di qualità di laboratorio. Trattare e testare le preparazioni di controlli esterni conformemente alla sezione **Preparazione e gestione dei campioni**.

Controllo positivo esterno:

1. Una sospensione cellulare appena preparata di un ceppo di C. difficile tossicogeno, che trasporta il gene *tcdB*, da materiale di controllo disponibile in commercio (per es., ATCC® 43255™) preparato a  $0,5 \pm 0,05$  McFarland e 1/2 diluito in soluzione fisiologica (per es., soluzione fisiologica preparata BD BBL™, n. cat. 221819), è consigliata per essere utilizzata come controllo esterno positivo.
2. Oppure, anche un campione di fuci precedentemente caratterizzato positivo per il C. difficile tossicogeno potrebbe essere utilizzato come controllo esterno positivo.

Controllo negativo esterno:

1. Una sospensione cellulare appena preparata di un ceppo di C. difficile non tossicogeno da materiale di controllo disponibile in commercio (per es., ATCC® 43593™) preparato a  $0,5 \pm 0,05$  McFarland in soluzione fisiologica (per es., soluzione fisiologica preparata BD BBL™, n. cat. 221819), è consigliata per essere utilizzata come controllo esterno negativo.
2. Oppure, anche un campione di fuci precedentemente caratterizzato negativo per il C. difficile tossicogeno potrebbe essere utilizzato come controllo esterno negativo.

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati vengono calcolati dal Revogene in base ai segnali fluorescenti misurati e agli algoritmi di calcolo incorporati e sono disponibili nella finestra "Risultati". I possibili risultati sono:

Campione	Simbolo	Risultato	Interpretazione
Campione del paziente		Positivo	DNA target di C. difficile tossicogeno individuato.
		Negativo	DNA target di C. difficile tossicogeno non individuato.
		Irrisolto	Guasto nell'amplificazione/rilevazione per il Controllo di processo e per il DNA target di C. difficile tossicogeno. Potrebbe essere causato da campioni inibitori o guasto dei reagenti o degli elementi microfluidici. Il test deve essere ripetuto (consultare la sezione <b>Procedura di ripetizione del test</b> per ulteriori informazioni).
		Indeterminato	Nessun risultato da segnalare a causa di un possibile errore di rilevazione del Revogene durante la procedura analitica, l'analisi dei dati o se il ciclo viene interrotto dall'utente. Il test deve essere ripetuto (consultare la sezione <b>Procedura di ripetizione del test</b> per ulteriori informazioni).
Controllo esterno positivo		Positivo	Risultato valido del controllo esterno positivo.
		Negativo	Un controllo esterno positivo che dà un risultato negativo indica un problema di gestione/preparazione del campione. <b>L'analisi non è valida</b> . Rivedere la tecnica di gestione/preparazione del campione. Il test deve essere ripetuto (consultare la sezione <b>Procedura di ripetizione del test</b> per ulteriori informazioni).
		Irrisolto	Risultati errati del controllo esterno positivo. <b>L'analisi non è valida</b> . Il test deve essere ripetuto (consultare la sezione <b>Procedura di ripetizione del test</b> per ulteriori informazioni).
		Indeterminato	Risultato errato del controllo esterno positivo. <b>L'analisi non è valida</b> . Il test deve essere ripetuto (consultare la sezione <b>Procedura di ripetizione del test</b> per ulteriori informazioni).
Controllo esterno negativo		Positivo	Un controllo esterno negativo che dà un risultato di test positivo indica un problema di gestione e/o contaminazione del campione. <b>L'analisi non è valida</b> . Rivedere la tecnica di gestione del campione. Il test deve essere ripetuto (consultare la sezione <b>Procedura di ripetizione del test</b> per ulteriori informazioni).
		Negativo	Risultato valido del controllo esterno negativo.
		Irrisolto	Risultato errato del controllo esterno negativo. <b>L'analisi non è valida</b> . Il test deve essere ripetuto (consultare la sezione <b>Procedura di ripetizione del test</b> per ulteriori informazioni).
		Indeterminato	Risultato errato del controllo esterno negativo. <b>L'analisi non è valida</b> . Il test deve essere ripetuto (consultare la sezione <b>Procedura di ripetizione del test</b> per ulteriori informazioni).

## LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- La procedura analitica *C. difficile* deve essere utilizzata solo nel Revogene da personale addestrato.
- La procedura analitica *C. difficile* non è indicata per distinguere i portatori di *C. difficile* da coloro con infezione da *C. difficile*.
- La procedura analitica *C. difficile* non fornisce risultati di suscettibilità. Sono necessari isolati di coltura per l'esecuzione di test di suscettibilità.
- Le caratteristiche delle prestazioni della procedura analitica *C. difficile* sono state stabilite con campioni di fuci non formate (liquide o molli) raccolti da pazienti con sospetta infezione da *C. difficile*. L'utilizzo della procedura analitica *C. difficile* per tipi di campioni clinici diversi da quelli specificati non è stato valutato e le caratteristiche di prestazione non sono state stabiliti.
- I risultati con la procedura analitica *C. difficile* devono essere utilizzati in aggiunta alle osservazioni cliniche e ad altre informazioni disponibili per il medico.
- I risultati della procedura analitica possono essere influenzati da una terapia antimicrobica concomitante poiché il DNA di *C. difficile* può continuare a essere individuato.
- Un risultato di test positivo non indica necessariamente la presenza degli organismi in questione. Tuttavia, si presume la presenza di DNA di *C. difficile* tossicogeno.
- I risultati di test errati possono verificarsi a causa della raccolta, gestione o conservazione sbagliata del campione, di un errore tecnico o di uno scambio di campioni. Per evitare risultati errati è necessario osservare attentamente le istruzioni in questo inserto, il Manuale dell'utente<sup>13</sup> del Revogene e le linee guida stabilito.
- Un risultato negativo non esclude la possibilità di una colonizzazione da *C. difficile*. Risultati falsi negativi possono verificarsi quando la concentrazione di *C. difficile* è sotto il limite di individuazione dell'analisi. Se il paziente presenta segni o sintomi di infezione, devono essere utilizzati altri test di laboratorio e informazioni cliniche per confermare il risultato negativo.
- La contaminazione o risultati falsi negativi possono verificarsi se il tappo di una PIE viene chiuso in maniera errata.
- Sebbene non vi siano ceppi/isolati noti di *C. difficile* tossicogeno privo del gene *tcfb*, l'occorrenza di un ceppo di questo tipo potrebbe portare a un risultato errato con la procedura analitica *C. difficile*.
- Mutazioni o polimorfismi in regioni legate al primer o alla sonda possono avere un impatto negativo sull'individuazione di varianti del gene *tcfb* del *C. difficile*, dando risultati falsi negativi con la procedura analitica *C. difficile*.
- Il carbonato di calcio (per es. Tums®) o l'idrossido di alluminio/idrossido di magnesio (per es. Stomax®) potrebbero inibire l'individuazione di *C. difficile* tossicogeno se una di queste sostanze è presente nel campione di tampone a una concentrazione di > 0,5 mg/mL o > 0,5 µL/mL rispettivamente.
- La presenza di *Clostridium sordellii* a un caricoamento > 10<sup>5</sup> CFU/mL di campione di tampone può portare all'individuazione di risultati falsi positivi.
- Un effetto combinatorio di *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* O157:H7 ed *Helicobacter pylori*, a ≥ 10<sup>6</sup> CFU/mL in campione di tampone, può avere un effetto inibitorio sull'individuazione di *C. difficile* tossicogeno.
- Un effetto combinatorio di *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Vibrio parahaemolyticus*, a ≥ 10<sup>6</sup> CFU/mL in campione di tampone, può avere un effetto inibitorio sull'individuazione di *C. difficile* tossicogeno.

## VALORI PREVISTI

La prevalenza di infezione da *C. difficile* (CDI) dipende da diversi fattori, fra cui la predisposizione all'infezione a causa di una terapia precedente con antibiotici ad ampio spettro, la presenza di sintomi e lo standard del test di cura. In uno studio prospettico e retrospettivo combinato, i campioni sono stati raccolti presso 8 centri clinici diversi geograficamente da 2581 soggetti nella gamma di età fra 0-2 anni e oltre 60 anni. Dei 2461 campioni che soddisfacevano tutti i criteri di inclusione senza soddisfare alcuno dei criteri di esclusione, 333 erano positivi in base ai risultati combinati di coltura tossicogena diretta e arricchita per una prevalenza osservata di 13,5% [333/2461; 95% IC: 12,2 – 15%]. La percentuale di risultati positivi osservati con la procedura analitica *C. difficile* Revogene® nella popolazione dello studio è stata dell'11,5% [283/2461; 95% IC: 10,3 – 12,8%].

## CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONI CLINICHE

Le prestazioni cliniche della procedura analitica Revogene *C. difficile* sono state stabilite in uno studio multicentrico, prospettico e retrospettivo, approvato da un Comitato etico indipendente (IEC), paragonando i risultati con coltura tossicogena utilizzando i campioni rimasti di fuci non formate (liquide o molli) non identificate di soggetti con sospetta CDI. Duemilacinquecentottantuno (2581) campioni sono stati raccolti prospetticamente presso sette centri diversi geograficamente negli Stati Uniti e in Canada tra il 4 febbraio 2017 e il 15 luglio 2017 da soggetti idonei sintomatici. Sono stati arruolati solo campioni che soddisfacevano i criteri di inclusione dello studio e non soddisfacevano alcuno dei criteri di esclusione. Duemilattrocentosessantatré (2463) campioni sono stati usati per stabilire le prestazioni del test Revogene *C. difficile* tramite paragone con il metodo di coltura diretta e arricchita combinata. Tutti i 2463 campioni appena raccolti sono stati testati nella coltura, 798 sono stati testati con la procedura analitica *C. difficile* Revogene® come campioni freschi e un sottogruppo di 1665 campioni è stato congelato per essere testato successivamente con la procedura analitica Revogene *C. difficile*.

La coltura tossicogena è stata eseguita presso un laboratorio di riferimento centrale e la procedura analitica Revogene *C. difficile* è stata eseguita in sette centri considerati esperti. Il metodo della coltura tossicogena includeva la coltura diretta e arricchita seguita dal test di citotossicità. Il metodo della coltura diretta consisteva nel trasferimento di un tampone del campione di fuci dal mezzo di trasporto anaerobico ai mezzi anaerobici selettivi preridotti, una piastra standard contenente cicloserina, cefotaxima e fruttosio agar (CCFA), seguita dal test di citotossicità su colonie di *C. difficile* isolate dalle fuci. In breve, l'identità delle colonie isolate in colture dirette che assomigliavano morfologicamente al *C. difficile* (aspetto simile a vetro smerigliato giallo con odore simile a quello di un cortile) è stata confermata tramite il test di intolleranza aerobica su piastre di agar cioccolato e una piastra di agar sangue (BAP) in condizioni anaerobiche.

Una volta identificate le colonie, è stata preparata una seconda piastra BAP contenente un disco di vancomicina (5 mcg) e un anello inoculo è stato utilizzato per inoculare un brodo di carne spezzettata anaerobico. Il brodo inoculato è stato incubato anaerobicamente a 35-37 °C per 48 ore per il test di citotossicità usando l'analisi di neutralizzazione di citotossicità delle cellule (CCNA; test di citotossicità per la tossina del *Clostridium difficile*, ibridi diagnostici). Per il metodo di coltura arricchita, lo stesso tampone utilizzato per inoculare la piastra di CCFA è stato usato per inoculare una provetta di brodo di cicloserina-cefotaxima-mannitol con taurocolato e lisozima (CCMB-TAL). Il brodo di arricchimento è stato sottocolturato su un'altra piastra di CCFA e ha seguito la stessa procedura utilizzata per il metodo diretto. Un campione è stato considerato positivo per il *C. difficile* tossicogeno se il *C. difficile* era stato recuperato dalle fuci tramite coltura diretta o arricchita e se gli isolati batterici risultavano positivi al test tramite CCNA. Se il *C. difficile* è stato isolato dalla coltura diretta e l'isolato è risultato positivo al test di citotossicità, la coltura di arricchimento non è stata analizzata ulteriormente. I campioni sono stati classificati come negativi per il *C. difficile* tossicogeno solo se sono risultati negativi al test tramite coltura diretta e combinata, ovvero coltura diretta e arricchita.

I valori di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (PPV) e valore predittivo negativo (NPV) sono stati calcolati paragonando i risultati della procedura analitica *C. difficile* Revogene® con i risultati combinati del metodo di coltura diretta e arricchita (metodo di riferimento). È stata eseguita un'analisi incongruente su una parte di campioni con risultati discordanti tra la procedura analitica *C. difficile* Revogene® e il metodo di coltura combinata utilizzando analisi PCR di routine di quattro centri. Infine, la percentuale di concordanza positiva (PPA) e la percentuale di concordanza negativa (NPA) sono state determinate paragonando la procedura analitica *C. difficile* Revogene® con i risultati di coltura diretta.

## RISULTATI

I dati demografici della popolazione dello studio sono presentati nella Tabella 1.

Tabella 1. Dati demografici della popolazione dello studio di tutti i campioni conformi a tutti i livelli

Soggetti	Tutti i soggetti N=2461	Freschi N=797	Congelati N=1664
<b>Fonte di campione</b>			
Paziente ricoverato	1804 (73,3%)	617 (77,4%)	1187 (71,3%)
Paziente ambulatoriale	420 (17,1%)	123 (15,4%)	297 (17,8%)
Pronto soccorso	234 (9,5%)	57 (7,2%)	177 (10,6%)
Mancante	3 (0,1%)	0 (0,0%)	3 (0,2%)
<b>Categoria di età</b>			
< 2	9 (0,4%)	4 (0,5%)	5 (0,3%)
3-18	105 (4,3%)	30 (3,8%)	75 (4,5%)
19-60	1199 (48,7%)	399 (50,1%)	800 (48,1%)
> 60	1148 (46,6%)	364 (45,7%)	784 (47,1%)

Dei 798 campioni freschi e dei 1665 campioni congelati idonei conformi con il campione e il livello di PCR, rispettivamente 9 e 13 sono risultati irrisolti con il test iniziale (1,1% per i campioni freschi e 0,8% per i campioni congelati) e solo un campione fresco è rimasto irrisolto dopo avere ripetuto il test. Il tasso di risultati irrisolti dopo avere ripetuto il test è stato 0,1% (1/798) per i campioni freschi e 0,0% (0/1665) per i campioni congelati.

Dei 798 campioni freschi e dei 1665 campioni congelati idonei conformi con il campione e il livello di PCR, rispettivamente 12 e 28 sono risultati indeterminati con il test iniziale (1,5% per i campioni freschi e 1,7% per i campioni congelati) e solo un campione congelato è rimasto indeterminato dopo avere ripetuto il test. Il tasso di risultati indeterminati dopo avere ripetuto il test è stato 0,0% (0/798) per i campioni freschi e 0,1% (1/1665) per i campioni congelati.

Il tasso non segnalabile iniziale complessivo è stato 2,6% (21/798) e 0,1% (1/798) dopo avere ripetuto il test per i campioni freschi. Il tasso non segnalabile iniziale complessivo è stato 2,5% (41/1665) e 0,1% (1/1665) dopo avere ripetuto il test per i campioni congelati.

## CONFRONTO CON COLTURA ARRICCHITA E DIRETTA COMBINATA

Le prestazioni cliniche della procedura analitica Revogene *C. difficile* rispetto ai risultati combinati della coltura tossicogena diretta e arricchita vengono presentate nella Tabella 2 per i campioni freschi e nella Tabella 3 per i campioni congelati.

Dei 2463 campioni idonei, 2461 hanno dato risultati validi per la coltura tossicogena diretta, la coltura tossicogena arricchita e la procedura analitica Revogene *C. difficile*. Dei 2461 campioni, 333 erano positivi in base ai risultati combinati di coltura tossicogena diretta e arricchita per una prevalenza osservata di 13,5% [333/2461; 95% IC: 12,2 – 15,0%].

Le caratteristiche delle prestazioni della procedura analitica *C. difficile* ottenute con i campioni di fuci fresche hanno dimostrato una sensibilità dell'80,5% (91/113; 95% IC: 72,0 – 87,4) e specificità del 97,1% (664/684; 95% IC: 95,5 – 98,2%) rispetto al metodo di riferimento (metodo della coltura diretta e arricchita combinata) ottenute con campioni di fuci fresche (Tabella 2).

Tabella 2. Caratteristiche di prestazioni complessive della procedura analitica Revogene *C. difficile* rispetto al metodo di riferimento (metodo della coltura diretta e arricchita combinata) ottenute con campioni di fuci fresche.

Prestazioni complessive Fuci fresche	Metodo di riferimento		
	Positivo	Negativo	Totale
Procedura analitica <i>C. difficile</i>	91	20 <sup>A</sup>	111
	22 <sup>B</sup>	664	686
	113	684	797

Sensibilità: 80,5% (91/113; 95% IC: 72,0 – 87,4%)

Specificità: 97,1% (664/684; 95% IC: 95,5 – 98,2%)

PPV: 82,0% (91/111; 95% IC: 73,6 – 88,6%)

NPV: 96,8% (664/686; 95% IC: 95,2 – 98,0%)

<sup>A</sup> Dei 20 campioni con risultati di test Revogene *C. difficile* falsi positivi relativi alla coltura diretta e arricchita combinata, 8 sono risultati positivi e 4 negativi con un secondo metodo NAAT (analisi PCR di routine dei centri).

<sup>B</sup> Dei 22 campioni con risultati di test Revogene *C. difficile* falsi negativi relativi alla coltura diretta e arricchita combinata, 13 sono risultati negativi e 4 positivi con un secondo metodo NAAT (analisi PCR di routine dei centri).

Le caratteristiche delle prestazioni della procedura analitica *C. difficile* ottenute con i campioni di fuci congelati hanno dimostrato una sensibilità dell'87,3% (192/220; 95% IC: 82,1 – 91,4%) e specificità del 97,3% (1405/1444; 95% IC: 96,3 – 98,1%) rispetto al metodo di riferimento (Tabella 3).

**Tabella 3.** Caratteristiche di prestazioni complessive della procedura analitica Revogene *C. difficile* rispetto al metodo di riferimento (metodo della coltura diretta e arricchita combinata) ottenute con campioni di fuci congelate.

Prestazioni complessive Fuci congelate		Metodo di riferimento		
Procedura analitica <i>C. difficile</i>	Positivo	Positivo	Negativo	Totale
	Negativo	28 <sup>b</sup>	1405	1433
	Totale	220	1444	1664

Sensibilità: 87,3% (192/220; 95% IC: 82,1 – 91,4%)  
 Specificità: 97,3% (1405/1444; 95% IC: 96,3 – 98,1%)  
 PPV: 83,1% (192/231; 95% IC: 77,7 – 87,7%)  
 NPV: 98,0% (1405/1433; 95% IC: 97,2 – 98,7%)

<sup>a</sup> Dei 39 campioni con risultati di test Revogene *C. difficile* falsi positivi relativi alla coltura diretta e arricchita combinata, 17 sono risultati positivi e 15 negativi con un secondo metodo NAAT (analisi PCR di routine dei centri).

<sup>b</sup> Dei 28 campioni con risultati di test Revogene *C. difficile* falsi negativi relativi alla coltura diretta e arricchita combinata, 14 sono risultati negativi e 12 positivi con un secondo metodo NAAT (analisi PCR di routine dei centri).

#### CONFRONTO CON CULTURA DIRETTA

La concordanza clinica della procedura analitica Revogene *C. difficile* rispetto ai risultati della coltura tossicogena diretta viene presentata nella **Tabella 4** per i campioni freschi e nella **Tabella 5** per i campioni congelati.

**Tabella 4.** Caratteristiche di prestazioni complessive della procedura analitica Revogene *C. difficile* rispetto al metodo della coltura diretta ottenute con campioni di fuci fresche.

Prestazioni complessive Fuci fresche		Metodo della coltura diretta		
Procedura analitica <i>C. difficile</i>	Positivo	Positivo	Negativo	Totale
	Negativo	3	683	686
	Totale	66	731	797

PPA: 95,5% (63/66; 95% IC: 87,3 – 99,1%)  
 NPA: 93,4% (683/731; 95% IC: 91,4 – 95,1%)

**Tabella 5.** Caratteristiche di prestazioni complessive della procedura analitica Revogene *C. difficile* rispetto al metodo della coltura diretta ottenute con campioni di fuci congelate.

Prestazioni complessive Fuci congelate		Metodo della coltura diretta		
Procedura analitica <i>C. difficile</i>	Positivo	Positivo	Negativo	Totale
	Negativo	8	1425	1433
	Totale	168	1496	1664

PPA: 95,2% (160/168; 95% IC: 90,8 – 97,9%)  
 NPA: 95,3% (1425/1496; 95% IC: 94,1 – 96,3%)

#### CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONI ANALITICHE

##### SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica (Limite di rivelabilità, Limit of Detection – LoD) per la procedura analitica *C. difficile* è stata determinata utilizzando una matrice fecale liquida clinica con risultati precedenti del test negativi per il *C. difficile* tossicogeno a cui sono state aggiunte varie concentrazioni di sospensioni batteriche del *C. difficile* tossicogeno. Due ceppi di *C. difficile* tossicogeno (ATCC® 43255™, Ribotipo 087, Tossinotipo 0 e ATCC® BAA-1805™, NAP1, Ribotipo 027, Tossinotipo IIIb) sono stati testati in 24 replicati per concentrazione. Il LoD viene definito come la concentrazione più bassa alla quale il 95% o più di tutti i replicati ha dato un risultato positivo. Per quanto riguarda i due ceppi testati, il LoD della procedura analitica *C. difficile* era 1500 CFU/mL di campione di tampone (SB). I risultati sono stati riassunti nella **Tabella 6**.

**Tabella 6.** LoD della procedura analitica *C. difficile*

Numero ATCC® di ceppo di <i>C. difficile</i> tossicogeno	LoD (CFU/mL di SB)
ATCC® 43255™	1500
ATCC® BAA-1805™	1500

##### INCLUSIVITÀ

L'inclusività della procedura analitica *C. difficile* è stata determinata per 20 ceppi di *C. difficile* tossicogeno rappresentanti 8 diversi tossinotipi di diverse origini geografiche. Ogni ceppo è stato testato da una coltura di cellule quantizzate con un'aggiunta in una matrice di fuci liquide negative al *C. difficile* tossicogeno a un carico di 3750 CFU/mL di SB, corrispondente a due-tre volte il valore LoD del ceppo ATCC® 43255™. Tre replicati per ceppo sono stati testati utilizzando 3 diversi lotti di kit di *C. difficile*. Tutti i ceppi di *C. difficile* tossicogeno testati sono stati rilevati a 3750 CFU/mL di SB. I ceppi testati sono descritti nella **Tabella 7**.

**Tabella 7.** Ceppi di *C. difficile* tossicogeno testati per inclusività con la procedura analitica *C. difficile*

Ceppi di <i>C. difficile</i> tossicogeno	Tossinotipo
ATCC® 9689™	(Tossinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 700792™	(Tossinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 17858™	(Tossinotipo 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1382™	(Tossinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 51695™	(Tossinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 43600™	(Tossinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 43599™	(Tossinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 43596™	(Tossinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 43594™	(Tossinotipo 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1804™	(Tossinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 17857™	(Tossinotipo 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1873™	(Tossinotipo 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1870™	(Tossinotipo IIIb, NAP1, A+, B+)
ATCC® BAA-1803™	(Tossinotipo IIIc, NAP1, A+, B+)
ATCC® BAA-1875™	(Tossinotipo V, A+, B+)
ATCC® 43598™	(Tossinotipo VIII, A-, B+)
CCUG 8864	(Tossinotipo X, A-, B+)
ATCC® BAA-1812™	(Tossinotipo XII, A+, B+)
ATCC® BAA-1814™	(Tossinotipo XXII, A+, B+)
ATCC® BAA-2155™	(Tossinotipo XXII, A+, B+)

Inoltre, un'analisi *in silico* è stata eseguita il 20 luglio 2017 per valutare l'inclusività dei primer e della sonda del target della procedura analitica *C. difficile* riguardo a 52 ceppi di *C. difficile* tossicogeno elencati nel database del Centro Nazionale per Informazioni di Biotecnologia (NCBI). I risultati di convergenza non hanno mostrato alcuna discrepanza con le 52 sequenze selezionate. L'analisi prevedeva l'individuazione di tutti questi ceppi di *C. difficile* tossicogeno.

##### REATTIVITÀ CROCIATA

La reattività crociata della procedura analitica *C. difficile* è stata valutata con alti carichi di organismi non presi di mira dal test, o filogeneticamente correlati al *C. difficile*, o ceppi di *C. difficile* non tossicogeno, o presenti nella normale flora intestinale. Lo studio includeva 50 batteri, 1 lievito, 7 virus e DNA umano (**Tabella 8**). I batteri e il lievito sono stati testati a un caricoamento di  $\geq 10^6$  CFU/mL di SB. Sono stati testati acidi nucleici da 6 virus e DNA umano al carico di SB DNA  $\geq 10^5$  o RNA copie/mL. Questi organismi sono stati testati utilizzando colture di cellule quantizzate o soluzioni di acidi nucleici con un'aggiunta in una matrice di fuci liquide negative al *C. difficile*. Ogni organismo è stato testato in triplice copia di PCR.

Alle condizioni dello studio, il *Clostridium sordellii* è stato individuato dalla procedura analitica *C. difficile* a un caricoamento di circa  $10^6$  CFU/mL di SB per un replicato su 3, ma è stato trovato non reattivo a un caricoamento di circa  $10^5$  CFU/mL di SB. I ceppi di *Clostridium novyi* e *Clostridium scindens* hanno prodotto reazioni false positive in un replicato su sei testati a circa  $10^6$  CFU/mL di SB. Non è stata osservata alcuna reattività per tre replicati testati a  $10^6$  CFU/mL di SB. Il ceppo di *Enterococcus faecalis* ha prodotto reazioni false positive in un replicato su tre testati a circa  $10^7$  CFU/mL di SB. Non è stata osservata alcuna reattività per tre replicati testati a  $10^6$  CFU/mL di SB. Gli altri organismi e acidi nucleici testati sono stati trovati non reattivi con la procedura analitica *C. difficile*.

Solo per il *Coxsackievirus*, la reattività crociata con primer e sonde della procedura analitica *C. difficile* è stata valutata da un'analisi *in silico* eseguita su tutte le sequenze di ceppi di *Coxsackievirus* contenute nel database del Centro Nazionale per Informazioni di Biotecnologia (NCBI) tra il 7 febbraio 2017 e l'11 agosto 2017. L'analisi suggeriva che i ceppi di *Coxsackievirus* non dovrebbero essere reattivi con la procedura analitica *C. difficile*.

Tabella 8. Elenco di organismi testati per la reattività crociata con la procedura analitica *C. difficile*

Batteri	
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> ( <i>Campylobacter coli</i> )	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>
<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Clostridium novyi</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Flavonifractor plautii</i> ( <i>Clostridium orbiscindens</i> )	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Clostridium scindens</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Clostridium difficile</i> (non tossicogeno) – ATCC® 43593™	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Clostridium difficile</i> (non tossicogeno) – ATCC® 43601™	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizona</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Shigella boydii</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella sonnei</i>
Lievito	
<i>Candida albicans</i>	
Virus	
Adenovirus 1 umano (DNA)	Rotavirus (RNA)
Enterovirus D68 (RNA)	Norovirus (RNA)
Echovirus 4 (RNA)	Herpes virus 5 umano (Citomegalovirus) (DNA)
Coxsackievirus ( <i>in silico</i> )	
DNA umano	
gDNA umano	

**ORGANISMI INTERFERENTI**

Il potenziale effetto inibitorio di 30 organismi che possono essere presenti nella normale flora intestinale e che non sono presi di mira dal test è stato valutato utilizzando organismi selezionati dallo studio di reattività crociata (Tabella 8). Ogni categoria di organismi (ovvero, batteri, lievito, virus) è stata rappresentata prestando particolare attenzione a includere gli agenti causativi più frequenti di infezioni del tratto intestinale. Sono stati preparati gruppi di 2-6 organismi in una matrice di fuci liquide negative al *C. difficile* tossicogeno e testati in duplice in presenza di 3750 CFU/mL di SB del ceppo di *C. difficile* tossicogeno ATCC® 43255™ o 4500 CFU/mL di SB del ceppo di *C. difficile* tossicogeno ATCC® BAA-1805™, per valutare la loro potenziale interferenza all'individuazione di *C. difficile* tossicogeno o PrC. Ogni organismo all'interno del gruppo è stato diluito per raggiungere un caricamento di  $\geq 10^6$  CFU/mL di SB per batterio e lievito e  $\geq 10^5$  copie/mL di SB per virus. I 30 organismi inclusi nello studio sono indicati nella Tabella 9.

Tabella 9. Elenco di organismi testati per l'interferenza con la procedura analitica *C. difficile*

Gruppo 1	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> ( <i>Campylobacter coli</i> )	
Gruppo 2	
<i>Candida albicans</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Clostridium difficile</i> (non tossicogeno) – ATCC® 43593™	<i>Clostridium difficile</i> (non tossicogeno) – ATCC® 43601™
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium sordellii</i>
Gruppo 3	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
<i>Helicobacter pylori</i>	
Gruppo 4	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
Gruppo 5	
<i>Shigella boydii</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Shigella sonnei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Gruppo 6	
Rotavirus (RNA)	Norovirus (RNA)

Nessuno dei 30 organismi presenti a  $\geq 10^6$  CFU/mL di SB per batteri e lievito e  $\geq 10^5$  copie/mL di SB per virus ha interferito con l'individuazione di PrC e con il ceppo di *C. difficile* tossicogeno ATCC® BAA-1805™.

Il gruppo 3 e il gruppo 5 hanno mostrato un potenziale effetto inibitorio all'individuazione del ceppo di *C. difficile* tossicogeno ATCC® 43255™. Tuttavia, quando ogni batterio di questi gruppi è stato testato individualmente a un caricamento di  $\geq 10^6$  CFU/mL di SB in presenza del ceppo di *C. difficile* ATCC® 43255™, nessuno ha interferito.

### SOSTANZE INTERFERENTI

Il potenziale effetto inibitorio di 16 sostanze esogene e 5 endogene che potrebbero essere presenti nel tratto intestinale è stato valutato usando campioni negativi di *C. difficile* tossicogeno e ceppi di *C. difficile* tossicogeno ATCC® 43255™ e ATCC® BAA-1805™ a due-tre volte il LoD (rispettivamente 3750 CFU/mL di SB e 4500 CFU/mL di SB) in presenza di matrice di fuci liquide. Le sostanze sono state testate alla loro concentrazione potenzialmente più elevata che potesse essere trovata in un campione di fuci. I risultati per le 21 sostanze sono indicati nella **Tavola 10**.

I risultati non dimostrano alcuna interferenza segnalabile su PrC. Il carbonato di calcio (per es. Tums®) e l'idrossido di alluminio/idrossido di magnesio (per es. Stomax®) hanno mostrato un potenziale effetto inibitorio all'individuazione di *C. difficile* tossicogeno quando una di queste sostanze era presente nell'SBT a una concentrazione di 5 mg/mL (0,5% P/V) e 5 µL/mL (0,5% V/V) rispettivamente. Quando sono state testate a 0,5 mg/mL (0,05% P/V) o 0,5 µL/mL (0,05% V/V) rispettivamente, queste sostanze non hanno mostrato alcuna interferenza segnalabile con la procedura analitica *C. difficile*.

**Tavola 10.** Elenco di sostanze esogene ed endogene testate con la procedura analitica *C. difficile*.

Sostanze esogene		
Sostanza (nome commerciale)	Concentrazione o quantità in SBT <sup>1</sup>	Risultati <sup>2</sup>
Antifungino/antiprurito vaginale (nistatina)	0,5% P/V	NI
Creme/unguenti (crema all'idrocortisone Personnelle)	0,5% V/V	NI
Creme/unguenti antiemorroidali (Preparation H®)	0,5% V/V	NI
Antiacidi (Tums®)	0,5% P/V	I <sup>3</sup>
Antiacidi (Stomax®)	0,5% V/V	I <sup>4</sup>
Clisteri (olio minerale pesante USP Life BRAND™)	0,5% V/V	NI
Clisteri (mesalazina o acido 5-amminosalicilico)	0,5% P/V	NI
Preservativo con lubrificante spermicida (preservativo Trojan® con lubrificante spermicida)	Quadrato di 2 mm <sup>2</sup>	NI
Farmaco antidiarrea (Pepto Bismol™)	0,5% V/V	NI
Farmaco antidiarrea (Imodium®)	0,5% V/V	NI
Lassativi (Senokot®)	0,5% V/V	NI
Antibiotici orali e topici (vancomicina)	0,5% V/V	NI
Antibiotici orali e topici (metronidazolo)	0,5% P/V	NI
Antinfiammatorio non steroideo (Alevé®)	0,5% P/V	NI
Salviettine umidificate (salviette umidificate gettabili nel WC Equate™)	Quadrato di 2 mm <sup>2</sup>	NI
Salviettine umidificate (Wet Ones®)	Quadrato di 2 mm <sup>2</sup>	NI
Sostanze endogene		
Sostanza	Concentrazione o quantità in SBT <sup>1</sup>	Risultati <sup>2</sup>
Mix di grasso fecale e trigliceridi (C2-C10)	0,5% V/V	NI
Grasso fecale, acido palmítico	1,0% P/V	NI
Grasso fecale, acido stearico	0,5% P/V	NI
Sangue intero	0,5% V/V	NI
Muco	0,5% V/V	NI

<sup>1</sup>P/V: Peso/Volume; V/V: Volume/Volume

<sup>2</sup>I: interferenza con la procedura analitica *C. difficile*; NI: nessuna interferenza con la procedura analitica *C. difficile*

<sup>3</sup>Nessuna interferenza allo 0,05% P/V

<sup>4</sup>Nessuna interferenza allo 0,05% V/V

### TRASFERIMENTO E CONTAMINAZIONE CROCIATA

Il trasferimento e la contaminazione crociata intracorsa e fra un ciclo e l'altro sono stati valutati utilizzando campioni positivi preparati in una matrice di fuci liquide negative al *C. difficile* tossicogeno per raggiungere una concentrazione finale di > 10<sup>7</sup> CFU/mL di SB del ceppo di *C. difficile* tossicogeno ATCC® 43255™. Sono stati testati anche campioni veri negativi preparati esclusivamente con la matrice di fuci liquide negative al *C. difficile* tossicogeno.

Per lo studio intracorsa sono state eseguite un totale di 10 analisi da due operatori con la procedura analitica *C. difficile* su un Revogene. Quattro (4) campioni positivi elevati e 4 campioni negativi sono stati testati da campioni alternanti positivi e negativi in ogni analisi. Per lo studio fra un ciclo e l'altro, un'analisi di 8 replicati di campioni positivi elevati seguita da un'analisi di 8 replicati di campioni negativi è stata eseguita da due operatori, per un totale di 10 analisi su un Revogene.

È stata dimostrata l'assenza di trasferimento e contaminazione crociata.

### RIPRODUCIBILITÀ/PRECISIONE

#### RIPRODUCIBILITÀ

Lo studio di riproducibilità tra un centro e l'altro è stato eseguito in tre centri, da due operatori per centro, durante cinque giorni diversi utilizzando un lotto di kit per procedura analitica *C. difficile*.

Lo studio di riproducibilità tra un lotto e l'altro è stato eseguito in un centro, da due operatori, durante 15 giorni utilizzando tre lotti di kit per procedura analitica *C. difficile* (5 giorni per lotto di kit). Per ogni studio di riproducibilità è stato testato un totale di 120 replicati per campioni negativi e 90 replicati per ogni categoria di campioni positivi, tutti preparati in una matrice di fuci liquide negative al *C. difficile* tossicogeno. Sono stati utilizzati due ceppi di *C. difficile* tossicogeno per campioni positivi: ATCC® 43255™ (tossinotipo 0, Ribotipo 087) e ATCC® BAA-1805™ (tossinotipo IIIb, NAP1, Ribotipo 027).

Le categorie di campioni sono state descritte come segue:

1. Basso positivo (LP): ceppi ATCC® 43255™ e ATCC® BAA-1805™ con aggiunta a 2438 CFU/mL e 2925 CFU/mL di SB, rispettivamente
2. Moderato positivo (MP): ceppi ATCC® 43255™ e ATCC® BAA-1805™ con aggiunta a 3750 e 4500 CFU/mL di SB, rispettivamente
3. Vero negativo (TN): campioni senza ceppo di *C. difficile* tossicogeno

I risultati per ogni categoria di campione testato durante gli studi di riproducibilità tra un centro e l'altro e tra un lotto e l'altro sono mostrati nelle **Tabelle 11** e **12** rispettivamente. Per la riproducibilità tra un centro e l'altro, la percentuale di concordanza complessiva era del 100% per TN, LP ed MP del ceppo di *C. difficile* tossicogeno ATCC® BAA-1805™. La percentuale di concordanza complessiva per LP ed MP del ceppo di *C. difficile* tossicogeno ATCC® 43255™ era del 94,4% e 96,7% rispettivamente (**Tavola 11**). Per la riproducibilità tra un lotto e l'altro, la percentuale di concordanza complessiva era del 100% per TN ed MP delle categorie del ceppo di *C. difficile* tossicogeno ATCC® BAA-1805™ e del 98,9% per LP. La percentuale di concordanza complessiva per LP ed MP del ceppo di *C. difficile* tossicogeno ATCC® 43255™ era del 91,1% e 96,7% rispettivamente (**Tavola 12**).

I valori della soglia del ciclo (Ct) medi complessivi con componenti di variazione (DS e CV %) sono mostrati nelle **Tabelle 11** e **12**.

**Tavola 11.** Risultati dello studio di riproducibilità tra un centro e l'altro con un lotto di kit per procedura analitica *C. difficile*

Categoria	Ceppo di <i>C. difficile</i> tossicogeno (numero ATCC®)	Centro 1		Centro 2		Centro 3		Risultati complessivi/ Totale	Percentuale di concordanza complessiva <sup>1</sup>	95% IC complessivo	Valori Ct <sup>2</sup>		
		Risultati/ Totale	Percentuale di concordanza	Risultati/ Totale	Percentuale di concordanza	Risultati/ Totale	Percentuale di concordanza				Media complessiva	DS	CV %
LP	ATCC® 43255™	27/30	90,0%	28/30	93,3%	30/30	100%	85/90	94,4%	87,5%-98,2%	38,48	1,56	4,05
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%	96,7%-100%	36,37	2,74	7,54
MP	ATCC® 43255™	29/30	96,7%	29/30	96,7%	29/30	96,7%	87/90	96,7%	90,6%-99,3%	37,68	1,63	4,32
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%	96,7%-100%	36,57	1,65	4,52
TN	n.d.	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	97,5%-100%	33,09	1,02	3,09

<sup>1</sup>Per la categoria TN, la percentuale di concordanza è stata calcolata per risultati negativi.

<sup>2</sup>Per le categorie LP ed MP, i valori Ct indicati sono per il target di *C. difficile* tossicogeno. Per la categoria TN, i valori Ct indicati sono per il PrC.

**Tavola 12.** Risultati dello studio di riproducibilità tra un lotto e l'altro in un centro con tre lotti di kit per procedura analitica *C. difficile*

Categoria	Ceppo di <i>C. difficile</i> tossicogeno (numero ATCC®)	Lotto 1		Lotto 2		Lotto 3		Risultati complessivi/ Totale	Percentuale di concordanza complessiva <sup>1</sup>	95% IC complessivo	Valori Ct <sup>2</sup>		
		Risultati/ Totale	Percentuale di concordanza	Risultati/ Totale	Percentuale di concordanza	Risultati/ Totale	Percentuale di concordanza				Media complessiva	DS	CV %
LP	ATCC® 43255™	27/30	90,0%	27/30	90,0%	28/30	93,3%	82/90	91,1%	83,2%-96,1%	38,57	1,72	4,46
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100%	29/30	96,7%	30/30	100%	89/90	98,9%	94,0%-100%	37,02	1,98	5,35
MP	ATCC® 43255™	29/30	96,7%	30/30	100%	28/30	93,3%	87/90	96,7%	90,6%-99,3%	37,55	2,16	5,75
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%	96,7%-100%	36,86	1,31	3,56
TN	n.d.	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	97,5%-100%	33,21	0,90	2,71

<sup>1</sup>Per la categoria TN, la percentuale di concordanza è stata calcolata per risultati negativi.

<sup>2</sup>Per le categorie LP ed MP, i valori Ct indicati sono per il target di *C. difficile* tossicogeno. Per la categoria TN, i valori Ct indicati sono per il PrC.

**PRECISIONE**

Lo studio di precisione è stato eseguito in un centro, da due operatori, durante 12 giorni utilizzando un lotto di kit per procedura analitica *C. difficile*.

Per ogni categoria, tutti i campioni sono stati preparati in una matrice di fuci liquide negative al *C. difficile* tossicogeno. Sono stati utilizzati due ceppi di *C. difficile* tossicogeno per campioni positivi: ATCC® 43255™ (tossinotipo 0, Ribotipo 087) e ATCC® BAA-1805™ (tossinotipo IIb, NAP1, Ribotipo 027).

Le categorie di campioni sono state descritte come segue:

1. Basso positivo (LP): ceppi ATCC® 43255™ e ATCC® BAA-1805™ con aggiunta a 2438 CFU/mL e 2925 CFU/mL di SB, rispettivamente
2. Moderato positivo (MP): ceppi ATCC® 43255™ e ATCC® BAA-1805™ con aggiunta a 3750 e 4500 CFU/mL di SB, rispettivamente
3. Vero negativo (TN): campioni senza ceppo di *C. difficile* tossicogeno

I risultati dello studio di precisione per TN ed LP del ceppo di *C. difficile* tossicogeno ATCC® BAA-1805™ hanno dimostrato una concordanza del 100% e del 97,2% per MP. I risultati dello studio di precisione per LP ed MP delle categorie del ceppo di *C. difficile* tossicogeno ATCC® 43255™ hanno dimostrato una concordanza dell'88,9% e del 95,8% rispettivamente (**Tabella 13**).

**Tabella 13.** Percentuale di concordanza dello studio di precisione in un centro con un lotto di kit per procedura analitica *C. difficile*.

Categoria	Numero ATCC® di ceppo di <i>C. difficile</i> tossicogeno	Percentuale di concordanza complessiva <sup>1</sup>	95% IC complessivo
LP	ATCC® 43255™	88,9%	79,3%-95,1%
	ATCC® BAA-1805™	100%	95,9%-100%
MP	ATCC® 43255™	95,8%	88,3%-99,1%
	ATCC® BAA-1805™	97,2%	90,3%-99,7%
TN	n.d.	100%	96,9%-100%

<sup>1</sup> Per la categoria TN, la percentuale di concordanza è stata calcolata per risultati negativi.

**ETICHETTATURA ELETTRONICA**

È possibile accedere online alla documentazione correlate a questo prodotto al sito Web [www.meridianbioscience.com/pi](http://www.meridianbioscience.com/pi). Inoltre, sono disponibili copie cartacee su richiesta contattando il distributore locale o tramite i numeri di telefono elencati sulla scatola del kit.

L'acquisto di questo prodotto concede i diritti di acquirente ai sensi di determinati brevetti Roche per l'uso esclusivo di offerta di servizi diagnostici in vitro per l'uomo. All'infuori dello specifico diritto d'uso derivante dall'acquisto del prodotto, non viene concesso alcun brevetto general o altra licenza di alcun tipo.

# revogene<sup>®</sup>

## C. difficile

Compatibilité avec le Revogene<sup>®</sup>

REF 410300

IVD Utilisation diagnostique *in vitro*



### UTILISATION PRÉVUE

L'essai Revogene<sup>®</sup> C. difficile réalisé sur l'instrument Revogene est un test diagnostique *in vitro* qualitatif qui, grâce au traitement automatisé des échantillons et à la réaction en chaîne par polymérase en temps réel (PCR), détecte le gène (*tcdB*) codant la toxine B associée à l'infection toxinogène à *Clostridium difficile* (*C. difficile*) dans un échantillon de selles non formées (liquides ou molles) prélevé chez des patients susceptibles de présenter une infection à *C. difficile* (ICD). L'analyse Revogene C. difficile constitue une aide au diagnostic de l'ICD.

### RÉSUMÉ ET EXPLICATION

*C. difficile* est un bacille à Gram positif anaérobie sporulé strict présent dans la flore intestinale normale de 1 à 3 % des adultes et de 45 % des nourrissons<sup>1,2</sup>. La prise d'antibiotiques à forte dose pendant une longue période peut déséquilibrer la flore intestinale normale (bactéries) d'une personne, permettant ainsi aux souches de *C. difficile* de se développer. Dans ces circonstances, *C. difficile* produit des toxines susceptibles de causer des lésions aux intestins et de provoquer des diarrhées modérées à sévères et des troubles intestinaux potentiellement mortels comme la colite pseudomembraneuse (inflammation du gros intestin), le mégacôlon toxique et la septicémie<sup>3,4,5,6</sup>.

Dans les pays industrialisés, l'infection à *C. difficile* (ICD) est la principale cause de diarrhées nosocomiales dans les hôpitaux et les établissements de soins de longue durée.

*C. difficile* est présent dans les selles. Une personne peut être infectée si elle touche des objets ou des surfaces contaminées par les selles et qu'elle porte ensuite sa main à sa bouche ou à son nez. Le personnel soignant peut transmettre la bactérie à d'autres patients ou contaminer des surfaces par maniportage.

L'épidémiologie des ICD a évolué au cours de la dernière décennie<sup>7,8</sup>. Des souches épidémiques et virulentes (BI / NAP1 / 027) de *C. difficile* causent de graves maladies qui nécessitent souvent une colectomie qui entraîne un surcroît de mortalité<sup>4,5</sup>. Ces souches sont plus susceptibles de se propager dans les hôpitaux en raison de la résistance aux agents antimicrobiens et de la formation de spores.

Les directives des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recommandent le recours à un diagnostic du *C. difficile* chez les patients qui présentent des facteurs de risque cliniques (par exemple, selles non formées) et épidémiologiques. En effet, l'identification rapide des infections à *C. difficile* revêt une importance majeure pour la prise en charge de la maladie<sup>9</sup>.

Des tests diagnostiques rapides et présentant une sensibilité et une spécificité élevées sont des outils essentiels pour détecter la maladie le plus tôt possible et mettre en œuvre rapidement des mesures efficaces de lutte contre l'ICD. Un traitement empirique sans diagnostic de l'ICD s'avère inadapté car, même dans un contexte épidémique, seuls 30 % des patients hospitalisés contractent une ICD<sup>10</sup>. L'efficience et l'efficacité du diagnostic de l'ICD restent un défi pour les cliniciens et les microbiologistes.

L'analyse Revogene C. difficile peut produire des résultats à partir de huit échantillons maximum en près de 70 minutes. L'analyse réduit au maximum l'intervention de l'opérateur entre le moment où la cartouche microfluidique jetable à usage unique (ci-après nommée « PIE ») contenant l'échantillon est placée dans le carrousel Revogene et le moment où les résultats sont disponibles.

### PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

L'instrument Revogene automatise l'homogénéisation et la dilution de l'échantillon, la lyse cellulaire ainsi que l'amplification de l'ADN de l'échantillon et la détection des copies issues de l'amplification par PCR. L'utilisateur n'a à intervenir que pour placer le spécimen du patient dans le tube échantillon, transférer l'échantillon du tube échantillon au PIE et charger/décharger les PIEs dans le carrousel Revogene.

Chaque PIE est un dispositif fermé complètement intégré dans lequel un échantillon est distribué et traité via différentes chambres et différents canaux microfluidiques (homogénéisation, dilution d'échantillon et lyse cellulaire). Les étapes de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel sont ensuite exécutées. Le liquide d'un échantillon est transféré par centrifugation d'une chambre à une autre, dans l'ordre, et l'ensemble des réactifs propres à la réaction PCR sont incorporés et séchés dans les chambres de PCR (Figure 1).

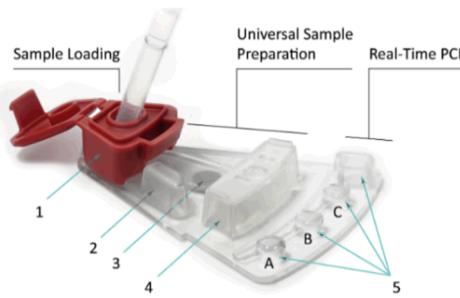


Figure 1. Vue du dessus d'un PIE.

- 1: Chambre de chargement des échantillons, 2: Chambre de trop-plein, 3: Chambre d'homogénéisation contenant le PrC, 4: Chambre de dilution/lyse, 5: Trois (3) puits de PCR (A à C de gauche à droite) et une (1) chambre à déchets (à extrême droite).

Un contrôle de procédé est incorporé dans chaque PIE pour vérifier les étapes de traitement et d'amplification de l'échantillon. Ce procédé permet de surveiller les éventuelles substances inhibitrices ainsi que les défaillances du test au niveau microfluidique, de l'instrument ou des réactifs. Les produits de l'amplification sont détectés en temps réel à l'aide de sondes basées sur la chimie Taqman® spécifiques de la cible. Aucune intervention de l'opérateur n'est nécessaire une fois qu'un PIE est chargé dans l'instrument Revogene.

L'instrument Revogene peut traiter simultanément entre un et huit échantillons dans une même série. Le carrousel doit toutefois contenir huit PIEs afin de maintenir l'équilibre thermodynamique de la série. À la fin de l'analyse, les résultats sont calculés par le système à partir des signaux fluorescents mesurés et des algorithmes de calcul intégrés. L'utilisateur peut imprimer, transférer et/ou enregistrer les résultats affichés sur l'écran tactile à l'aide du port USB ou de l'option de connectivité.

### RÉACTIFS ET MATÉRIEL

Le kit C. difficile contient une quantité suffisante de réactifs et de matériel pour traiter 24 échantillons. Le kit contient les éléments suivants :

1. 24 boucles de transfert jetables (BOUCLE) : La BOUCLE se compose d'une boucle de 5 microlitres ( $\mu$ l) à usage unique pour transférer l'échantillon de selles non formées (liquides ou molles) dans le TTE.
2. 24 pipettes de transfert jetable (PTJ) : Une PTJ se compose d'une pipette de transfert à usage unique pour transférer l'échantillon du TTE dans la cartouche PIE.
3. 24 tubes de tampon pour échantillon (TTE) : Tube avec étiquette à code-barres contenant une solution tampon TE 1X (Tris-HCl pH 8,0/EDTA.Na2) comme tampon de dilution et de conservation pour l'échantillon.
4. 24 pochettes individuelles contenant une (1) cartouche PIE C. difficile : Dispositif intégré avec étiquette à code-barres composé de réactifs desséchés permettant le traitement de l'échantillon et le déroulement des étapes de PCR en temps réel pour l'amplification/la détection simultanée de l'ADN du PrC et de l'ADN de la toxine B du C. difficile.

### MATÉRIEL/ÉQUIPEMENT REQUIS MAIS NON FOURNI

1. Revogene<sup>®</sup> (réf. cat. 610210)
2. Gants jetables, non poudrés
3. Agitateur-mélangeur vortex à vitesse maximale de 3 200 T/M
4. Poste d'échantillonage en rack (réf. cat. 132539, facultatif)
5. MOCK PIE (réf. cat. 610208, facultatif)

## AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

- Ce produit doit être utilisé sur l'instrument Revogene uniquement.
- N'utilisez pas le kit si l'étiquette qui scelle l'emballage externe est brisé à l'arrivée.
- N'utilisez pas les PIEs C. difficile si les sachets de protection sont ouverts ou brisés à l'arrivée.
- N'alternez pas les PTJ, les tubes échantillon et les PIEs entre les lots de kits.
- Chaque BOUCLE, PTJ ou PIE à usage unique permet de traiter un échantillon à la fois. Ne réutilisez pas une BOUCLE, un PTJ ou un PIE usagé.
- Veillez à toujours manipuler les échantillons avec une extrême prudence, comme s'ils étaient infectieux et conformément aux bonnes pratiques de laboratoire telles que celles décrites dans le document Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories<sup>11</sup> et le document CLSI M29-A4<sup>12</sup>.
- Portez des gants non poudrés jetables lorsque vous manipulez les échantillons et lavez-vous bien les mains ensuite.
- La cartouche C. difficile (PIE) comporte des réactifs séchés. Vous ne devez pas ouvrir le sachet de protection tant que vous n'êtes pas prêt à procéder au test.
- Mettez au rebut le matériel et les réactifs inutilisés et les déchets (y compris les PIEs utilisées) conformément à la réglementation de votre pays, de votre État, de votre province ou de votre municipalité.
- N'ouvrez et ne détruisez pas le PIE après utilisation pour éviter toute contamination par les produits de l'amplification ou les particules infectieuses.
- N'utilisez pas un PIE ayant subi une chute ou ayant été secouée ou retournée une fois l'échantillon chargé sous peine de fausser les résultats.
- L'analyse C. difficile ne produit pas de résultats de sensibilité. La mise en culture et les tests de sensibilité nécessitent plus de temps.
- N'utilisez pas de kits dont la date de péremption est dépassée.
- Ne mettez pas le PIE chargé au réfrigérateur.
- Une quantité de selles au-delà de la quantité recommandée peut empêcher la réalisation de l'analyse C. difficile.
- Il doit y avoir huit PIEs dans le carrousel Revogene pour chaque analyse, afin de maintenir l'équilibre thermodynamique et mécanique durant le test.

## DANGER ET MISES EN GARDE

A notre connaissance, il n'y pas de risque connu associé à ce produit.

## CONSERVATION ET STABILITE

- Pendant le transport, les échantillons prélevés doivent être conservés à une température comprise entre 2 C et 25 C.
- Les échantillons de selles peuvent être conservés à 25 C pendant 2 jours maximum ou entre 2 et 8 C pendant 4 jours maximum. Les TTE inoculés peuvent être conservés à 25 C pendant au plus deux jours ou à une température comprise entre 2 et 8 C pendant au plus trois jours.
- Conservez le kit C. difficile à une température comprise entre 2 et 25 C. La date d'expiration figure sur l'étiquette du kit.
- N'ouvrez pas un sachet tant que vous n'êtes pas prêt à procéder aux tests. Utilisez le PIE dans les 60 minutes suivant l'ouverture du sachet.

## MODE D'EMPLOI

### PRELEVEMENT ET TRANSPORT DES ECHANTILLONS

Type d'échantillon : échantillon de selles non moulées (liquides ou molles) prélevé chez des patients susceptibles de présenter une ICD.

Prélevez les selles non formées dans un flacon sec et propre conformément aux directives ou procédures locales.

- Transférez les selles liquides ou molles (sans urine) dans le flacon. Evitez de mélanger l'échantillon avec du papier hygiénique, de l'eau ou du savon.
- Apposez sur le flacon une étiquette identifiant l'échantillon ou le patient et envoyez-le au laboratoire pour le soumettre aux tests (voir la section Conservation et stabilité).

### PREPARATION ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

**REMARQUE 1:** Commencez le test dans les 60 minutes suivant l'ouverture du sachet contenant le PIE.

#### PREPARATION DU TUBE ECHANTILLON

- Pour chaque échantillon à tester, prendre une BOUCLE et un TTE dans la boîte du kit.
- Apposez sur le tube échantillon à code barres une étiquette portant l'identification appropriée sans masquer ni écrire sur les codes barres ou identifiez le tube. Placez le TTE sur le poste de travail d'échantillonnage en rack Revogene, le cas échéant.
- Mélangez l'échantillon dans l'agitateur-mélangeur vortex à vitesse maximale pendant 15 secondes. Plongez la BOUCLE fournie dans les selles. Retirez toute quantité de selles molles débordant de la boucle pour prélever environ 5 µL.
- Retirez le bouchon du tube échantillon, secouez la BOUCLE dans le tube échantillon pendant 2 à 3 secondes ou faites tourner la boucle pour vous assurer que l'échantillon s'en détache. Veillez à ce qu'un seul tube échantillon soit ouvert à la fois.
- Fermez bien le bouchon du tube échantillon et placez ce dernier sur le poste d'échantillonnage en rack Revogene (si vous en utilisez un).
- Préparez les échantillons supplémentaires à tester en répétant les étapes 1 à 5, puis passez à l'étape 7.
- Une fois que tous les échantillons ont été préparés, passez à la préparation du PIE C. difficile (prochaine section).

#### PRÉPARATION DU PIE

**REMARQUE 1:** Traiter sur échantillon à la fois:

- Mélangez le tube échantillon pendant 15 secondes à vitesse maximale.
- Ouvrir la PIE pochette.
- Placez le PIE C. difficile sur le poste de travail d'échantillonnage en rack Revogene, le cas échéant.
- Prendre une PTJ dans la boîte du kit et aspirer le tampon pour échantillon en pressant l'ensemble de la poire. Le niveau de liquide dans le PTJ doit se situer entre les deux marques (Figure 2). Si le niveau du liquide ne se situe pas entre les deux marques, transférez le contenu complet dans le tube échantillon en pressant la poire et en répétant l'étape 11.
- Placez tout le contenu du SB dans la Chambre d'injection de l'échantillon du PIE (Figure 1).
- Fermez hermétiquement le bouchon du PIE en veillant à ce qu'il soit bien en place. Ne mettez pas le PIE chargé au réfrigérateur. Veillez à ce qu'un seul PIE soit ouvert à la fois.
- Répétez les étapes 8 à 13 pour les autres échantillons, puis passez à l'étape 15.
- Les échantillons de selles et le tube échantillon inoculé peuvent être conservés à 2-8 C ou à -25 C pendant la période indiquée à la section Conservation et stabilité.

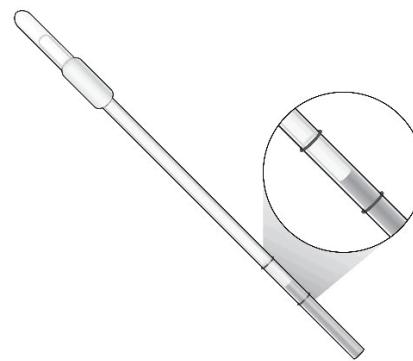


Figure 2.  
Représentation du niveau approprié du tube échantillon à l'aide de l'outil de transfert jetable (PTJ).

#### FONCTIONNEMENT DU REVOGENE

**REMARQUE 1 :** Au plus huit échantillons peuvent être traités simultanément durant une même analyse à l'aide du Revogene (incluant les contrôles externes).

**REMARQUE 2 :** Chaque analyse doit être effectuée avec huit PIEs dans le Revogene. En présence de moins de huit échantillons, les espaces vides doivent être remplis avec des cartouches MOCK PIE\*.

**REMARQUE 3 :** Pour de plus amples renseignements sur la configuration et le fonctionnement de l'instrument Revogene, reportez-vous au manuel d'utilisation<sup>13</sup> du système Revogene.

- Mettez le Revogene sous tension (s'il ne l'est pas déjà). Le logiciel se lance automatiquement.
- Ouvrez une session en entrant le <Nom d'utilisateur> et le <Mot de passe> et en appuyant sur <Connexion>. Le menu principal s'affiche automatiquement.
- Appuyez sur <Configuration de l'exécution>.
- Indiquez le numéro d'identification de l'échantillon soit à l'aide du lecteur de codes barres, soit en le saisissant manuellement. L'entrée manuelle peut se faire en touchant l'icône crayon de la ligne <Balayer ou saisir l'identifiant de l'échantillon>.
- Entrez les codes barres du tube échantillon et du PIE C. difficile au moyen du lecteur de codes barres de l'instrument Revogene. Placez doucement le PIE à la verticale devant le lecteur. Les codes barres du TTE et du PIE peuvent également être entrés manuellement (appuyez sur l'icône crayon sur les lignes respectives). Manipulez le PIE avec précaution sans le secouer, le faire tomber ou l'inverser.
- (Facultatif) Appuyez sur l'icône crayon de la ligne <Ajouter des commentaires> et entrez un commentaire.
- Insérez le PIE C. difficile dans l'instrument Revogene, dans n'importe quelle position du carrousel. Le logiciel associera automatiquement l'échantillon et le tube échantillon au bon PIE C. difficile.
- Confirmez que le PIE est inséré dans l'instrument en appuyant sur <OK> sur la ligne <Insérer le PIE dans l'instrument> et répétez les étapes 4 à 8 pour tous les échantillons.
- Une fois que toutes les PIEs C. difficile ont été insérées dans l'instrument (ainsi que les cartouches MOCK PIE, au besoin), appuyez sur <Suivant>.
- Balayez l'anneau de rétention et installez-le dans le carrousel. Fermez le couvercle de l'instrument.
- Lancez le test en appuyant sur <Démarrer>.

\*En l'absence de MOCK PIE, utilisez des PIEs d'essai inutilisées remplies d'un SB non inoculé (BLANC) ou de contrôles externes.

## AFFICHAGE ET EXPORTATION DES RESULTATS

REMARQUE 1: Pour de plus amples renseignements sur l'acquisition des résultats de test, reportez-vous au manuel d'utilisation<sup>13</sup> de l'instrument Revogene.

1. Une fois l'analyse effectuée, le couvercle s'ouvre automatiquement.
2. Appuyez sur l'icône Accueil.
3. Si la session Revogene s'est fermée, saisissez à nouveau votre <Nom d'utilisateur> et votre <Mot de passe>, et appuyez sur <Connexion>. Le menu principal s'affiche automatiquement.
4. Appuyez sur l'icône <Résultat> pour accéder aux résultats du test.
5. Appuyez sur <Dernière analyse> pour afficher les résultats des derniers tests.
6. Dans le menu <Dernière analyse>, sélectionnez les échantillons dont les rapports de résultats doivent être exportés. Vous pouvez sélectionner tous les échantillons en même temps en cliquant sur la première case à gauche de la colonne « Identifiant de l'échantillon ».
7. Appuyez sur <Exporter> et enregistrez-les à l'endroit approprié (par exemple, sur une clé USB).
8. Retirez l'anneau de rétention et les PIEs C. difficile de l'instrument Revogene. Les PIEs C. difficile utilisées doivent être jetées dans les poubelles appropriées, conformément aux pratiques standard de l'établissement.

## REPETER LE TEST

### RESULTATS NON RESOLUS OU INDETERMINES OBTENUS POUR UN ECHANTILLON

Lorsqu'un résultat non résolu (UNR) ou indéterminé (IND) est obtenu, vous devez répéter le test en utilisant le TTE inoculé correspondant dans les délais indiqués à la section **Conservation et stabilité**. Le test avec le TTE ne peut être répété qu'une fois.

Dans l'agitateur-mélangeur vortex, mélangez le tube échantillon pendant 15 secondes à vitesse maximale. En vous servant d'un nouveau sachet, suivez les étapes 9 à 13 de la section **Préparation et manipulation des échantillons / Préparation du PIE**, puis suivez les étapes de la section **Fonctionnement de l'instrument Revogene**.

### RESULTAT NON RESOLU, INDETERMINE, FAUX NEGATIF OU FAUX POSITIF POUR UN CONTROLE EXTERNE

Lorsqu'un résultat non résolu (UNR) ou indéterminé (IND), faux négatif ou faux positif est obtenu pour un contrôle externe, l'analyse n'est pas valide. Il convient alors de répéter le test pour tous les échantillons de l'analyse en utilisant le TTE inoculé correspondant, ainsi que les contrôles externes venant d'être préparés, en respectant les délais prescrits à la section **Conservation et stabilité**. Consultez la prochaine section, **Contrôle de la qualité**, pour savoir comment préparer un nouvel ensemble de contrôles externes.

Pour les nouveaux tests réalisés à l'aide du tube échantillon inoculé, mélangez le tube échantillon pendant 15 secondes à vitesse maximale dans l'agitateur-mélangeur vortex. En vous servant d'un nouveau sachet, suivez les étapes 9 à 13 de la section **Préparation et manipulation des échantillons / Préparation du PIE**, puis suivez les étapes de la section **Fonctionnement de l'instrument Revogene**.

### CONTROLE DE LA QUALITE

Les procédures de contrôle de la qualité contrôlent l'exactitude et la précision du processus analytique. Chaque laboratoire doit établir le nombre, le type et la fréquence relatifs au matériel de contrôle des tests conformément aux réglementations applicables ou aux organismes d'accréditation compétents. La procédure ci-dessous peut être employée, si nécessaire, en fonction des procédures et des politiques locales.

REMARQUE 1 : Il convient d'utiliser des BOUCLE, des PTJ, des tubes échantillon et des PIEs distincts pour chaque préparation de contrôle externe.

1. Chaque PIE C. difficile contient un contrôle de procédé qui permet de vérifier l'homogénéisation et la dilution de l'échantillon, la lyse cellulaire, l'inhibition de l'amplification de l'ADN et la défaillance de l'analyse au niveau des réactifs.
2. Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'utilisation de matériel de contrôle. Les utilisateurs doivent suivre les directives appropriées concernant l'exécution de contrôles de qualité externes. D'après les recommandations, il convient d'exécuter un contrôle externe positif et un contrôle externe négatif au moins une fois par jour jusqu'à ce qu'une validation de processus adéquate soit obtenue dans le cadre de l'analyse C. difficile sur l'instrument Revogene.
3. Le matériel de contrôle externe n'est pas fourni par Meridian Bioscience, Inc. Les contrôles externes ne sont pas utilisés par le logiciel du Revogene pour l'interprétation des résultats de l'analyse de l'échantillon. Les contrôles externes sont traités comme s'il s'agissait d'échantillons.
4. Différents types de contrôles externes sont recommandés pour permettre à l'utilisateur de sélectionner celui qui convient le mieux au programme de contrôle de la qualité de son laboratoire. Procédez au traitement et aux tests des préparations de contrôle externe en suivant les étapes décrites à la section **Préparation et manipulation des échantillons**.

#### Contrôle externe positif :

1. L'utilisation d'une nouvelle suspension cellulaire d'une souche toxinogène de C. difficile porteuse du gène tcdB, obtenue à l'aide de matériel de contrôle offert sur le marché (p. ex. ATCC® 43255™) préparé à l'aide de l'étalement McFarland 0,5 ± 0,05 et dilué de moitié dans une solution saline (p. ex., solution saline préparée BD BBL™, cat. n° 221819) est recommandée avec un contrôle positif.
2. Un échantillon de selles caractérisé positif pour la présence de l'infection toxinogène à C. difficile peut également être recommandé comme contrôle positif.

#### Contrôle externe négatif :

1. L'utilisation d'une nouvelle suspension cellulaire d'une souche non toxinogène de C. difficile obtenue à l'aide de matériel de contrôle offert sur le marché (p. ex. ATCC® 43593™) préparé à l'aide de l'étalement McFarland 0,5 ± 0,05 dans une solution saline (p. ex., solution saline préparée BD BBL™, cat. n° 221819) est recommandée avec un contrôle négatif.
2. Un échantillon de selles caractérisé négatif pour la présence de l'infection toxinogène à C. difficile peut également être recommandé comme contrôle négatif.

## INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats sont calculés par l'instrument Revogene à partir de signaux fluorescents mesurés et d'algorithme de calcul intégrés et s'affichent dans la fenêtre « Résultats ». Voici les résultats possibles :

Échantillon	Symbole	Résultat	Interprétation
Échantillon patient		Positif	ADN cible de C. difficile toxinogène détecté.
		Négatif	ADN cible de C. difficile toxinogène non détecté.
		Non résolu	Erreur d'amplification/de détection pour le contrôle de procédé ainsi que pour l'ADN cible de C. difficile toxinogène. Peut être causée par des échantillons inhibiteurs, ou une défaillance au niveau microfluidique ou des réactifs. Il convient de répéter les tests (reportez-vous à la section Répéter le test pour obtenir d'autres directives).
		Indéterminé	Aucun résultat à signaler en raison d'éventuelles erreurs de détection de l'instrument Revogene durant le traitement de l'essai ou l'analyse des données, ou à cause de l'interruption de l'analyse par l'utilisateur. Il convient de répéter les tests (reportez-vous à la section Répéter le test pour obtenir d'autres directives).
Contrôle externe positif		Positif	Résultat du contrôle externe positif valide.
		Négatif	Un contrôle externe positif qui produit un résultat négatif indique un problème au niveau de la manipulation ou de la préparation des échantillons. <b>L'analyse n'est pas valide.</b> Il convient de revoir la technique de manipulation ou de préparation des échantillons. Il convient de répéter les tests (reportez-vous à la section Répéter le test pour obtenir d'autres directives).
		Non résolu	Résultat du contrôle externe positif incorrect. <b>L'analyse n'est pas valide.</b> Il convient de répéter les tests (reportez-vous à la section Répéter le test pour obtenir d'autres directives).
		Indéterminé	Résultat du contrôle externe positif incorrect. <b>L'analyse n'est pas valide.</b> Il convient de répéter les tests (reportez-vous à la section Répéter le test pour obtenir d'autres directives).
Contrôle externe négatif		Positif	Un contrôle externe négatif qui produit un résultat positif évoque un problème de manipulation des échantillons ou de contamination. <b>L'analyse n'est pas valide.</b> Il convient de revoir la technique de manipulation des échantillons. Il convient de répéter les tests (reportez-vous à la section Répéter le test pour obtenir d'autres directives).
		Négatif	Résultat du contrôle externe négatif valide.
		Non résolu	Résultat du contrôle externe négatif incorrect. <b>L'analyse n'est pas valide.</b> Il convient de répéter les tests (reportez-vous à la section Répéter le test pour obtenir d'autres directives).
		Indéterminé	Résultat du contrôle externe négatif incorrect. <b>L'analyse n'est pas valide.</b> Il convient de répéter les tests (reportez-vous à la section Répéter le test pour obtenir d'autres directives).

## LIMITES DE LA PROCÉDURE

1. L'analyse *C. difficile* ne peut être utilisée sur l'instrument Revogene que par du personnel qualifié.
2. Ce test ne doit pas servir à établir une distinction entre les porteurs de *C. difficile* et les personnes atteintes d'une infection à *C. difficile*.
3. L'analyse *C. difficile* ne produit pas de résultats de sensibilité. Des isolats de prélèvement sont nécessaires pour réaliser des tests de sensibilité.
4. Les caractéristiques de la performance de l'analyse *C. difficile* ont été établies sur la base d'échantillons de selles non formées (liquides ou molles) prélevés chez des patients susceptibles de présenter une infection à *C. difficile*. L'utilisation de l'analyse *C. difficile* pour d'autres types d'échantillons cliniques que ceux indiqués n'a pas été évaluée et les caractéristiques de la performance n'ont pas été établies.
5. Les résultats de l'analyse *C. difficile* doivent être utilisés comme un complément des observations cliniques et des autres renseignements à la disposition du médecin.
6. Les résultats du test pourraient être altérés par un traitement antimicrobien concomitant, car le test pourrait toujours détecter l'ADN de *C. difficile*.
7. Un résultat positif au test ne révèle pas nécessairement la présence d'organismes viables. Il indique en revanche la présence d'ADN de *C. difficile* toxinogène.
8. Les résultats des tests peuvent être faussés par un prélèvement, une manipulation ou une conservation inadaptées des échantillons, une erreur technique ou le mélange de l'échantillon. Pour éviter ces erreurs, il est indispensable de respecter scrupuleusement les instructions du présent document, du manuel d'utilisation<sup>13</sup> de l'instrument Revogene ou les directives établies.
9. Un résultat négatif n'exclut pas l'éventualité d'une colonisation par *C. difficile*. Des faux négatifs peuvent être obtenus lorsque la concentration de *C. difficile* est inférieure à la limite de détection de l'analyse. Si le patient présente des signes ou des symptômes d'infection, d'autres tests de laboratoire et d'autres données cliniques doivent permettre de confirmer le résultat négatif.
10. Une mauvaise fermeture d'un bouchon de PIE risque de donner lieu à une contamination de l'échantillon ou à la production de faux négatifs.
11. Bien qu'on ne connaisse aucune souche ni aucun isolat de *C. difficile* toxinogène dépourvu du gène *tcfB*, la présence d'une telle souche produirait un résultat erroné (faux négatif) avec l'analyse *C. difficile*.
12. Les mutations ou polymorphismes des sites de liaison des arômes (ou sondes) peuvent influer sur la détection des variantes du gène *tcfB* de *C. difficile*, donnant lieu à un faux négatif dans le cadre de l'analyse *C. difficile*.
13. Le carbonate de calcium (p. ex., Tums®) et l'hydroxyde d'aluminium/hydroxyde de magnésium (p. ex., Stomax®) peuvent inhiber la détection des souches toxinogènes de *C. difficile* lorsque l'une de ces substances est présente dans le tampon d'échantillon à une concentration de plus de 0,5 mg/mL ou de plus de 0,5 µL/mL, respectivement.
14. La présence de *Clostridium sordellii* à une charge de > 10<sup>5</sup> UFC/mL dans le tampon d'échantillon peut entraîner la détection de faux positifs.
15. L'effet combiné de *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* O157:H7 et *Helicobacter pylori* à ≥ 10<sup>6</sup> UFC/mL dans le tampon d'échantillon peut avoir un effet inhibiteur sur la détection des souches toxinogènes de *C. difficile*.
16. L'effet combiné de *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Streptococcus agalactiae* et *Vibrio parahaemolyticus* à ≥ 10<sup>6</sup> UFC/mL dans le tampon d'échantillon peut avoir un effet inhibiteur sur la détection des souches toxinogènes de *C. difficile*.

## VALEURS ATTENDUES

La prévalence de l'infection à *C. difficile* (ICD) dépend de divers facteurs, notamment la prédisposition aux infections en raison d'un traitement antérieur par des antibiotiques à large spectre, la présence de symptômes et la norme en matière de test. Dans une étude prospective et rétrospective combinée, des échantillons ont été recueillis dans huit centres cliniques géographiquement dispersés auprès de 2 581 sujets âgés de 0 à 2 ans et de plus de 60 ans. Parmi les 2 461 échantillons qui répondent à tous les critères d'inclusion et ne répondent à aucun critère d'exclusion, 333 se sont avérés positifs selon les résultats combinés d'une culture toxinogène directe et enrichie, la prévalence observée étant de 13,5 % [333/2 461; IC à 95 % : 12,2-15 %]. Le pourcentage de résultats positifs observés avec l'essai Revogene *C. difficile* dans la population de l'étude était de 11,5 % [283/2 461; IC à 95 % : 10,3-12,8 %].

## CARACTÉRISTIQUES DE LA PERFORMANCE CLINIQUE

La performance clinique de l'essai Revogene *C. difficile* a été établie dans le cadre d'une enquête multisites prospective et rétrospective approuvée par un Comité d'éthique indépendant (CEI) comparant les résultats produits par une culture toxinogène au moyen d'échantillons restants et anonymisés de selles non formées (liquides ou molles) prélevés chez des patients susceptibles de présenter une ICD. Deux mille cinq cent quatre-vingt-un (2 581) échantillons ont été recueillis de façon prospective à sept centres géographiquement diversifiés aux États-Unis et au Canada entre le 4 février 2017 et le 15 juillet 2017 auprès de sujets admissibles symptomatiques. Seuls les échantillons qui répondent aux critères d'inclusion de l'étude et ne répondent à aucun critère d'exclusion ont été admis. Deux mille quatre cent soixante-trois (2 463) échantillons ont été utilisés pour déterminer les performances de l'essai Revogene *C. difficile* en comparaison avec la méthode de culture directe et enrichie combinée. Les 2 463 échantillons fraîchement recueillis ont tous été analysés dans un milieu de culture; 798 échantillons ont été analysés à l'aide de l'essai Revogene *C. difficile* comme des échantillons frais et un sous-ensemble de 1 665 échantillons a été congelé en vue d'une analyse ultérieure au moyen de l'essai Revogene *C. difficile*.

La culture toxinogène a été effectuée dans un laboratoire de référence central et l'essai Revogene *C. difficile* a été effectué aux sept centres compétents désignés. La méthode de culture toxinogène comprenait une culture directe et enrichie, suivie d'une analyse de la cytotoxicité. La méthode de culture directe consistait à transférer un écouillon d'échantillon de selles d'un milieu de transport anaérobie à un milieu anaérobie sélectif prétréduit (milieu CCFA [gélose cycloserine-céfoxidine-fructose]), puis à analyser la cytotoxicité des colonies de *C. difficile* isolées à partir de l'échantillon de selles. brièvement, l'identité des colonies isolées dans les cultures directes qui s'apparentaient à *C. difficile* en comparaison avec la méthode de culture directe et enrichie combinée. Les 2 463 échantillons fraîchement recueillis ont tous été analysés dans un milieu de culture; 798 échantillons ont été analysés à l'aide de l'essai Revogene *C. difficile* comme des échantillons frais et un sous-ensemble de 1 665 échantillons a été congelé en vue d'une analyse ultérieure au moyen de l'essai Revogene *C. difficile*.

Une fois les colonies identifiées, une deuxième boîte de gélose au sang contenant un disque de vancomycine (5 µg) et une boucle d'incubation ont été utilisés pour inoculer un bouillon anaérobie de viande hachée. Le bouillon inoculé a été incubé en anaérobiose à une température entre 35 et 37 °C pendant 48 heures aux fins d'analyse de la cytotoxicité au moyen d'un dosage CCNA (Cell Cytotoxicity Neutralization Assay, dosage de la cytotoxicité pour la toxine *Clostridium difficile*, Diagnostic Hybrids). Dans le cas de la méthode de culture enrichie, le même écouillon utilisé pour inoculer la plaque CCNA a été utilisé pour inoculer un bouillon de cycloserine-céfoxidine-mannitol avec un tube de taurocholate et lysozyme (CCMB-TAL). Le bouillon d'enrichissement a été analysé dans une sous-culture sur une autre plaque CCFA selon la même procédure que la méthode directe. Un échantillon était considéré comme positif pour une souche toxinogène de *C. difficile* si *C. difficile* était présent dans les selles dans la culture directe ou enrichie et si les isolats bactériens s'avéraient positifs lors du dosage CCNA. Si *C. difficile* était isolé dans la culture directe et que l'isolat s'avérait positif lors de l'analyse de la cytotoxicité, la culture d'enrichissement n'était soumise à aucune autre analyse. Les échantillons étaient considérés comme négatifs pour une souche toxinogène de *C. difficile* seulement s'ils s'avéraient négatifs dans la culture directe et la culture combinée (c.-à-d. culture directe et enrichie).

La sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative ont été calculées en comparant les résultats de l'essai Revogene *C. difficile* aux résultats combinés de la méthode de culture directe et enrichie (méthode de référence). Une analyse des résultats discordants a été effectuée pour une partie des échantillons à partir des résultats discordants décelés entre l'essai Revogene *C. difficile* et la méthode de culture combinée au moyen de quatre tests PCR de routine des centres. Finalement, le pourcentage de concordance positif et le pourcentage de concordance négatif ont été déterminés en comparant l'essai Revogene *C. difficile* avec les résultats produits par la culture directe.

## RÉSULTATS

Les données démographiques sur la population de l'étude sont présentées au Tableau 1.

**Tableau 1.** Données démographiques sur la population de l'étude pour tous les échantillons conformes à tous les niveaux

Sujets	Tous les sujets		Selles fraîches N = 797	Selles congelées N = 1 664
	N = 2 461			
<b>Source des échantillons</b>				
Patients hospitalisés	1 804 (73,3 %)		617 (77,4 %)	1 187 (71,3 %)
Patients en consultation externe	420 (17,1 %)		123 (15,4 %)	297 (17,8 %)
Salle d'urgence	234 (9,5 %)		57 (7,2 %)	177 (10,6 %)
Manquants	3 (0,1 %)		0 (0,0 %)	3 (0,2 %)
<b>Groupe d'âge</b>				
< 2	9 (0,4 %)		4 (0,5 %)	5 (0,3 %)
3-18	105 (4,3 %)		30 (3,8 %)	75 (4,5 %)
19-60	1 199 (48,7 %)		399 (50,1 %)	800 (48,1 %)
> 60	1 148 (46,6 %)		364 (45,7 %)	784 (47,1 %)

Parmi les 795 échantillons de selles fraîches et les 1 665 échantillons de selles congelées admissibles qui étaient conformes au niveau de l'échantillon et du test PCR, 9 et 13 ont respectivement été signalés comme non résolus lors de l'analyse initiale (1,1 % pour les échantillons de selles fraîches et 0,8 % pour les échantillons de selles congelées) et un seul échantillon de selles fraîches est demeuré non résolu après la répétition du test. Le taux d'échantillons non résolus après la répétition du test était de 0,1 % (1/798) pour les échantillons de selles fraîches et de 0,0 % (0/1 665) pour les échantillons de selles congelées.

Parmi les 798 échantillons de selles fraîches et les 1 665 échantillons de selles congelées admissibles qui étaient conformes au niveau de l'échantillon et du test PCR, 12 et 28 ont respectivement été signalés comme indéterminés lors de l'analyse initiale (1,5 % pour les échantillons de selles fraîches et 1,7 % pour les échantillons de selles congelées) et un seul échantillon de selles fraîches est demeuré indéterminé après la répétition du test. Le taux d'échantillons non résolus après la répétition du test était de 0,0 % (0/798) pour les échantillons de selles fraîches et de 0,1 % (1/1 665) pour les échantillons de selles congelées.

Le taux de résultats non mesurables global était initialement de 2,6 % (21/798) et de 0,1 % (1/798) après la répétition de l'essai pour les échantillons de selles fraîches. Le taux de résultats non mesurables global était initialement de 2,5 % (41/1 665) et de 0,1 % (1/1 665) après la répétition de l'essai pour les échantillons de selles congelées.

## COMPARAISON AVEC LES CULTURES DIRECTES ET ENRICHIES COMBINÉES

La performance clinique de l'essai Revogene *C. difficile* par rapport aux résultats combinés des cultures toxinogènes directes et enrichies est présentée au Tableau 2 pour les échantillons frais et au tableau 3 pour les échantillons congelés.

Parmi les 2 463 échantillons admissibles, 2 461 présentaient des résultats valides pour la culture toxinogène directe, la culture toxinogène enrichie et l'essai Revogene *C. difficile*. Parmi les 2 461 échantillons, 333 se sont avérés positifs selon les résultats combinés d'une culture toxinogène directe et enrichie, la prévalence observée étant de 13,5 % [333/2 461; IC à 95 % : 12,2-15 %].

Les caractéristiques de performance de l'analyse *C. difficile* obtenues avec les échantillons de selles fraîches ont démontré une sensibilité de 80,5 % (91/113; IC à 95 % : 72,0-87,4) et une spécificité de 97,1 % (664/684; IC à 95 % : 95,5-98,2 %) par rapport à la méthode de référence (méthode de cultures directes et enrichies combinées) à partir d'échantillons de selles congelées (Tableau 2).

**Tableau 2.** Caractéristiques de la performance globale de l'essai Revogene *C. difficile* par rapport aux résultats de la méthode de référence (méthode de cultures directes et enrichies combinées) à partir d'échantillons de selles fraîches.

Performance globale Selles fraîches	Méthode de référence		
	Positif	Négatif	Total
Revogene <i>C. difficile</i>	91	20 <sup>A</sup>	111
	22 <sup>B</sup>	664	686
	113	684	797

Sensibilité : 80,5 % (91/113; IC à 95 % : 72,0-87,4 %)

Spécificité : 97,1 % (664/684; IC à 95 % : 95,5-98,2 %)

Valeur prédictive positive : 82,0 % (91/111; IC à 95 % : 73,6-88,6 %)

Valeur prédictive négative : 96,8 % (664/686; IC à 95 % : 95,2-98,0 %)

<sup>A</sup> Parmi les 20 échantillons ayant produit des résultats faux positifs avec l'essai Revogene *C. difficile* par rapport à la méthode de cultures directes et enrichies combinées, 8 se sont avérés positifs et 4 se sont avérés négatifs après un deuxième test d'amplification des acides nucléiques [TAAN] (test PCR de routine des centres).

<sup>B</sup> Parmi les 22 échantillons ayant produit des résultats faux négatifs avec l'essai Revogene *C. difficile* par rapport à la méthode de cultures directes et enrichies combinées, 13 se sont avérés négatifs et 4 se sont avérés positifs après un deuxième test d'amplification des acides nucléiques (TAAN) (test PCR de routine des centres).

Les caractéristiques de performance de l'analyse *C. difficile* obtenues avec les échantillons de selles congelées ont démontré une sensibilité de 87,3 % (192/220; IC à 95 % : 82,1-91,4) et une spécificité de 97,3 % (1 405/1 444; IC à 95 % : 96,3-98,1 %) par rapport à la méthode de référence (Tableau 3).

**Tableau 3.** Caractéristiques de la performance globale de l'essai Revogene C. difficile par rapport aux résultats de la méthode de référence (méthode de cultures directes et enrichies combinées) à partir d'échantillons de selles congelées.

Performance globale Selles congelées		Méthode de référence		
Revogene C. difficile	Positif	Positif	Négatif	Total
	Négatif	28 <sup>b</sup>	1 405	1 433
	Total	220	1 444	1 664

Sensibilité : 87,3 % (192/220; IC à 95 % : 82,1-91,4 %)

Spécificité : 97,3 % (1 405/1 444; IC à 95 % : 96,3-98,1 %)

Valeur prédictive positive : 83,1% (192/231; IC à 95 % : 77,7 – 87,7%)

Valeur prédictive négative : 98,0% (1405/1433; IC à 95 % : 97,2 – 98,7%)

<sup>a</sup> Parmi les 39 échantillons ayant produit des résultats faux positifs avec l'essai Revogene C. difficile par rapport à la méthode de cultures directes et enrichies combinées, 17 se sont avérés positifs et 15 se sont avérés négatifs après un deuxième test d'amplification des acides nucléiques (TAAN) (test PCR de routine des centres).

<sup>b</sup> Parmi les 28 échantillons ayant produit des résultats faux négatifs avec l'essai Revogene C. difficile par rapport à la méthode de cultures directes et enrichies combinées, 14 se sont avérés négatifs et 12 se sont avérés positifs après un deuxième test d'amplification des acides nucléiques (TAAN) (test PCR de routine des centres).

#### COMPARAISON AVEC LA CULTURE DIRECTE

La performance clinique de l'essai Revogene C. difficile par rapport aux résultats combinés des cultures toxinogènes directes et enrichies est présentée au **Tableau 4** pour les échantillons frais et au **Tableau 5** pour les échantillons congelés.

**Tableau 4.** Caractéristiques de la performance globale de l'essai Revogene C. difficile par rapport aux résultats de la méthode de culture directe à partir de selles fraîches.

Performance globale Selles fraîches		Méthode de culture directe		
Revogene C. difficile	Positif	Positif	Négatif	Total
	Négatif	3	683	686
	Total	66	731	797

Pourcentage de concordance positif : 95,5 % (63/66; IC à 95 % : 87,3-99,1 %)

Pourcentage de concordance négatif : 93,4 % (683/731; IC à 95 % : 91,4-95,1 %)

**Tableau 5.** Caractéristiques de la performance globale de l'essai Revogene C. difficile par rapport aux résultats de la méthode de culture directe à partir de selles congelées.

Performance globale Selles congelées		Méthode de culture directe		
Revogene C. difficile	Positif	Positif	Négatif	Total
	Négatif	8	1 425	1 433
	Total	168	1 496	1 664

Pourcentage de concordance positif : 95,2 % (160/168; IC à 95 % : 90,8-97,9 %)

Pourcentage de concordance négatif : 95,3 % (1 425/1 496; IC à 95 % : 94,1-96,3 %)

#### CARACTÉRISTIQUES DE LA PERFORMANCE ANALYTIQUE

##### SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

La sensibilité analytique (limite de détection ou LdD) de l'analyse C. difficile a été déterminée à l'aide d'une matrice de selles liquides clinique négative au C. difficile toxinogène, enrichie avec différentes concentrations de suspension bactérienne de C. difficile. Deux souches de C. difficile toxigène (ATCC® 43255™, ribotype 087, toxinotype 0 et ATCC® BAA-1805™, NAP 1, ribotype 027, toxinotype IIIb) ont été testées dans un réplicat de 24 par concentration. La LdD est définie comme la concentration minimale à laquelle 95 % de tous les réplicats testés ou plus ont été positifs. En ce qui concerne les deux souches testées, la LdD de l'analyse C. difficile était à 1 500 UFC/ml: de tampon d'échantillon. Les résultats sont résumés au **Tableau 2**.

**Tableau 6.** LdD de l'analyse C. difficile

C. difficile toxigène –Numéro de souche ATCC®	LdD (UFC/mL de SB)
ATCC® 43255™	1 500
ATCC® BAA-1805™	1 500

##### INCLUSIVITÉ

L'inclusivité de l'analyse C. difficile a été déterminée pour 20 souches toxinogènes de C. difficile représentant huit différents toxinotypes de diverses origines géographiques. Chaque souche a été testée à partir d'une culture cellulaire quantifiée enrichie dans une matrice de selles liquides négative pour les souches toxinogènes de C. difficile à une charge de 3 750 UFC/ml de tampon d'échantillon, ce qui correspond à deux à trois fois la valeur de la LdD de la souche ATCC® 43255™. Trois réplicats par souches ont été testés à l'aide de trois lots différents de kits C. difficile. Toutes les souches toxinogènes de C. difficile ont été détectées à 3 750 UFC/ml (SB). Les souches testées sont décrites dans le tableau 7.

**Tableau 7.** Sources toxinogènes de C. difficile testées pour déterminer l'inclusivité à l'aide de l'essai C. difficile

Souche toxinogène de C. difficile	Toxinotype
ATCC® 9689™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 700792™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 17858™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1382™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 51695™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 43600™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 43599™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 43596™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 43594™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1804™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® 17857™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1873™	(Toxinotype 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1870™	(Toxinotype IIb, NAP 1, A+, B+)
ATCC® BAA-1803™	(Toxinotype IIIc, NAP 1, A+, B+)
ATCC® BAA-1875™	(Toxinotype V, A+, B+)
ATCC® 43598™	(Toxinotype VIII, A-, B+)
CCUG 8864	(Toxinotype X, A-, B+)
ATCC® BAA-1812™	(Toxinotype XII, A+, B+)
ATCC® BAA-1814™	(Toxinotype XXII, A+, B+)
ATCC® BAA-2155™	(Toxinotype XXII, A+, B+)

En outre, une analyse *in silico* a été effectuée le 20 juillet 2017 pour évaluer l'inclusivité des amorces et des sondes de la cible de l'essai C. difficile pour 52 souches toxinogènes de C. difficile figurant dans la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Les résultats de l'alignement n'ont révélé aucune incohérence avec les 52 séquences sélectionnées. L'analyse a prédit la détection de chacune de ces souches toxinogènes de C. difficile.

##### RÉACTIVITÉ CROISÉE

La réactivité croisée de l'essai C. difficile a été évaluée au moyen de charges élevées d'organismes qui ne sont pas ciblés par le test, des organismes phylogénétiquement associés à C. difficile, des souches non toxinogènes de C. difficile ou d'autres organismes présents dans la flore intestinale normale. L'étude portait sur 50 bactéries, une levure, sept virus et de l'ADN humain (**Tableau 8**). Les bactéries et la levure ont été testées à une charge d'au moins 10<sup>5</sup> UFC/ml de tampon d'échantillon. Des souches de *Clostridium novyi* et de *Clostridium scindens* ont produit des résultats faux positifs dans un réplicat sur six testés à environ 10<sup>6</sup> UFC/ml de SB. Aucune réactivité n'a été observée pour trois réplicats testés à 10<sup>5</sup> UFC/ml de SB. Une souche d'*Enterococcus faecalis* a produit des résultats faux positifs dans un réplicat sur trois testés à environ 10<sup>7</sup> UFC/ml de SB. Aucune réactivité n'a été observée pour trois réplicats testés à 10<sup>6</sup> UFC/ml de SB. Les autres organismes et les acides nucléiques se sont avérés non réactifs avec l'essai C. difficile.

Pour le virus Coxsackie seulement, la réactivité croisée avec les amorces et les sondes de l'essai C. difficile a été vérifiée dans le cadre d'une analyse *in silico* portant sur toutes les souches du virus Coxsackievirus figurant dans la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) entre le 7 février 2017 et le 11 août 2017. L'analyse indique que les souches du virus Coxsackie ne devraient pas réagir avec l'essai C. difficile.

**Tableau 8.** Liste des organismes dont la réaction croisée a été testée avec l'analyse *C. difficile*

Bactéries	
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> ( <i>Campylobacter coli</i> )	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>
<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Clostridium novyi</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Flavonifractor plautii</i> ( <i>Clostridium orbiscindens</i> )	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Clostridium scindens</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Clostridium difficile</i> (non toxinogène) – ATCC® 43593™	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Clostridium difficile</i> (non- toxinogène) – ATCC® 43601™	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizona</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Shigella boydii</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella sonnei</i>
Levure	
<i>Candida albicans</i>	
Virus	
Adenovirus humain 1 (ADN)	Rotavirus (ARN)
Enterovirus D68 (ARN)	Norovirus (ARN)
Echovirus 4 (ARN)	Herpesvirus 5 humain (Cytomegalovirus) (ADN)
Virus Coxsackie ( <i>in silico</i> )	
ADN humain	
	ADNg humain

#### ORGANISMES CAUSANT UNE INTERFÉRENCE

L'effet inhibiteur potentiel de 30 organismes susceptibles d'être présents dans la flore intestinale normale et qui ne sont pas ciblés par le test a été évalué au moyen d'organismes sélectionnés à partir de l'étude sur la réactivité croisée (Tableau 8). Chaque catégorie d'organisme (c.-à-d. bactérie, levure, virus) était représentée et des efforts particuliers ont été déployés pour inclure les agents les plus souvent mis en cause dans les infections intestinales. Des groupes de deux à six organismes ont été préparés dans une matrice de selles liquides négative pour les souches toxinogènes de *C. difficile* et ont été testés en dupliques en présence de 3 750 UFC de tampon d'échantillon de la souche toxinogène de *C. difficile* ATCC® 43255™ ou de 4 500 UFC de tampon d'échantillon de la souche toxinogène de *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ pour évaluer leur potentiel d'interférence dans la détection des souches toxinogènes de *C. difficile* ou du contrôle de procédé. Chaque organisme a été dilué pour atteindre une charge d'au moins 10<sup>6</sup> UFC/mL de tampon d'échantillon pour les bactéries et la levure et d'au moins 10<sup>5</sup> copies/mL de tampon d'échantillon pour les virus. Les 30 organismes inclus dans l'étude sont présentés au Tableau 9.

**Tableau 9.** Liste des organismes dont l'interférence a été testée avec l'analyse *C. difficile*

Groupe 1	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> ( <i>Campylobacter coli</i> )	
Groupe 2	
<i>Candida albicans</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Clostridium difficile</i> (non toxinogène) – ATCC® 43593™	<i>Clostridium difficile</i> (non toxinogène) – ATCC® 43601™
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium sordellii</i>
Groupe 3	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
<i>Helicobacter pylori</i>	
Groupe 4	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
Groupe 5	
<i>Shigella boydii</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Shigella sonnei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Groupe 6	
Rotavirus (ARN)	Norovirus (ARN)

Aucun des 30 organismes présents dans au moins 10<sup>6</sup> UFC/mL de tampon d'échantillon pour les bactéries et la levure et dans au moins 10<sup>5</sup> copies/mL de tampon d'échantillon pour les virus n'ont exercé d'interférence lors de la détection du contrôle de procédé et de la souche toxinogène de *C. difficile* ATCC® BAA-1805™.

Les groupes 3 et 5 ont présenté un effet inhibiteur potentiel sur la détection de la souche toxinogène de *C. difficile* ATCC® 43255™. Toutefois, lorsque chacune des bactéries de ce groupe a été testée individuellement à une charge d'au moins 10<sup>6</sup> UFC/mL de tampon d'échantillon en présence de la souche de *C. difficile* ATCC® 43255™, aucune interférence n'est survenue.

#### SUBSTANCES CAUSANT UNE INTERFÉRENCE

L'effet inhibiteur potentiel de 16 substances exogènes et cinq substances endogènes qui pourraient être présentes dans le tube digestif a été évalué au moyen d'échantillons négatifs pour les souches toxinogènes de *C. difficile* et des souches toxinogènes de *C. difficile* ATCC® 43255™ et ATCC® BAA-1805™ à deux à trois fois leur LD<sub>50</sub> respective (3 750 UFC/mL de tampon d'échantillon ou 4 500 UFC/mL de tampon d'échantillon en présence d'une matrice de selles liquides). Les substances ont été testées aux concentrations potentielles les plus élevées qui pourraient être présentes dans un échantillon de selles. Les résultats obtenus pour 21 de ces substances sont présentés au tableau 10.

Les résultats n'ont démontré aucune interférence mesurable sur le contrôle de procédé. Le carbonate de calcium (p. ex., Tums®) et l'hydroxyde d'aluminium/hydroxyde de magnésium (p. ex., Stomax®) ont présenté un effet inhibiteur potentiel sur la détection des souches toxinogènes de *C. difficile* lorsque l'une de ces substances est présente dans le tube échantillon à une concentration de plus de 0,5 mg/mL (0,5% P/V) ou de plus de 0,5 µL/mL (0,5% V/V), respectivement. Lorsqu'elles sont été testées à 0,5 mg/mL (0,5% P/V) ou 0,5 µL/mL (0,5% V/V), respectivement, ces substances n'ont révélé aucune interférence mesurable avec l'essai *C. difficile*.

Tableau 10. Liste des substances exogènes et endogènes testées avec l'essai *C. difficile*.

Substances exogènes		
Substance (nom commercial)	Concentration ou quantité dans le tube échantillon1	Résultats2
Antifongique vaginal/anti-démangeaison (Nystatin)	0,5 % P/V	AI
Crèmes/onguents (crème d'hydrocortisone Personnelle)	0,5 % V/V	AI
Crèmes/onguents anti-hémorroïdes (Preparation H®)	0,5 % V/V	AI
Antacides (Tums®)	0,5 % P/V	I <sup>3</sup>
Antacides (Stomax®)	0,5 % V/V	I <sup>4</sup>
Lavements (Huile minérale USP liquide Life BRAND™)	0,5 % V/V	AI
Lavements (mésalazine ou acide 5-aminosalicylique)	0,5 % P/V	AI
Condom avec lubrifiant spermicide (condom Trojan ® avec lubrifiant spermicide)	Carré de 2 mm <sup>2</sup>	AI
Anti-diarrhée (Pepto Bismol™)	0,5 % V/V	AI
Anti-diarrhée (Imodium®)	0,5 % V/V	AI
Laxatifs (Senokot®)	0,5 % V/V	AI
Antibiotiques oraux et topiques (Vancomycine)	0,5 % V/V	AI
Antibiotiques oraux et topiques (Métronidazole)	0,5 % P/V	AI
Anti-inflammatoires non stéroïdiens (Aleve®)	0,5 % P/V	AI
Lingettes humides (lingettes humides jetables à la toilette Equate™)	Carré de 2 mm <sup>2</sup>	AI
Lingettes humides (Wet Ones®)	Carré de 2 mm <sup>2</sup>	AI
Substances endogènes		
Substance	Concentration ou quantité dans le tube échantillon1	Résultats2
Gras fécal, mélange de triglycérides (C2-C10)	0,5 % V/V	AI
Gras fécal, acide palmitique	1,0 % P/V	AI
Gras fécal, acide stéarique	0,5 % P/V	AI
Sang complet	0,5 % V/V	AI
Mucus	0,5 % V/V	AI

<sup>1</sup>P/V : Poids/Volume; V/V : Volume/Volume<sup>2</sup>I : Interférence avec l'essai *C. difficile*; AI : Aucune interférence avec l'essai *C. difficile*<sup>3</sup>Aucune interférence à 0,05 % P/V<sup>4</sup>Aucune interférence à 0,05 % V/V**CONTAMINATION PAR RECIRCULATION ET CONTAMINATION CROISÉE**

La contamination par recirculation et la contamination croisée au cours des séries et entre les séries ont été évaluées au moyen d'échantillons positifs préparés dans une matrice de selles liquides négatives pour les souches toxinogènes de *C. difficile* pour obtenir une concentration finale de 10<sup>7</sup> UFC/ml de tampon échantillon de la souche toxinogène de *C. difficile* ATCC® 43255™. Des échantillons vrais négatifs, préparés dans une matrice de selles liquides négatives pour les souches toxinogènes de *C. difficile* seulement, ont également été testés.

Pour l'étude sur la contamination au cours des séries, 10 essais ont été exécutés par deux opérateurs à l'aide de l'essai *C. difficile* sur un instrument Revogene. Quatre échantillons fortement positifs et quatre échantillons négatifs ont été testés en alternant les échantillons positifs et négatifs à chaque exécution. Pour l'étude sur la contamination entre les séries, une série de 8 réplicats d'échantillons fortement positifs, suivie par une série de 8 réplicats d'échantillons négatifs ont été exécutées par deux opérateurs, ce qui donne au total 10 séries sur un instrument Revogene.

Ces tests ont démontré l'absence de contamination par recirculation et de contamination croisée.

**REPRODUCTIBILITÉ/PRÉCISION****REPRODUCTIBILITÉ**

Une étude sur la reproductibilité entre les centres a été menée à trois centres par deux opérateurs dans chaque centre sur une période de cinq jours et à l'aide d'un lot de kits de l'essai *C. difficile*.

L'étude sur la reproductibilité entre les lots a été menée à un centre par deux opérateurs sur une période de 15 jours et à l'aide de trois lots de kits de l'essai *C. difficile* (5 jours par lot de kits). Pour chaque étude sur la reproductibilité, 120 réplicats pour les échantillons négatifs et 90 réplicats pour chaque catégorie d'échantillons positifs, tous préparés dans une matrice de selles liquides négatives pour les souches toxinogènes de *C. difficile*, ont été testés. Deux souches toxinogènes de *C. difficile* ont été utilisées pour les échantillons positifs : ATCC® 43255™ (toxintype 0, ribotype 087) et ATCC® BAA-1805™ (toxintype IIb, NAP 1, ribotype 027).

Les catégories d'échantillons se décrivent comme suit :

1. Faible positif (FP) : Des souches ATCC® 43255™ et ATCC® BAA-1805™ ont été enrichies à 2 438 UFC/mL et 2 925 UFC/mL de SB, respectivement.

2. Modéré positif (MP) : Des souches ATCC® 43255™ et ATCC® BAA-1805™ ont été enrichies à 3 750 UFC/mL et 4 500 UFC/mL de SB, respectivement.

3. Vrai négatif (VN) : échantillons sans souche toxinogène de *C. difficile*

Les résultats pour chaque catégorie d'échantillons testés au cours des études sur la reproductibilité entre les centres et entre les lots sont présentés aux Tableaux 11 et 12, respectivement. Pour la reproductibilité entre les centres, le pourcentage de concordance globale a été de 100 % pour les VN, les FP et les MP de la souche toxinogène de *C. difficile* ATCC® BAA-1805™. Le pourcentage de concordance global pour les FP et les MP de la souche toxinogène de *C. difficile* ATCC® 43255™ ont été de 94,4 % et 96,7 % respectivement (Tableau 11). Pour la reproductibilité entre les lots, le pourcentage de concordance globale a été de 100 % pour les VN et les MP de la souche toxinogène de *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ et de 98,9 % pour les FP. Le pourcentage de concordance global pour les FP et les MP de la souche toxinogène de *C. difficile* ATCC® 43255™ ont été de 94,4 % et 96,7 % respectivement (Tableau 12).

Les valeurs Ct (nombre limite de cycles) moyennes globales avec les composants de variance (ET et % CV) sont présentées aux Tableaux 11 et 12.

Tableau 11. Résultats de l'étude sur la reproductibilité entre les centres menée au moyen d'un lot de kits de l'essai *C. difficile*

Catégorie	Souche toxinogène <i>C. difficile</i> (numéro ATCC®)	Centre 1		Centre 2		Centre 3		Résultats globaux/total	Pourcentage de concordance global <sup>1</sup>	IC globale à 95 %	Valeurs Ct <sup>2</sup>		
		Résultats/total	Pourcentage de concordance	Résultats/total	Pourcentage de concordance	Résultats/total	Pourcentage de concordance				Moyenne globale	ET	% CV
FP	ATCC® 43255™	27/30	90,0 %	28/30	93,3 %	30/30	100 %	85/90	94,4 %	87,5 %-98,2 %	38,48	1,56	4,05
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	90/90	100 %	96,7 %-100 %	36,37	2,74	7,54
MP	ATCC® 43255™	29/30	96,7 %	29/30	96,7 %	29/30	96,7 %	87/90	96,7 %	90,6 %-99,3 %	37,68	1,63	4,32
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	90/90	100 %	96,7 %-100 %	36,57	1,65	4,52
VN	S/O	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	97,5 %-100 %	33,09	1,02	3,09

<sup>1</sup>Pour la catégorie VN, le pourcentage de concordance a été calculé pour les résultats négatifs.

<sup>2</sup>Pour les catégories FP et MP, les valeurs Ct indiquées correspondent à la cible de *C. difficile* toxinogène. Pour la catégorie VN, les valeurs Ct indiquées correspondent au contrôle de procédé.

Tableau 12. Résultats de l'étude sur la reproductibilité entre les lots menée à un centre au moyen de trois lots de kits de l'essai *C. difficile*

Catégorie	Souche toxinogène <i>C. difficile</i> (numéro ATCC®)	Lot 1		Lot 2		Lot 3		Résultats globaux/total	Pourcentage de concordance global <sup>1</sup>	IC globale à 95 %	Valeurs Ct <sup>2</sup>		
		Résultats/total	Pourcentage de concordance	Résultats/total	Pourcentage de concordance	Résultats/total	Pourcentage de concordance				Moyenne globale	ET	% CV
FP	ATCC® 43255™	27/30	90,0 %	27/30	90,0 %	28/30	93,3 %	82/90	91,1 %	83,2 %-96,1 %	38,57	1,72	4,46
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100 %	29/30	96,7 %	30/30	100 %	89/90	98,9 %	94,0 %-100 %	37,02	1,98	5,35
MP	ATCC® 43255™	29/30	96,7 %	30/30	100 %	28/30	93,3 %	87/90	96,7 %	90,6 %-99,3 %	37,55	2,16	5,75
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	90/90	100 %	96,7 %-100 %	36,86	1,31	3,56
VN	S/O	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	97,5 %-100 %	33,21	0,90	2,71

<sup>1</sup>Pour la catégorie VN, le pourcentage de concordance a été calculé pour les résultats négatifs.

<sup>2</sup>Pour les catégories FP et MP, les valeurs Ct indiquées correspondent à la cible de *C. difficile* toxinogène. Pour la catégorie VN, les valeurs Ct indiquées correspondent au contrôle de procédé.

**PRECISION**

Une étude sur la précision a été menée à un centre par deux opérateurs sur une période de 12 jours et à l'aide d'un lot de kits de l'essai *C. difficile*.

Pour chaque catégorie, tous les échantillons ont été préparés dans une matrice de selles liquides négatives pour les souches toxinogènes de *C. difficile*. Deux souches toxinogènes de *C. difficile* ont été utilisées pour les échantillons positifs : ATCC® 43255™ (toxinotype 0, ribotype 087) et ATCC® BAA-1805™ (toxinotype IIb, NAP 1, ribotype 027).

Les catégories d'échantillons se décrivent comme suit :

1. Faible positif (FP) : Des souches ATCC® 43255™ et ATCC® BAA-1805™ ont été enrichies à 2 438 UFC/mL et 2 925 UFC/mL de SB, respectivement.
2. Modéré positif (MP) : Des souches ATCC® 43255™ et ATCC® BAA-1805™ ont été enrichies à 3 750 UFC/mL et 4 500 UFC/mL de SB, respectivement.
3. Vrai négatif (VN) : échantillons sans souche toxinogène de *C. difficile*

Les résultats de l'étude sur la précision pour les VN et les FP de la souche toxinogène de *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ ont démontré une concordance de 100 %; cette concordance était de 97,2 % pour les MP. Les résultats de l'étude sur la précision pour les FP et les MP de la souche toxinogène de *C. difficile* ATCC® 43255™ ont été de 88,9 % et 95,8 % respectivement (**Tableau 13**).

**Tableau 13.** Pourcentage de concordance de l'étude sur la précision menée à un centre et à l'aide d'un lot de kits de l'essai *C. difficile*

Catégorie	Numéro ATCC® de souches toxinogènes <i>C. difficile</i>	Pourcentage de concordance global <sup>1</sup>	IC globale à 95 %
FP	ATCC® 43255™	88,9 %	79,3 %-95,1 %
	ATCC® BAA-1805™	100 %	95,9 %-100 %
MP	ATCC® 43255™	95,8 %	88,3 %-99,1 %
	ATCC® BAA-1805™	97,2 %	90,3 %-99,7 %
VN	S/O	100 %	96,9 %-100 %

<sup>1</sup> Pour la catégorie VN, le pourcentage de concordance a été calculé pour les résultats négatifs.

**ÉTIQUETAGE ÉLECTRONIQUE**

Les documents liés à ce produit sont accessibles en ligne à l'adresse suivante: [www.meridianbioscience.com/pi](http://www.meridianbioscience.com/pi). De plus, vous pouvez obtenir des exemplaires papier de ces documents en communiquant avec votre distributeur local ou en composant le numéro de téléphone inscrit sur la boîte du kit.

## C. difficile

Para uso con Revogene®

REF 410300

IVD Para uso diagnóstico *in vitro*



### USO PREVISTO

El ensayo Revogene C. difficile se realiza con el equipo Revogene es una prueba diagnóstica cualitativa *in vitro* que utiliza procesamiento automatizado de muestras y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real para detectar el gen de toxina B (*tcdB*) de *Clostridium difficile* (*C. difficile*) en muestras de deposiciones informes (líquidas o blandas) de pacientes con sospecha de tener infección por *C. difficile* (ICD). El ensayo Revogene C. difficile está previsto para su uso en el diagnóstico de ICD.

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

*C. difficile* es un bacilo grampositivo, anaeróbico formador de esporas, que forma parte de la flora intestinal normal presente entre el 1 % y el 3 % de los adultos y hasta en el 45 % de los lactantes<sup>1,2</sup>. En pacientes que están tomando antibióticos en dosis elevadas o durante períodos prolongados, la flora intestinal normal (bacterias) puede destruirse, lo que permite la proliferación de *C. difficile*. En esos casos, *C. difficile* produce toxinas que pueden dañar los intestinos y causar diarrea de leve a grave, así como trastornos intestinales potencialmente mortales, como colitis pseudomembranosa (inflamación del intestino grueso), megacolon tóxico y septicemia<sup>3,4,5,6</sup>.

La infección por *C. difficile* (ICD) es la principal causa de diarrea infecciosa en hospitales y en centros de cuidados de larga estancia en los países industrializados.

*C. difficile* se expulsa con las heces. La infección suele producirse al tocar objetos o superficies contaminados con deposiciones y luego al hacer contacto con boca o nariz. Los trabajadores sanitarios pueden propagar las bacterias a otros pacientes o contaminar las superficies por contacto con la mano.

La epidemiología de ICD ha cambiado en la última década<sup>7,8</sup>. Las cepas epidémicas (BI / NAP1 / 027) de *C. difficile* virulento causan dolencias graves que suelen requerir colectomía y el consecuente aumento de la mortalidad<sup>4,5</sup>. Estas cepas tienen más probabilidad de propagarse en hospitales, debido a la resistencia antimicrobiana y la formación de esporas.

Las directrices de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) recomiendan el uso de un diagnóstico de *C. difficile* para pacientes que presentan factores de riesgo clínico (como deposiciones informes) y epidemiológicos, dado que la identificación rápida de infecciones por *C. difficile* es de importancia crucial en la gestión de la enfermedad<sup>9</sup>.

Unas pruebas diagnósticas rápidas, de alta sensibilidad y específicas son herramientas necesarias para la detección temprana de la enfermedad y para el desarrollo de medidas de control eficaces en la lucha contra la ICD. El tratamiento empírico sin un diagnóstico de ICD preciso es inadecuado ya que, incluso en un entorno epidémico, solamente alrededor del 30 % de los pacientes hospitalizados padecerá una ICD<sup>10</sup>. La eficiencia y la eficacia del diagnóstico de ICD sigue siendo un reto para el personal clínico y los microbiólogos.

El ensayo Revogene C. difficile puede proporcionar resultados a partir de hasta ocho muestras en aproximadamente 70 minutos. El ensayo reduce a un mínimo la intervención del operador desde el momento en el que el cartucho de microfluidos desechable de un solo uso (de aquí en adelante, PIE) con la muestra se coloca en la cinta de Revogene hasta que los resultados están disponibles.

### PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El Revogene automatiza la homogeneización y dilución de muestras, la lisis celular, la amplificación de ADN y la detección de productos de PCR amplificados. Solamente se necesita la intervención del usuario para descargar las muestras del paciente en el Sample Buffer Tube (TTM), transferir la muestra desde el TTM al PIE y cargar o descargar los PIE de la cinta de Revogene.

Cada PIE es un dispositivo cerrado totalmente integrado en el que una muestra se dispensa y se procesa mediante distintas cámaras y canales microfluídicos que permiten procesar las muestras (esto es, homogeneización y dilución de muestras y lisis celular) y realizar los pasos subsiguientes de la PCR en tiempo real. El líquido de una sola muestra se transfiere mediante centrifugado de una cámara a la siguiente en secuencia, y todos los reactivos específicos para la PCR se incorporan y secan en los pocillos de PCR. (Figura 1).

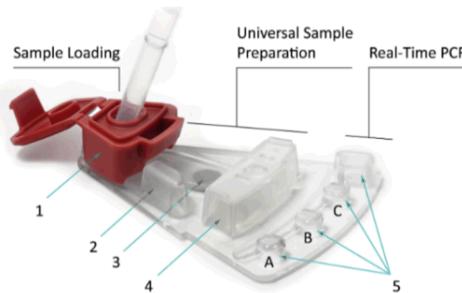


Figura 1. Vista superior de un PIE.  
1: Cámara de carga de la muestra. 2: Cámara desbordamiento. 3: Cámara de homogeneización con CPr en su interior.  
4: Cámara de dilución/lisis. 5: Tres (3) pocillos de PCR (A a C de izquierda a derecha) y una (1) Cámara de residuos (en el lado derecho).

Hay un Control de proceso (CdP) integrado en cada PIE para verificar el procesamiento de muestras y los pasos de amplificación. El CdP permite supervisar la presencia de posibles sustancias inhibidoras, así como de fallos en los microfluidos, los reactivos o el equipo. Los productos amplificados se detectan en tiempo real utilizando sondas químicas TaqMan® específicas de la diana. Después de cargar el PIE en Revogene, no se necesita ninguna intervención por parte del operador.

El Revogene puede procesar entre una y ocho muestras simultáneamente en una sola serie analítica. La cinta debe contener ocho PIE para mantener el equilibrio termodinámico durante la serie analítica. Al completarse una serie analítica, el sistema computa los resultados a partir de las señales de fluorescencia medidas y algoritmos de cálculo integrados. El usuario puede imprimir, transferir o almacenar los resultados que se muestran en la pantalla táctil mediante el puerto USB o la opción de conectividad.

### REACTIVOS Y MATERIALES

El kit para C. difficile contiene suficientes reactivos y materiales para procesar 24 muestras. El kit contiene los siguientes materiales:

1. 24 asas de transferencia desechables (LOOP): El LOOP es un asa de 5 microlitros ( $\mu$ L) de un solo uso para transferir la muestra de heces sin consistencia (líquidas o blandas) al TTM.
2. 24 dispositivos de transferencia desechables (DTD): El DTD consiste en una pipeta de transferencia de un solo uso para transferir la muestra del TTM al PIE.
3. 24 tubos de tampón de muestra (TTM): tubo con etiqueta de código de barras con una solución tamponada de TE 1X (Tris-HCl pH 8,0/EDTA.Na2) que actúa de tampón de dilución y conservación de la muestra.
4. 24 bolsas individuales, cada una de ellas con un (1) PIE C. difficile: dispositivo integrado con etiqueta de código de barras compuesto de reactivos secos para procesar la muestra y para los pasos de la PCR en tiempo real con el fin de amplificar/detectar simultáneamente el ADN del CdP y el ADN del gen de la toxina B de C. difficile.

### MATERIALES/EQUIPOS NECESARIOS, PERO NO SUMINISTRADOS

1. Revogene® (n.º de cat. 610210)

2. Guantes desechables, sin polvo

3. Agitadora vibracional con una velocidad máxima de al menos 3200 rpm

4. Gradilla de muestras (n.º de cat. 132539; opcional)

5. PIE MOCK (n.º de cat. 610208; opcional)

## AVISO Y PRECAUCIONES

1. Este producto solamente se puede utilizar con Revogene.
2. No use el kit si la etiqueta que sella la caja externa está rota al recibir el producto.
3. No utilice los PIE *C. difficile* si las bolsitas protectoras están abiertas o rotas al recibir el producto.
4. No intercambie DTD, tubo de tampón para muestras ni PIE entre lotes de kits.
5. Cada LOOP, DTD y PIE *C. difficile* de un solo uso sirve para procesar una sola muestra. No reutilice LOOP, DTD ni PIE.
6. Manipule todas las muestras como si fueran infecciosas, de acuerdo con las prácticas recomendadas de laboratorio que se describen en Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories<sup>11</sup> y en el documento M29-A4 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>12</sup>.
7. Lleve guantes desechables sin polvo al manipular las muestras y lávese las manos minuciosamente después de hacerlo.
8. El PIE *C. difficile* contiene reactivos secos. No se debe abrir la bolsita protectora hasta que todo esté listo para realizar la prueba.
9. Deseche los reactivos y los materiales no utilizados y los desechos, incluidos los PIE utilizados, de acuerdo con la legislación local, estatal, provincial, federal o nacional aplicable.
10. No abra ni rompa el PIE después de usarlo, de manera de evitar la contaminación con productos de amplificación o partículas infecciosas.
11. No utilice un PIE que se haya caído, que haya recibido sacudidas o que se haya invertido después de cargar la muestra, ya que esto puede provocar resultados no válidos.
12. El ensayo *C. difficile* no proporciona resultados de susceptibilidad. Para cultivar y llevar a cabo pruebas de susceptibilidad, se requiere tiempo adicional.
13. No utilice kits que hayan superado la fecha de caducidad indicada.
14. No refrigerue los PIE cargados.
15. Si la cantidad de deposiciones supera la cantidad recomendada, puede impedir la realización del ensayo *C. difficile*.
16. Cada serie analítica se debe realizar con ocho PIE en la cinta del Revogene, de manera de mantener un equilibrio termodinámico y mecánico durante la ejecución de la serie.

## DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

No se conoce ningún riesgo asociado con este producto.

## ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Durante el transporte, las muestras recogidas se deben almacenar a una temperatura de entre 2 C y 25 C.
2. Las muestras de deposiciones pueden almacenarse a 25 C durante un máximo de 2 días o a una temperatura de entre 2 C y 8 C durante un máximo de 4 días. El TTM inoculado se puede almacenar a 25 C durante un máximo de 2 días o a una temperatura de entre 2 C y 8 C durante un máximo de 3 días.
3. Guarde el kit *C. difficile* a una temperatura comprendida entre 2 C y 25 C. La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del equipo.
4. No abra las bolsitas hasta que no esté todo listo para realizar las pruebas. Una vez abierta la bolsa, los PIE se deben utilizar en menos de 1 hora.

## INSTRUCCIONES DE USO

### RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Tipo de muestra: muestras de deposiciones informes (líquidas o blandas) de pacientes con sospecha de tener ICD.

Recoja las deposiciones informes en un contenedor limpio y seco, de acuerdo con las normas o procedimientos locales.

1. Transfiera las deposiciones líquidas o blandas (sin orina) al contenedor. Evite mezclar papel higiénico, agua o jabón con la muestra.
2. Etiquete el contenedor con la identificación (ID) de la muestra o del paciente, y envíelo al laboratorio para las pruebas (consulte el apartado Almacenamiento y estabilidad).

### PREPARACIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS

NOTA 1: comience la prueba antes de que haya pasado 1 hora desde que se abrió la bolsita del PIE.

#### PREPARACIÓN DEL SBT

1. Saque un LOOP y un TTM de la caja del kit por cada muestra que se vaya a analizar.
2. Identifique (o etiquete) el SBT con la identificación adecuada de la muestra sin tapar ni escribir sobre los códigos de barras. Ponga el TTM en la gradilla de muestras de Revogene, en su caso.
3. Agite la muestra a velocidad máxima durante 15 segundos. Introduzca el LOOP provisto en las deposiciones. Retire las deposiciones blandas sobrantes que pueda haber en el exterior del asa, hasta tomar una cantidad aproximada de 5 µL.
4. Quite la tapa del SBT, agite el LOOP dentro del TTM durante 2 o 3 segundos o gírelo para retirar la muestra del asa. Solo puede haber abierto un tubo de tampón para muestras en cada momento.
5. Vuelva a colocar la tapa en el TTM, ciérrela firmemente y colóquelo en la gradilla de muestras de Revogene, en su caso.
6. Si hay más muestras para pruebas, prepárelas repitiendo los pasos del 1 al 5. Luego, vaya al paso 7.
7. Cuando todas las muestras estén preparadas, siga con la preparación del PIE *C. difficile* (apartado siguiente).

#### PREPARACIÓN DEL PIE

NOTA 1: procese una muestra a la vez:

8. Agite el TTM durante 15 segundos a velocidad máxima.
9. Abra la bolsa PIE.
10. Coloque el PIE *C. difficile* en la gradilla de muestras de Revogene, en su caso.
11. Saque un DTD de la caja del kit y aspire el tampón de muestra apretando del todo el bulbo. El nivel de líquido en la DTD debe estar entre las dos marcas (Figura 2). Si el nivel de líquido no está entre las dos marcas, apriete la perilla hasta el final para descargar el volumen del tampón de la muestra por completo en el TTM y repita el paso 11.
12. Descargue el tampón de la muestra por completo en la cámara de carga de la muestra del PIE (Figura 1).
13. Cierre la tapa del PIE firmemente; compruebe que el tapón quede bien colocado. No refrigerue los PIE cargados. Solo puede haber abierto un PIE en cada momento.
14. Repita del paso 8 al 13 para las muestras adicionales que haya y, a continuación, vaya al paso 15.
15. Las muestras de deposiciones y el SBT inoculado se puede conservar a una temperatura entre 2 C y 8 C o a 25 C por los tiempos definidos en el apartado Almacenamiento y estabilidad.

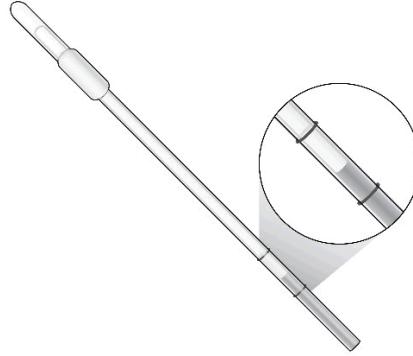


Figura 2.  
Representación de un nivel adecuado de tampón de muestra utilizando la Disposable Transfer Tool (DTD).

#### FUNCIONAMIENTO DE REVOCENE

NOTA 1: se pueden procesar ocho muestras simultáneamente como máximo en una sola serie analítica utilizando Revogene (incluidos los controles externos).

NOTA 2: cada serie analítica se debe realizar con ocho PIE en Revogene. Si se van a procesar menos de ocho muestras, los espacios vacíos se deben llenar con MOCK PIEs\*.

NOTA 3: consulte el Manual del usuario de Revogene<sup>13</sup> para obtener más información sobre la preparación y el uso del Revogene.

1. Encienda el Revogene (si todavía no lo hizo). El software se iniciará automáticamente.
2. Para iniciar sesión, introduzca el <Nombre de usuario> y la <Contraseña> y toque <Iniciar sesión>. El menú principal aparece automáticamente.
3. Toque <Config. serie analítica>.
4. Introduzca el número de identificación de la muestra con el escáner de códigos de barras o a mano. Para la introducción manual, toque el ícono del lápiz de la línea <Escanear o especificar ID de la muestra>.
5. Introduzca los códigos de barras del TTM y el PIE *C. difficile* mediante el escáner de códigos de barras del Revogene. Para ello, coloque los PIE en posición vertical delante del escáner. De manera alternativa, puede introducir manualmente los códigos de barras del TTM y los PIE. Para ello, toque el ícono del lápiz en las líneas correspondientes. Maneje los PIE con cuidado, sin dejarlos caer, sacudirlos ni ponerlos boca abajo.
6. (Optional) Toque el ícono del lápiz de la línea <Añadir comentarios> y escriba un comentario.
7. Inserte el PIE *C. difficile* en el Revogene, en cualquiera de las posiciones de la cinta. El software asociará automáticamente la muestra y el tubo de tampón para muestras con el PIE *C. difficile* correcto.
8. Confirme que el PIE esté insertado en el equipo. Para hacerlo, toque <Aceptar> en la línea <Introducir el PIE en el equipo> y repita del paso 4 al 8 para todas las muestras.
9. Después de haber insertado todos los PIE *C. difficile* en el equipo y los MOCK PIEs cuando sea necesario, toque <Siguiente>.
10. Escanee la anilla de sujeción y colóquela en la cinta. Cierre la tapa del equipo.
11. Toque <Iniciar> para comenzar la serie analítica.

\*Si no hay ningún MOCK PIE disponible, utilice PIE de ensayo sin usar rellenos con tampón para muestras no inoculado (NEUTRO) o con controles externos.

## VISUALIZAR Y EXPORTAR RESULTADOS

NOTA 1: consulte el Manual del usuario de Revogene<sup>13</sup> para obtener información adicional acerca de la adquisición de los resultados de la prueba.

1. Una vez finalizada la serie analítica, la tapa se abre automáticamente.
2. Toque el ícono **Inicio**.
3. Si se ha cerrado la sesión en Revogene, introduzca de nuevo el <Nombre de usuario> y la <Contraseña> y toque <Iniciar sesión>. El menú principal aparece automáticamente.
4. Toque el ícono <Resultados> para acceder a los resultados de la prueba.
5. Toque <Última serie> para ver los resultados de la última prueba.
6. En <Última serie>, seleccione las muestras para las que se deben exportar informes de resultados. Para seleccionar todas las muestras a la vez, haga clic en la primera casilla a la izquierda de la columna "ID de la muestra".
7. Toque <Exportar> y guarde donde corresponda (por ej. en una llave USB).
8. Retire la anilla de sujeción y los PIE C. *difficile* del Revogene. Los PIE C. *difficile* utilizados se deben desechar en contenedores para desechos adecuados según las prácticas estándar de la institución.

## REPETIR PROCEDIMIENTO DE PRUEBAS

### MUESTRAS CON RESULTADO NO RESUELTO O INDETERMINADO

Cuando se obtiene el resultado No resuelto (NOR) o Indeterminado (IND) para una muestra, se debe repetir la prueba con el TTM inoculado correspondiente dentro del tiempo especificado que se describe en el apartado **Almacenamiento y estabilidad**. Solo se puede realizar una prueba repetida con el SBT.

Agite el TTM durante al menos 15 segundos a velocidad máxima con una agitadora vortical. Con una bolsita nueva, siga del paso 9 al 13 del apartado **Preparación y manejo de muestras / Preparación del PIE** y, a continuación, pase al apartado **Funcionamiento de Revogene**.

### RESULTADO NO RESUELTO, INDETERMINADO, FALSO NEGATIVO O FALSO POSITIVO PARA UN CONTROL EXTERNO

Cuando se obtiene un resultado no resuelto, indeterminado, falso negativo o falso positivo para un control externo, la serie analítica no es válida. Las muestras incluidas en la serie analítica se deben repetir con el TTM inoculado correspondiente, junto con controles externos nuevos, dentro del tiempo que se describe en el apartado **Almacenamiento y estabilidad**. Consulte las instrucciones para preparar controles externos nuevos en el apartado siguiente, **Control de calidad**.

Para la repetición de la prueba con el TTM inoculado correspondiente, agite el TTM durante por lo menos 15 segundos a velocidad máxima utilizando una agitadora vortical. Con una bolsita nueva, siga del paso 9 al 13 del apartado **Preparación y manejo de muestras / Preparación del PIE** y, a continuación, pase al apartado **Funcionamiento de Revogene**.

## CONTROL DE CALIDAD

Los procedimientos de control de calidad supervisan la exactitud y la precisión del proceso de análisis. Cada laboratorio debe establecer el número, el tipo y la frecuencia de uso de los materiales de control de los ensayos según las normas aplicables o las agencias acreditadoras. En su caso, se puede aplicar el procedimiento descrito a continuación, en función de los procedimientos y políticas locales.

NOTA 1: para cada preparación de control externo, se deben utilizar un LOOP, DTD, TTM y PIE independientes.

1. Cada PIE C. *difficile* contiene un Control de proceso (CdP) que permite verificar la homogeneización y dilución de muestras, la lisis celular, la inhibición de la amplificación de ADN y los fallos de reactivos de ensayo.
2. Las prácticas recomendadas de laboratorio incluyen el uso de materiales de control. El usuario debe seguir las directrices adecuadas en relación con la realización de controles externos. Es recomendable realizar un control externo positivo y un control externo negativo al menos una vez al día hasta conseguir la validación de procesos adecuada con el ensayo C. *difficile* en Revogene con todas las configuraciones de laboratorio.
3. Meridian Bioscience, Inc. no suministra materiales de control externo. El software de Revogene no utiliza los controles externos para la interpretación de resultados de pruebas de muestras. Los controles externos se manejan como si fueran muestras.
4. Se recomiendan varios tipos de controles externos para permitir que el usuario seleccione el más apropiado para su programa de control de calidad de laboratorio. Preparaciones de control externo de procesos y pruebas de acuerdo con el apartado **Preparación y manejo de muestras**.

### Control positivo externo:

1. Se recomienda utilizar una suspensión celular recién preparada de una cepa de C. *difficile* toxigénico como control externo positivo, que contenga el gen *tcDB*, de material de control disponible comercialmente (por ejemplo, ATCC® 43255™) preparada a 0,5 ± 0,05 de McFarland y diluida 1/2 en solución salina (por ejemplo, solución salina preparada BD BBL™, n.º de cat 221819).
2. Como alternativa, se recomienda utilizar una muestra de deposiciones anteriormente caracterizada como positiva para C. *difficile* toxigénico como control externo positivo.

### Control negativo externo:

1. Se recomienda utilizar una suspensión celular recién preparada de una cepa de C. *difficile* no toxigénico como control externo negativo, de material de control disponible comercialmente (por ejemplo, ATCC® 43593™) preparada a 0,5 ± 0,05 de McFarland en solución salina (por ejemplo, solución salina preparada BD BBL™, n.º de cat 221819).
2. Como alternativa, se recomienda utilizar una muestra de deposiciones anteriormente caracterizada como negativa para C. *difficile* toxigénico como control externo negativo.

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El equipo Revogene computa los resultados a partir de las señales de fluorescencia medidas mediante algoritmos de cálculo integrados. Los resultados están disponibles en la ventana "Resultados". Estos son los posibles resultados:

Muestra	Símbolo	Resultado	Interpretación
Muestra del paciente		Positivo	Se ha detectado ADN diana del C. <i>difficile</i> toxigénico.
		Negativo	No se ha detectado ADN diana del C. <i>difficile</i> toxigénico.
		No resuelto	Error de amplificación/detección del control de proceso, así como en el ADN diana del C. <i>difficile</i> toxigénico. Se puede deber a la presencia de sustancias inhibidoras, o a fallos de microfluidos o reactivos. Se debe repetir la prueba (consulte las instrucciones en el apartado Repetir procedimiento de pruebas).
		Indeterminado	No se puede informar un resultado, probablemente debido a un error detectado en Revogene durante el procesamiento del ensayo, el análisis de los datos o si el usuario interrumpe la serie analítica. Se debe repetir la prueba (consulte las instrucciones en el apartado Repetir procedimiento de pruebas).
Control externo positivo		Positivo	Resultado válido en el control positivo externo.
		Negativo	Si un control positivo externo arroja un resultado negativo, significa que ha habido algún problema con la preparación o el manejo de la muestra. La serie analítica no es válida. Revise la técnica de preparación y manejo de la muestra. Se debe repetir la prueba (consulte las instrucciones en el apartado Repetir procedimiento de pruebas).
		No resuelto	Resultado incorrecto en el control positivo externo. La serie analítica no es válida. Se debe repetir la prueba (consulte las instrucciones en el apartado Repetir procedimiento de pruebas).
		Indeterminado	Resultado incorrecto en el control positivo externo. La serie analítica no es válida. Se debe repetir la prueba (consulte las instrucciones en el apartado Repetir procedimiento de pruebas).
Control externo negativo		Positivo	Si un control negativo externo arroja un resultado positivo, significa que ha habido contaminación en el manejo de la muestra. La serie analítica no es válida. Revise la técnica de manejo de la muestra. Se debe repetir la prueba (consulte las instrucciones en el apartado Repetir procedimiento de pruebas).
		Negativo	Resultado válido en el control negativo externo.
		No resuelto	Resultado incorrecto en el control externo negativo. La serie analítica no es válida. Se debe repetir la prueba (consulte las instrucciones en el apartado Repetir procedimiento de pruebas).
		Indeterminado	Resultado incorrecto en el control externo negativo. La serie analítica no es válida. Se debe repetir la prueba (consulte las instrucciones en el apartado Repetir procedimiento de pruebas).

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El ensayo *C. difficile* solo debe utilizarse en Revogene y solo debe realizarlo personal con la formación adecuada.
2. El ensayo *C. difficile* no está destinado a distinguir entre portadores de *C. difficile* y quienes sufren una infección por *C. difficile*.
3. El ensayo *C. difficile* no proporciona resultados de susceptibilidad. Para realizar pruebas de susceptibilidad se requieren aislamientos en medio de cultivo.
4. Las características de rendimiento del *C. difficile* se establecieron con muestras de deposiciones informes (líquidas o blandas) recogidas de pacientes con sospecha de tener una infección por *C. difficile*. No se ha evaluado el uso del ensayo *C. difficile* para tipos de muestras clínicas que no sean las especificadas y no se han establecido las características de rendimiento correspondientes.
5. Los resultados del ensayo *C. difficile* se deben utilizar como complemento a las observaciones clínicas y a otra información disponible para el médico.
6. Los resultados del ensayo pueden verse afectados por un tratamiento antimicrobiano simultáneo, puesto que eso posible que sea siga detectando ADN de *C. difficile*.
7. Un resultado positivo no indica de forma necesaria la presencia de organismos viables. Sin embargo, si indica la presencia de ADN de *C. difficile* toxigénico.
8. Pueden obtenerse resultados de prueba erróneos a causa de procedimientos incorrectos para recoger, manipular o almacenar las muestras, algún error técnico o mezcla de muestras. Para evitar errores en los resultados, es necesario seguir cuidadosamente las instrucciones de este folleto y las directrices establecidas en el Manual del usuario de Revogene<sup>13</sup>.
9. Un resultado negativo no descarta la posibilidad de una colonización por *C. difficile*. Puede haber falsos negativos si la concentración de *C. difficile* está por debajo del límite de detección del ensayo. Si el paciente muestra síntomas de infección, se deberán utilizar otros ensayos del laboratorio y otra información clínica para confirmar el resultado negativo.
10. Si un PIE no está cerrado correctamente, puede haber contaminación o falsos negativos.
11. Aunque no haya cepas o colonias aisladas conocidas de *C. difficile* toxigénico que carezcan del gen *tcfB*, la aparición de una cepa de estas características puede dar lugar a un resultado erróneo si se utiliza el ensayo *C. difficile*.
12. La presencia de mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión de las sondas o de los cebadores puede afectar a la detección de variantes de gen *tcfB* de *C. difficile*, lo que da como resultado falsos negativos con el ensayo *C. difficile*.
13. El carbonato de calcio (por ejemplo, Tums®) o el hidróxido de aluminio/hidróxido de magnesio (por ejemplo, Stomax®) puede inhibir potencialmente la detección de *C. difficile* toxigénico cuando cualquiera de estas sustancias se encuentra presente en el tampón de muestra a una concentración de > 0,5 mg/mL o > 0,5 µL/mL respectivamente.
14. La presencia de *Clostridium sordelli* a una carga de > 10<sup>6</sup> UFC/mL en tampon de muestra puede provocar la detección de resultados positivos falsos.
15. Un efecto combinatorio de *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* subesp. *cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Helicobacter pylori* a ≥10<sup>6</sup> CFU/mL en tampon de muestra puede tener un efecto inhibitorio en la detección de *C. difficile* toxigénico.
16. Un efecto combinatorio de *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Vibrio parahaemolyticus* a ≥10<sup>6</sup> CFU/mL en tampon de muestra puede tener un efecto inhibitorio en la detección de *C. difficile* toxigénico.

#### VALORES ESPERADOS

La prevalencia de infección por *C. difficile* (ICD) depende de varios factores, incluida la predisposición a la infección debido a terapia anterior con antibióticos de amplio espectro, la presencia de síntomas y el estándar de la prueba de cuidado. En un estudio prospectivo y retrospectivo combinados, se recogieron muestras en 8 centros clínicos geográficamente diversos de 2581 sujetos, en el rango de edad entre 0 y 2 años a más de 60 años. De las 2461 muestras que cumplieron todos los criterios de inclusión sin cumplir ninguno de los criterios de exclusión, 333 fueron positivas en función de los resultados combinados de cultivo toxigénico directo y enriquecido para una prevalencia observada de 13,5 % [333/2461; 95 %CI: 12,2 a 15 %]. El porcentaje de resultados positivos que se observaron con el ensayo *C. difficile* de Revogene en la población del estudio fue 11,5 % [283/2461; 95 %CI: 10,3 a 12,8 %].

#### CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO CLÍNICO

El rendimiento clínico del ensayo *C. difficile* de Revogene se estableció en una investigación prospectiva y retrospectivos en múltiples centros aprobada por el Comité de Ética Independiente (CEI) que compara los resultados con cultivo toxigénico utilizando muestras de deposiciones informes (líquidas o blandas) sin identificación de sujetos con sospecha de tener ICD. Dos mil quinientas ochenta y una (2581) muestras se recogieron de manera prospectiva en siete centros geográficamente diversos a través de Estados Unidos y Canadá entre el 4 de febrero de 2017 y el 15 de julio de 2017 de sujetos sintomáticos que cumplían los requisitos. Solo se utilizaron las muestras que cumplían con los criterios de inclusión en el estudio y no cumplían ninguno de los criterios de exclusión. Se utilizaron dos mil cuatrocientas sesenta y tres (2463) muestras para establecer el rendimiento del ensayo *C. difficile* de Revogene mediante comparación con el método combinado de cultivo directo y enriquecido. Todas las 2463 muestras recién recogidas se analizaron en cultivo, 798 se sometieron al ensayo Revogene *C. difficile* como muestras nuevas y se congeló un subconjunto de 1665 muestras para analizar posteriormente con el ensayo *C. difficile* de Revogene.

El cultivo toxigénico se llevó a cabo en un laboratorio central de referencia y el ensayo *C. difficile* de Revogene se realizó en los siete centros competentes designados. El método de cultivo toxigénico incluyó el cultivo directo y enriquecido seguido del ensayo de citotoxicidad. El método de cultivo directo consistió en la transferencia de una turunda de la muestra de deposiciones de un medio de transporte anaeróbico a medios anaeróbicos selectivos previamente reducidos, una placa estándar de agar-cicloserina-cefoxitina-fructosa (CCFA), seguida del ensayo de citotoxicidad en colonias de *C. difficile* aisladas de las deposiciones. En resumen, las colonias aisladas en cultivos directos que se asemejaban morfológicamente al *C. difficile* (es decir, como vidrio esmerilado amarillo en apariencia con hedor semejante a un corral) se confirmaron por su identidad mediante ensayo de aerotolerancia en placas de agar chocolate y una placa de agar (BAP) bajo condiciones anaeróbicas.

Una vez identificadas las colonias, se sembró una segunda placa de BAP que contenía un disco de vancomicina y se utilizó un asa de siembra para inocular un caldo con carne molida anaeróbico. El caldo inoculado se incubó anaeróbicamente de 35 C a 37 C por 48 h para ensayo de citotoxicidad utilizando un ensayo de neutralización de la citotoxicidad en células (CCNA, ensayo de citotoxicidad para toxina de *Clostridium difficile*, híbridos de diagnóstico). Para el método de cultivo enriquecido, la misma turunda que se utilizó para inocular la placa de CCFA se utilizó para inocular el caldo de manitol-cicloserina-cefoxitina con tubo de taurochocolate y lisozima (CCMB-TAL). El caldo de enriquecimiento se subcultivó en otra placa de CCFA y se siguió el mismo procedimiento que se utilizó para el método directo. Una muestra se consideraba positiva para el *C. difficile* si el *C. difficile* se había recuperado de deposiciones, ya sea por cultivo directo o enriquecido y si las colonias bacterianas aisladas arrojaban resultado positivo mediante CCNA. Si el *C. difficile* se aislaba del cultivo directo y la colonia aislada arrojaba resultado positivo mediante el ensayo de citotoxicidad, el cultivo de enriquecimiento no se continuaba analizando. Las muestras se clasificaban como negativas para *C. difficile* toxigénico si arrojaban resultado negativo mediante cultivo directo y combinado, es decir, cultivo directo y enriquecido.

Se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (PPV) y valor predictivo negativo (NPV) por comparación de los resultados del ensayo *C. difficile* de Revogene con los resultados combinados del método de cultivo enriquecido y directo (método de referencia). Se realizó un análisis de discrepancias en una porción de las muestras con resultados discordantes entre el ensayo *C. difficile* de Revogene y el método de cultivo combinado, utilizando el ensayo de PCR de rutina de cuatro centros. Finalmente, la coincidencia porcentual positiva (PPA) y la coincidencia porcentual negativa (NPA) se determinaron comparando el ensayo *C. difficile* de Revogene con los resultados del cultivo directo.

#### RESULTADOS

La demografía de la población del estudio se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Demografía de la población del estudio de todas las muestras con cumplimiento en todos los niveles

Sujetos	Todos los sujetos N=2461	Frescos N=797	Congelados N=1664
Origen de la muestra			
Paciente interno	1804 (73,3 %)	617 (77,4 %)	1187 (71,3 %)
Paciente externo	420 (17,1 %)	123 (15,4 %)	297 (17,8 %)
Sala de emergencias	234 (9,5 %)	57 (7,2 %)	177 (10,6 %)
Perdidas	3 (0,1 %)	0 (0,0 %)	3 (0,2 %)
Categoría de edad			
< 2	9 (0,4 %)	4 (0,5 %)	5 (0,3 %)
3 a 18	105 (4,3 %)	30 (3,8 %)	75 (4,5 %)
19 a 60	1199 (48,7 %)	399 (50,1 %)	800 (48,1 %)
> 60	1148 (46,6 %)	364 (45,7 %)	784 (47,1 %)

De las 798 muestras nuevas y las 1665 congeladas que cumplían los requisitos y se encontraban en el nivel de muestras y PCR, 9 y 13 se informaron respectivamente no resueltas en el ensayo inicial (1,1 % para las muestras nuevas y 0,8 % para las muestras congeladas) y solo una muestra nueva permaneció no resuelta luego de la repetición del ensayo. La tasa de no resolución luego de la repetición del ensayo fue de 0,1 % (1/798) para las muestras nuevas y 0,0 % (0/1665) para las muestras congeladas.

De las 798 muestras nuevas y las 1665 congeladas que cumplían los requisitos y se encontraban en el nivel de muestras y PCR, 12 y 28 se informaron respectivamente indeterminadas en el ensayo inicial (1,5 % para las muestras nuevas y 1,7 % para las muestras congeladas) y solo una muestra nueva permaneció indeterminada luego de la repetición del ensayo. La tasa de no determinación luego de la repetición del ensayo fue de 0,0 % (0/798) para las muestras nuevas y 0,1 % (0/1665) para las muestras congeladas.

La tasa no informable inicial general fue de 2,6 % (21/798) y 0,1 % (1/798) luego de la repetición del ensayo para las muestras nuevas. La tasa no informable inicial general fue de 2,5 % (41/1665) y 0,1 % (1/1665) luego de la repetición del ensayo para las muestras congeladas.

## COMPARACIÓN CON CULTIVO COMBINADO DIRECTO Y ENRIQUECIDO

El rendimiento clínico del ensayo *C. difficile* de Revogene comparado con los resultados combinados del cultivo toxigénico directo y enriquecido se muestran en la **Tabla 2** para muestras nuevas y en la **Tabla 3** para muestras congeladas.

De las 2463 muestras que cumplían los requisitos, 2461 tuvieron resultados válidos para el cultivo toxigénico directo, cultivo toxigénico enriquecido y el ensayo *C. difficile* de Revogene. De las 2461 muestras, 333 fueron positivas en función de los resultados combinados de cultivo toxigénico directo y enriquecido para una prevalencia observada de 13,5 % [333/2461; 95 % CI: 12,2 a 15,0 %].

Las características de rendimiento del ensayo *C. difficile* que se obtuvieron con las muestras de deposiciones nuevas demostraron 80,5 % de sensibilidad (91/113, 95 % CI: 72,0 a 87,4) y 97,1 % de especificidad (664/684; 95 % CI: 95,5 a 98,2 %) en comparación con el método de referencia (método de cultivo combinado directo y enriquecido) obtenido con muestras de deposiciones nuevas (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Las características de rendimiento general del ensayo *C. difficile* de Revogene en comparación con el método de referencia (método combinado de cultivo directo y enriquecido) obtenido con muestras de deposiciones nuevas.

Rendimiento general Deposiciones frescas	Método de referencia		
	Positivo	Negativo	Total
Revogene <i>C. difficile</i>	Positivo	91	20 <sup>A</sup>
	Negativo	22 <sup>B</sup>	664
	Total	113	684
Sensibilidad: 80,5 % (91/113; 95 % CI: 72,0 – 87,4 %) Especificidad: 97,1 % (664/684; 95 % CI: 95,5 – 98,2 %) PPV: 82,0 % (91/113; 95 % CI: 73,6 – 88,6 %) NPV: 96,8 % (664/684; 95 % CI: 95,2 – 98,0 %)			

<sup>A</sup>De las 20 muestras con resultados positivos falsos del ensayo *C. difficile* de Revogene relativos al cultivo combinado directo y enriquecido, 8 fueron positivas y 4 fueron negativas mediante un segundo método de NAAT (ensayo de PCR de rutina de centros).

<sup>B</sup> De las 22 muestras con resultados negativos falsos del ensayo *C. difficile* de Revogene relativos al cultivo combinado directo y enriquecido, 13 fueron negativas y 4 fueron positivas mediante un segundo método de NAAT (ensayo de PCR de rutina de centros).

Las características de rendimiento del ensayo *C. difficile* que se obtuvieron con las muestras de deposiciones congeladas demostraron 87,3 % de sensibilidad (192/220, 95 % CI: 82,1 a 91,4) y 97,3 % de especificidad (1405/1444; 95 % CI: 96,3 a 98,1 %) en comparación con el método de referencia (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Las características de rendimiento general del ensayo *C. difficile* de Revogene en comparación con el método de referencia (método combinado de cultivo directo y enriquecido) obtenido con muestras de deposiciones congeladas.

Rendimiento general Deposiciones congeladas	Método de referencia		
	Positivo	Negativo	Total
Revogene <i>C. difficile</i>	Positivo	192	39 <sup>A</sup>
	Negativo	28 <sup>B</sup>	1405
	Total	220	1444
Sensibilidad: 87,3 % (192/220; 95 % CI: 82,1 – 91,4 %) Especificidad: 97,3 % (1405/1444; 95 % CI: 96,3 – 98,1 %) PPV: 83,1 % (192/231; 95 % CI: 77,7 – 87,7 %) NPV: 98,0 % (1405/1433; 95 % CI: 97,2 – 98,7 %)			

<sup>A</sup>De las 39 muestras con resultados positivos falsos del ensayo *C. difficile* de Revogene relativos al cultivo combinado directo y enriquecido, 17 fueron positivas y 15 fueron negativas mediante un segundo método de NAAT (ensayo de PCR de rutina de centros).

<sup>B</sup> De las 28 muestras con resultados negativos falsos del ensayo *C. difficile* de Revogene relativos al cultivo combinado directo y enriquecido, 14 fueron negativas y 12 fueron positivas mediante un segundo método de NAAT (ensayo de PCR de rutina de centros).

## COMPARACIÓN CON CULTIVO DIRECTO

La coincidencia clínica del ensayo *C. difficile* de Revogene comparado con los resultados del cultivo toxigénico directo se muestran en la **Tabla 4** para muestras nuevas y en la **Tabla 5** para muestras congeladas.

**Tabla 4.** Las características de rendimiento general del ensayo *C. difficile* de Revogene en comparación con el método de cultivo directo obtenido con muestras de deposiciones nuevas.

Rendimiento general Deposiciones frescas	Método de cultivo directo		
	Positivo	Negativo	Total
Revogene <i>C. difficile</i>	Positivo	63	48
	Negativo	3	683
	Total	66	731
PPA: 95,5 % (63/66; 95 % CI: 87,3 – 99,1 %) NPA: 93,4 % (683/731; 95 % CI: 91,4 – 95,1 %)			

**Tabla 5.** Las características de rendimiento general del ensayo *C. difficile* de Revogene en comparación con el método de cultivo directo obtenido con muestras de deposiciones congeladas.

Rendimiento general Deposiciones congeladas	Método de cultivo directo		
	Positivo	Negativo	Total
Revogene <i>C. difficile</i>	Positivo	160	71
	Negativo	8	1425
	Total	168	1496
PPA: 95,2 % (160/168; 95 % CI: 90,8 – 97,9 %) NPA: 95,3 % (1425/1496; 95 % CI: 94,1 – 96,3 %)			

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ANALÍTICO

### SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica (Límite de Detección, LdD) del ensayo *C. difficile* se determinó con una matriz de deposiciones clínicas líquidas negativa previamente analizada para *C. difficile* toxigénico y adicionada con diferentes concentraciones de suspensiones bacterianas de *C. difficile*. Dos cepas de *C. difficile* toxigénico (ATCC® 43255™, ribotipo 087, toxinotipo 0 y ATCC® BAA-1805™, NAP1, ribotipo 027, toxinotipo IIIb) se analizaron en 24 réplicas por concentración. El LdD se define como la concentración más baja a la que el 95 % o más de todas las réplicas dieron un resultado positivo en la prueba. En cuanto a las dos cepas analizadas, el LdD del ensayo *C. difficile* fue de 1500 UFC/mL de tampón de muestra (SB). Los resultados se resumen en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** LdD del ensayo *C. difficile*

Número de ATCC® de cepa de <i>C. difficile</i> toxigénico	LdD (UFC/mL de SB)
ATCC® 43255™	1 500
ATCC® BAA-1805™	1 500

**INCLUSIÓN**

Se determinó la inclusión del ensayo *C. difficile* para 20 cepas de *C. difficile* toxigénico que representan 8 toxinotipos diferentes de diversos orígenes geográficos. Cada cepa se analizó de un cultivo de célula cuantificado adicionado en una matriz de deposiciones líquidas negativa de *C. difficile* toxigénico a una carga de 3750 UFC/mL de SB que corresponde de dos a tres veces el valor LdD de cepa ATCC® 43255™. Se analizaron tres réplicas por cepa con 3 lotes de kit *C. difficile* distintos. Todas las cepas de *C. difficile* toxigénico analizadas se detectaron a 3750 UFC/mL SB. Las cepas analizadas se describen en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Cepas de *C. difficile* toxigénico analizadas para inclusión con el ensayo *C. difficile*

Cepas de <i>C. difficile</i> toxigénico	Toxinotipo
ATCC® 9689™	(Toxinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 700792™	(Toxinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 17858™	(Toxinotipo 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1382™	(Toxinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 51695™	(Toxinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 43600™	(Toxinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 43599™	(Toxinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 43596™	(Toxinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 43594™	(Toxinotipo 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1804™	(Toxinotipo 0, A+, B+)
ATCC® 17857™	(Toxinotipo 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1873™	(Toxinotipo 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1870™	(Toxinotipo IIIb, NAP1, A+, B+)
ATCC® BAA-1803™	(Toxinotipo IIIc, NAP1, A+, B+)
ATCC® BAA-1875™	(Toxinotipo V, A+, B+)
ATCC® 43598™	(Toxinotipo VIII, A-, B+)
CCUG 8864	(Toxinotipo X, A-, B+)
ATCC® BAA-1812™	(Toxinotipo XII, A+, B+)
ATCC® BAA-1814™	(Toxinotipo XXII, A+, B+)
ATCC® BAA-2155™	(Toxinotipo XXII, A+, B+)

Además, se realizó un análisis *in silico* el 20 de julio de 2017 para evaluar la inclusión de los cebadores y la sonda de la diana del ensayo *C. difficile* con respecto a las cepas del *C. difficile* toxigénico incluidas en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Los resultados de alineación no mostraron coincidencia con las 52 secuencias seleccionadas. El análisis predijo la detección de todas estas cepas de *C. difficile* toxigénico.

**REACTIVIDAD CRUZADA**

La reactividad cruzada del ensayo *C. difficile* se evaluó con cargas elevadas de organismos que no son la diana del ensayo o tienen relación filogenética con *C. difficile*, con cepas de *C. difficile* no toxigénicas o presentes en la flora intestinal normal. El estudio incluyó 50 bacterias, 1 levadura, 7 virus y ADN humano (**Tabla 8**). Las bacterias y la levadura se analizaron a una carga  $\geq 10^5$  UFC/mL de SB. Se analizaron ácidos nucleicos de 6 virus y ADN humano a una carga de  $\geq 10^6$  copias de ADN o ARN/mL de SB. Estos organismos se analizaron mediante cultivos de células cuantificados o soluciones de ácido nucleico adicionadas en una matriz de deposiciones líquidas negativa de *C. difficile*. Cada organismo se analizó en triplicados PCR.

Bajo las condiciones del estudio, el ensayo *C. difficile* detectó *Clostridium sordellii* a una carga aproximada de  $10^6$  UFC/mL de SB para una réplica de 3, pero se halló que no es reactivo a una carga de aproximadamente  $10^5$  UFC/mL de SB. Las cepas de *Clostridium novyi* y *Clostridium scindens* produjeron reacciones positivas falsas en una réplica de seis analizadas a aproximadamente  $10^6$  UFC/mL de SB. No se observó reactividad para tres réplicas analizadas a  $10^5$  CFU/mL de SB. La cepa de *Enterococcus faecalis* produjo reacciones positivas falsas en una réplica de tres analizadas a aproximadamente  $10^7$  UFC/mL de SB. No se observó reactividad para tres réplicas analizadas a  $10^6$  UFC/mL de SB. Los demás organismos y ácidos nucleicos no reaccionaron al ensayo *C. difficile*.

Solo para *Coxsackievirus*, la reactividad cruzada con cebadores y sondas del ensayo *C. difficile* se evaluó mediante un análisis *in silico* realizado en todas las secuencias de cepas de *Coxsackievirus* incluidas la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) entre el 7 de febrero de 2017 y el 11 de agosto de 2017. El análisis sugirió que las cepas de *Coxsackievirus* no deberían reaccionar al ensayo *C. difficile*.

**Tabla 8.** Lista de organismos analizados para pruebas de reactividad cruzada con el ensayo *C. difficile*

Bacterias	
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> ( <i>Campylobacter coli</i> )	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>
<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Clostridium novyi</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Flavonifractor plautii</i> ( <i>Clostridium orbiscindens</i> )	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Clostridium scindens</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Clostridium difficile</i> (no toxigénico) – ATCC® 43593™	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Clostridium difficile</i> (no toxigénico) – ATCC® 43601™	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonaee</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Shigella boydii</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella sonnei</i>
Levadura	
<i>Candida albicans</i>	
Virus	
Adenovirus 1 humano (ADN)	Rotavirus (ARN)
Enterovirus D68 (ARN)	Norovirus (ARN)
Echovirus 4 (ARN)	Herpesvirus 5 humano (Cytomegalovirus) (ADN)
Coxsackievirus ( <i>in silico</i> )	ADNg humano

## ORGANISMOS DE INTERFERENCIA

Se evaluó el efecto potencialmente inhibidor de 30 organismos, que pueden estar presentes en la flora intestinal normal y no son la diana del ensayo, se evaluaron utilizando organismos seleccionados del estudio de reactividad cruzada (**Tabla 8**). Cada categoría de los organismos (es decir, bacterias, levaduras, virus) se representó con una atención especial para incluir los agentes causantes más frecuentes de infecciones al tracto intestinal. Se prepararon grupos de 2 a 6 organismos en una matriz de deposiciones líquidas negativa de *C. difficile* toxigénico y analizados en duplicado en presencia de 3750 CFU/mL de SB de la cepa ATCC® 43255™ de *C. difficile* toxigénico o 4500 UFC/mL de SB de la cepa ATCC® BAA-1805™ del *C. difficile* toxigénico para evaluar su interferencia potencial en la detección de *C. difficile* toxigénico o CdP. Cada organismo dentro del grupo se diluyó para alcanzar una carga de  $\geq 10^6$  CFU/mL de SB para bacteria y levadura y  $\geq 10^5$  copias/mL de SB para virus. Los 30 organismos incluidos en el estudio se muestran en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.** Lista de organismos analizados para interferencia con el ensayo *C. difficile*

Grupo 1		
<i>Aeromonas hydrophila</i>		<i>Bacillus cereus</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>		<i>Campylobacter jejuni</i> subesp. <i>jejuni</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> ( <i>Campylobacter coli</i> )		
Grupo 2		
<i>Candida albicans</i>		<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Clostridium difficile</i> (no toxigénico) – ATCC® 43593™		<i>Clostridium difficile</i> (no toxigénico) – ATCC® 43601™
<i>Clostridium perfringens</i>		<i>Clostridium sordellii</i>
Grupo 3		
<i>Enterobacter aerogenes</i>		<i>Enterobacter cloacae</i> subesp. <i>cloacae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Escherichia coli</i> O157:H7
<i>Helicobacter pylori</i>		
Grupo 4		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>		<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
Grupo 5		
<i>Shigella boydii</i>		<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Shigella sonnei</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> subesp. <i>aureus</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Grupo 6		
Rotavirus (ARN)		Norovirus (ARN)

Ninguno de los 30 organismos presentes a  $\geq 10^6$  UFC/mL de SB para bacterias y levadura y  $\geq 10^5$  copias/mL de SB para virus interfirió con la detección de CdP y con la cepa ATCC® BAA-1805™ de *C. difficile* toxigénico.

El grupo 3 y grupo 5 mostraron un efecto potencialmente inhibidor en la detección de la cepa ATCC® 43255™ de *C. difficile* toxigénico. Sin embargo, cuando cada bacteria de estos grupos se analizó individualmente a una carga de  $\geq 10^6$  UFC/mL de SB en presencia de la cepa ATCC® 43255™ de *C. difficile*, ninguno interfirió.

## SUSTANCIAS DE INTERFERENCIA

Se evaluó el efecto potencialmente inhibidor de 16 sustancias exógenas y 5 endógenas que pueden estar presentes en el tracto intestinal utilizando muestras negativas de *C. difficile* toxigénico y cepas ATCC® 43255™ y ATCC® BAA-1805™ de *C. difficile* toxigénico de dos a tres a veces el LdD (3750 CFU/mL de SB y 4500 UFC/mL de SB respectivamente) en presencia de la matriz de deposiciones líquidas. Las sustancias se analizaron a su concentración potencialmente más alta que puede encontrarse en una muestra de deposiciones. Los resultados para las 21 sustancias se muestran en la **Tabla 10**.

Los resultados no informaron interferencia informable en el CdP. El carbonato de calcio (por ejemplo, Tums®) y el hidróxido de aluminio/hidróxido de magnesio (por ejemplo, Stomax®) mostró un efecto potencialmente inhibidor en la detección de *C. difficile* toxigénico cuando cualquiera de estas sustancias se encontraba presente en el SBT una concentración de 5 mg/mL o 0,5 % P/V y 5 µL/mL (0,5 % V/V) respectivamente. Al analizarlas a 0,5 mg/mL (0,05 % P/V) o 0,5 µL/mL (0,05 % V/V) respectivamente, estas sustancias no mostraron interferencia informable con el ensayo *C. difficile*.

**Tabla 10.** Lista de sustancias exógenas y endógenas analizadas con el ensayo *C. difficile*.

Sustancias exógenas		
Sustancia (nombre comercial)	Concentración o cantidad en SBT1	Resultados2
Antimicótica o antipirúrginosa vaginal (Nystatin)	0,5 % P/V	NI
Cremas/ungüentos (crema con hidrocortisona Personnelle)	0,5 % V/V	NI
Cremas/ungüentos antihemorrroidales (Preparation H®)	0,5 % V/V	NI
Antácidios (Tums®)	0,5 % P/V	I <sup>3</sup>
Antácidios (Stomax®)	0,5 % V/V	I <sup>4</sup>
Enemas (aceite mineral pesado USP Life BRAND™)	0,5 % V/V	NI
Enemas (mesalamina o ácido 5 aminosalicílico)	0,5 % P/V	NI
Condón con lubricante espermicina (Trojan® con condón con lubricante espermicina)	Cuadrado de 2 mm <sup>2</sup>	NI
Medicamento antidiarreico (Pepto Bismol™)	0,5 % V/V	NI
Medicamento antidiarreico (Imodium®)	0,5 % V/V	NI
Laxantes (Senokot®)	0,5 % V/V	NI
Antibióticos orales y tópicos (Vancomycin)	0,5 % V/V	NI
Antibióticos orales y tópicos (Metronidazole)	0,5 % P/V	NI
0,5 % P/V		NI
Toallitas húmedas (pañuelos húmedos descartables Equate™)	Cuadrado de 2 mm <sup>2</sup>	NI
Toallitas húmedas (Wet Ones®)	Cuadrado de 2 mm <sup>2</sup>	NI
Sustancias endógenas		
Sustancia	Concentración o cantidad en SBT1	Resultados2
Grasa fecal, mezcla de triglicéridos (C2 a C10)	0,5 % V/V	NI
Grasa fecal, ácido palmitico	1,0 % P/V	NI
Grasa fecal, ácido esteárico	0,5 % P/V	NI
Sangre entera	0,5 % V/V	NI
Mucosidad	0,5 % V/V	NI

<sup>1</sup>P/V: Peso/Volumen; <sup>2</sup>V/V: Volumen/Volumen

<sup>3</sup>I: interferencia con el ensayo *C. difficile*; <sup>4</sup>NI: no hay interferencia con el ensayo *C. difficile*

<sup>3</sup> No hay interferencia a 0,05 % P/V

<sup>3</sup> No hay interferencia a 0,05 % V/V

## CONTAMINACIÓN REMANENTE Y CRUZADA

Se evaluó la contaminación remanente y cruzada dentro de una misma serie y entre distintas series utilizando muestras positivas preparadas en una matriz de deposiciones líquidas negativa de *C. difficile* toxigénico para alcanzar una concentración final de  $> 10^7$  UFC/mL de SB de la cepa ATCC® 43255™ de *C. difficile* toxigénico. También se analizaron las muestras negativas verdaderas, preparadas solo con matriz de deposiciones líquidas negativa de *C. difficile* toxigénico.

Para el estudio dentro de la misma serie, dos operadores llevaron a cabo 10 series con el ensayo *C. difficile* en un Revogene. Se analizaron cuatro (4) muestras positivas altas y 4 muestras negativas alternando muestras positivas y negativas en cada serie. Para el estudio entre distintas series, dos operadores llevaron a cabo una serie de 8 réplicas de muestras positivas seguida de una serie de 8 réplicas de muestras negativas, para un total de 10 series en un Revogene.

Se demostró la ausencia de contaminación remanente y cruzada.

## REPRODUCIBILIDAD Y PRECISIÓN

### REPRODUCIBILIDAD

Se ha realizado un estudio de reproducibilidad entre centros en tres centros, con dos operadores por centro, en cinco días distintos con un lote de kit de ensayo *C. difficile*.

El estudio de reproducibilidad entre lotes se ha realizado en un centro, con dos operadores, en 15 días con tres lotes de kit de ensayo *C. difficile* (5 días por lote de kit). Para cada estudio de reproducibilidad, se ha analizado un total de 120 réplicas de muestras negativas y 90 réplicas de cada categoría de muestras positivas, todas preparadas en una matriz de deposiciones líquidas negativa de *C. difficile* toxigénico. Se utilizaron dos cepas de *C. difficile* toxigénico para muestras positivas: ATCC® 43255™ (toxinotipo 0, ribotipo 087) y ATCC® BAA-1805™ (toxinotipo IIb, NAP1, ribotipo 027)

Las categorías de las muestras se describieron de la siguiente manera:

1. Positivo bajo (LP): las cepas ATCC® 43255™ y ATCC® BAA-1805™ adicionaron a 2438 UFC/mL y 2925 UFC/mL de SB respectivamente
2. Positivo moderado (MP): las cepas ATCC® 43255™ y ATCC® BAA-1805™ adicionaron a 3750 UFC/mL y 4500 UFC/mL de SB respectivamente
3. Negativo verdadero (TN): muestras sin cepa de *C. difficile* toxigénico

Los resultados cada categoría de muestras analizadas durante los estudios de reproducibilidad entre centros y entre lotes se muestran en las **Tablas 11** y **12** respectivamente. Para la reproducibilidad entre centros, la coincidencia porcentual general fue 100 % para TN, LP y MP de la cepa ATCC® BAA-1805™ de *C. difficile* toxigénico. La coincidencia porcentual general para LP y MP de la cepa ATCC® 43225 de *C. difficile* toxigénico fue de 94,4 % y 96,7 % respectivamente (**Tabla 11**). Para la reproducibilidad entre centros, la coincidencia porcentual general fue 100 % para TN y MP de las categorías de la cepa ATCC® BAA-1805™ de *C. difficile* toxigénico y 98,9 % para LP. La coincidencia porcentual general para LP y MP de la cepa ATCC® 43225 de *C. difficile* toxigénico fue 91,1 % y 96,7 % respectivamente (**Tabla 12**).

Los valores de umbral de ciclo (Ct) medio generales con componentes de variación (SD y CV%) se muestran en las **Tablas 11** y **12**.

Tabla 11. Resultados del estudio de reproducibilidad entre centros con un lote de kit de ensayo *C. difficile*

Categoría	Cepa de <i>C. difficile</i> toxigénico (número de ATCC®)	Centro 1		Centro 2		Centro 3		Resultados generales/ Total:	Coincidencia porcentual general <sup>1</sup>	Valores de Ct <sup>2</sup>		
		Resultados/ Total	Coincidencia porcentual	Resultados/ Total	Coincidencia porcentual	Resultados/ Total	Coincidencia porcentual			Medio general	SD	% CV
LP	ATCC® 43255™	27/30	90,0 %	28/30	93,3 %	30/30	100 %	85/90	94,4 %	87,5 % a 98,2 %	38,48	1,56 4,05
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	90/90	100 %	96,7 % a 100 %	36,37	2,74 7,54
MP	ATCC® 43255™	29/30	96,7 %	29/30	96,7 %	29/30	96,7 %	87/90	96,7 %	90,6 % a 99,3 %	37,68	1,63 4,32
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	90/90	100 %	96,7 % a 100 %	36,57	1,65 4,52
TN	N/D	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	97,5 % a 100 %	33,09	1,02 3,09

<sup>1</sup> Para la categoría TN, el porcentaje de coincidencia se ha calculado para los resultados negativos.<sup>2</sup> Para las categorías LP y MP, los valores de Ct informados corresponden al *C. difficile* toxigénico diana. Para la categoría TN, los valores de Ct informados corresponden al CdP.Tabla 12. Resultados del estudio de reproducibilidad entre lotes en un centro con tres lotes de kit de ensayo *C. difficile*

Categoría	Cepa de <i>C. difficile</i> toxigénico (número de ATCC®)	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Resultados generales/ Total:	Coincidencia porcentual general <sup>1</sup>	Valores de Ct <sup>2</sup>		
		Resultados/ Total	Coincidencia porcentual	Resultados/ Total	Coincidencia porcentual	Resultados/ Total	Coincidencia porcentual			Medio general	SD	% CV
LP	ATCC® 43255™	27/30	90,0 %	27/30	90,0 %	28/30	93,3 %	82/90	91,1 %	83,2 % a 96,1 %	38,57	1,72 4,46
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100 %	29/30	96,7 %	30/30	100 %	89/90	98,9 %	94,0 % a 100 %	37,02	1,98 5,35
MP	ATCC® 43255™	29/30	96,7 %	30/30	100 %	28/30	93,3 %	87/90	96,7 %	90,6 % a 99,3 %	37,55	2,16 5,75
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	90/90	100 %	96,7 % a 100 %	36,86	1,31 3,56
TN	N/D	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	97,5 % a 100 %	33,21	0,90 2,71

<sup>1</sup> Para la categoría TN, el porcentaje de coincidencia se ha calculado para los resultados negativos.<sup>2</sup> Para las categorías LP y MP, los valores de Ct informados corresponden al *C. difficile* toxigénico diana. Para la categoría TN, los valores de Ct informados corresponden al CdP.**PRECISIÓN**Se ha realizado un estudio de precisión en un centro, con dos operadores, en 12 días con un lote de kit de ensayo *C. difficile*.Para cada categoría, todas las muestras se prepararon en una matriz de deposiciones líquidas negativa de *C. difficile* toxigénico. Se utilizaron dos cepas de *C. difficile* toxigénico para muestras positivas: ATCC® 43255™ (toxinotipo 0, ribotipo 087) y ATCC® BAA-1805™ (toxinotipo IIb, NAP1, ribotipo 027)

Las categorías de las muestras se describieron de la siguiente manera:

- Positivo bajo (LP): las cepas ATCC® 43255™ y ATCC® BAA-1805™ adicionaron a 2438 UFC/mL y 2925 UFC/mL de SB respectivamente
- Positivo moderado (MP): las cepas ATCC® 43255™ y ATCC® BAA-1805™ adicionaron a 3750 UFC/mL y 4500 UFC/mL de SB respectivamente
- Negativo verdadero (TN): muestras sin cepa de *C. difficile* toxigénico

Los resultados del estudio de precisión para TN y LP de la cepa ATCC® BAA-1805™ de *C. difficile* toxigénico demostraron 100 % de coincidencia y 97,2 % para MP. Los resultados del estudio de precisión para LP y MP de las categorías de la cepa ATCC® BAA-1805™ de *C. difficile* toxigénico demostraron coincidencia de 88,9 % y 95,8 % respectivamente (Tabla 13).Tabla 13. Coincidencia porcentual del estudio de precisión en un centro con un lote de kit de ensayo *C. difficile*.

Categoría	Número de ATCC® de la cepa de <i>C. difficile</i> toxigénico	Coincidencia porcentual general <sup>1</sup>	95 % CI general
LP	ATCC® 43255™	88,9 %	79,3 % a 95,1 %
	ATCC® BAA-1805™	100 %	95,9 % a 100 %
MP	ATCC® 43255™	95,8 %	88,3 % a 99,1 %
	ATCC® BAA-1805™	97,2 %	90,3 % a 99,7 %
TN	N/D	100 %	95,9 % a 100 %

<sup>1</sup> Para la categoría TN, el porcentaje de coincidencia se ha calculado para los resultados negativos.**ETIQUETADO ELECTRÓNICO**Puede acceder en línea a la documentación relativa a este producto en [www.meridianbioscience.com/pi](http://www.meridianbioscience.com/pi). Asimismo, se le pueden proporcionar copias en papel previa solicitud a su distribuidor local o mediante los números de teléfono que figuran en la caja del kit.

## C. difficile

Zur Verwendung mit dem Revogene®

REF 410300

IVD Zur in-vitro-diagnose



Rx Only

### VERWENDUNGSZWECK

Das Revogene® C. difficile Assay ist ein mithilfe des Revogene durchgeföhrter qualitativer Test zur In-vitro-Diagnostik unter Verwendung der automatisierten Probenbearbeitung und der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Echtzeit. Er dient zum Nachweis des Toxins B (*tcdB*), dem Gen des toxischen Bakteriums *Clostridium difficile* (*C. difficile*), in vereinheitlichten (flüssigen oder weichen) Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf eine *C. difficile*-Infektion (CDI). Das Revogene C. difficile Assay unterstützt die CDI-Diagnose.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

*C. difficile* ist ein grampositives, rein anaerobes, sporenbildendes Bakterium, das bei 1-3 % der Erwachsenen und bis zu 45 % der Kinder zur normalen Darmflora gehört.<sup>1,2</sup> Bei Patienten, die Antibiotika in hohen Dosen oder über längere Zeit einnehmen, kann die normale Darmflora (Bakterien) zerstört sein, was die Überhandnahme von *C. difficile* begünstigt. *C. difficile* produziert in diesem Fall Toxine, die den Darm beschädigen und leichten bis schweren Durchfall sowie potenziell tödliche Darmerkrankungen wie pseudomembranöse Colitis (Entzündung des Dickdarms), toxisches Megacolon und Sepsis hervorrufen können.<sup>3,4,5,6</sup>

*C. difficile*-Infektionen (CDI) sind die Hauptursache für infektiösen Durchfall in Krankenhäusern und Langzeitpflegeeinrichtungen in Industrieländern.

*C. difficile* wird mit dem Stuhl ausgeschieden. Personen können sich infizieren, wenn sie Gegenstände oder Oberflächen berühren, die mit Fäkalien kontaminiert sind, und sich anschließend an Mund oder Nase fassen. Medizinisches Personal kann die Bakterien an andere Patienten weitergeben oder Oberflächen durch Handkontakt kontaminiieren.

Die Epidemiologie von CDI hat sich im Laufe der letzten zehn Jahre verändert.<sup>7,8</sup> Epidemische, virulente *C. difficile*-Stämme (BI/NAP1/027) rufen schwerwiegende Erkrankungen hervor, die oft eine Kolektomie erforderlich machen und zu einer erhöhten Mortalität führen.<sup>4,5</sup> Diese Stämme können sich in Krankenhäusern wegen antimikrobieller Resistenz und Sporenbildung besser ausbreiten.

Die Leitlinien der US-amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention (CDC) empfehlen eine *C. difficile*-Diagnostik bei Patienten mit klinischen (z. B. ungeformtem Stuhl) und epidemiologischen Risikofaktoren, da die rasche Erkennung von Infektionen mit *C. difficile* für die Behandlung der Erkrankung von höchster Wichtigkeit ist.<sup>9</sup>

Schnelle, sensitive und spezifische diagnostische Tests sind wichtige Hilfsmittel zur Früherkennung der Erkrankung und zur schnellen Implementierung wirkungsvoller Kontrollmaßnahmen im Kampf gegen CDI. Eine empirische Behandlung ohne exakte CDI-Diagnose ist nicht angemessen, da selbst in einer epidemischen Umgebung nur etwa 30 % der Krankenhauspatienten einen CDI<sup>10</sup> aufweisen. Die Effizienz und die Wirksamkeit der CDI-Diagnose sind für Klinikärzte und Mikrobiologen nach wie vor eine Herausforderung.

Das Revogene C. difficile Assay kann in etwa 70 Minuten Ergebnisse für bis zu acht Proben liefern. Das Assay minimiert die Intervention durch den Benutzer vom Einsetzen der mikrofluidischen Einweg-Kartusche (nachfolgend „PIE“ genannt) mit der Probe in das Revogene-Karussell bis hin zur Verfügbarkeit der Ergebnisse.

### VERFAHRENSPRINZIP

Das Revogene automatisiert die Arbeitsschritte zur Probenhomogenisierung, Probenverdünnung, Lyse von Zellen, DNA-Amplifikation und Erkennung der amplifizierten PCR-Produkte. Eine Intervention des Benutzers ist nur erforderlich zur Verbringung der Patientenprobe in das Probenpufferröhrchen (Sample Buffer Tube, SBT), zum Transfer der Probe vom SBT in das PIE und zum Einsetzen/Herausnehmen der PIES in das bzw. aus dem Revogene-Karussell.

Jede PIE-Kartusche ist eine vollständig integrierte geschlossene Vorrichtung, in der eine Probe ausgegeben und über verschiedene mikrofluidische Kammern und Kanäle verarbeitet wird. Diese Kammern ermöglichen Verarbeitungsschritte wie Probenhomogenisierung und -verdünnung, die Lyse der Zellen sowie nachfolgende PCR-Schritte in Echtzeit. Die Flüssigkeit einer einzelnen Probe wird nach und nach durch Zentrifugierung von einer Kammer zur nächsten transferiert, und alle für PCR-Reaktionen spezifischen Reagenzien werden aufgenommen und innerhalb der PCR-Wellen getrocknet (Abbildung 1).

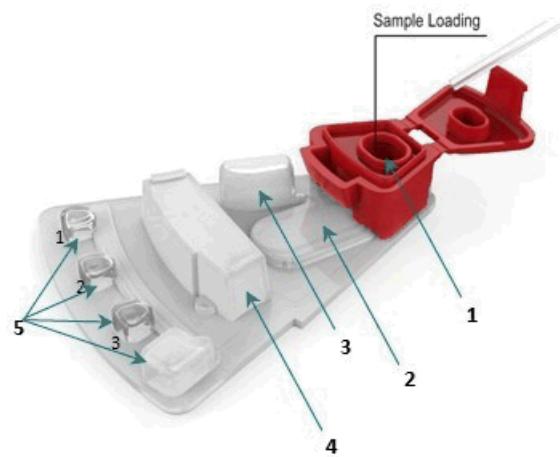


Abbildung 1. Draufsicht auf ein PIE.

1: Probenaufnahmekammer, 2: Überlaufkammer, 3: Homogenisierungskammer mit PrC

4: Verdünnungs-/Lysekammer, 5: Drei (3) PCR-Vertiefungen (A bis C von links nach rechts) und eine (1) Abfallkammer (am rechten Ende).

Jedes PIE beinhaltet eine Verfahrenskontrolle (Process Control, PrC) zur Verifizierung der Probenbearbeitungs- und Amplifizierungsschritte. Die PrC ermöglicht die Verifizierung potenzieller inhibitorischer Stoffe sowie eines eventuellen Mikrofluid-, Instrumenten- oder Reagenzienversagens. Die amplifizierten Produkte werden in Echtzeit mit den zielspezifischen chemischen TaqMan® Sonden nachgewiesen. Nach dem Einsetzen eines PIE in das Revogene ist keine Intervention durch den Benutzer mehr erforderlich.

Das Revogene kann in einem Lauf eine bis acht Proben gleichzeitig verarbeiten. Das Karussell muss acht PIES enthalten, um das thermodynamische Gleichgewicht innerhalb des Laufs aufrechtzuerhalten. Nach Beendigung eines Laufs werden die Ergebnisse vom System anhand von gemessenen Fluoreszenzsignalen und eingebetteten Berechnungsalgorithmen kalkuliert. Die auf dem Touchscreen angezeigten Ergebnisse können vom Benutzer ausgedruckt, transferiert und/oder mit Hilfe des USB-Anschlusses oder der Konnektivitätsoption gespeichert werden.

## REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Das C. difficile-Kit enthält ausreichend Reagenzien und Materialien für die Aufbereitung von 24 Proben. Das Kit enthält die folgenden Materialien:

1. 24 Einweg-Übertragungsösen (LOOP, Disposable Transfer Loops): Ein LOOP besteht aus einer 5-Mikroliter(µL)-Impföse für den Einmalgebrauch zum Übertragen einer ungeformten (flüssigen oder weichen) Stuhlprobe in das SBT
2. 24 Einweg-Übertragungswerkzeuge (DTT, Disposable Transfer Tool): Ein DTT besteht aus einer Einweg-Transferpipette für die Übertragung der Probe aus dem SBT in die PIE.
3. 24 Probenpufferröhrchen (SBT, Sample Buffer Tube): Röhrchen mit Barcode-Etikett, das gepufferte TE 1X-Lösung (Tris-HCl pH 8,0/EDTA.Na2) als Verdünnung und Konservierungspuffer für die Probe enthält.
4. 24 Beutel mit jeweils einer (1) C. difficile-PIE: Integrierte Kartusche mit Barcode-Etikett, mit getrockneten Reagenzien, anhand derer eine Probenverarbeitung und Echtzeit-PCR-Schritte für gleichzeitige Amplifikation und Nachweis von Prc-DNA und der DNA des Toxin B-Gens von C. difficile möglich sind.

## ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN/AUSRÜSTUNG (NICHT MITGELIEFERT)

1. Revogene® (Kat.-Nr. 610210)
2. Einmalhandschuhe, puderfrei
3. Vortex-Mixer mit einer Maximaldrehzahl von mindestens 3 200 U/min
4. Probenteller (Kat.-Nr. 132539; optional)
5. MOCK PIE (Kat.-Nr. 610208; optional)

## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Dieses Produkt kann nur mit dem Revogene verwendet werden.
2. Das Set nicht verwenden, wenn das Etikett, mit dem die Verpackung versiegelt wurde, bei Erhalt beschädigt ist.
3. C. difficile PIEs nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Erhalt offen oder beschädigt sind.
4. Keine DTTs, SBTs und PIEs zwischen Set-Chargen vertauschen.
5. Alle LOOP, DTTs und C. difficile PIEs werden nur zur Bearbeitung einer einzelnen Probe verwendet. LOOP, DTTs und PIEs dürfen nicht wiederverwendet werden.
6. Proben sind stets als infektiös und in Übereinstimmung mit bewährten Laborpraktiken zu handhaben (siehe z. B. „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“<sup>11</sup> und CLSI-Dokument M29-A4<sup>12</sup>).
7. Bei der Handhabung von Proben puderfreie Einmalhandschuhe tragen und anschließend gründlich Hände waschen.
8. Das C. difficile PIE enthält getrocknete Reagenzien. Der Schutzbeutel darf erst geöffnet werden, wenn alles für die Durchführung des Tests bereit ist.
9. Ungenutzte Materialien und Reagenzien sowie Abfälle (einschließlich gebrauchter PIEs) sind in Übereinstimmung mit den nationalen, bundesweiten, regionalen und örtlichen Bestimmungen zu entsorgen.
10. PIEs nach Gebrauch weder öffnen noch auseinanderbrechen, um eine Kontamination mit Amplifikationsprodukten und/oder infektiösen Partikeln zu verhindern.
11. PIEs, die heruntergefallen sind, geschüttelt oder umgedreht wurden, nachdem die Probe geladen worden war, dürfen nicht mehr verwendet werden, da dies zu ungültigen Testergebnissen führen könnte.
12. Das C. difficile Assay liefert keine Empfindlichkeitsergebnisse. Zur Kultivierung und Durchführung von Empfindlichkeitstests ist zusätzliche Zeit erforderlich.
13. Keine Sets verwenden, deren Haltbarkeitsdatum überschritten ist.
14. Geladene PIEs nicht kühlen.
15. Bei Überschreitung der empfohlenen Stuhlmenge kann das C. difficile Assay beeinträchtigt werden.
16. Jeder Lauf muss mit acht PIEs im Revogene Karussell durchgeführt werden, um das thermodynamische und mechanische Gleichgewicht innerhalb des Laufs aufrechtzuerhalten.

## GEFAHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

Es gibt keine bekannten Gefahren, die mit diesem Produkt verbunden sind.

## LAGERUNG UND STABILITÄT

1. Gesammelte Proben sind während des Transports bei 2 C bis 25 C aufzubewahren.
2. Stuhlproben können bei 25 C max. 2 Tage oder bei 2–8 C max. 4 Tage aufbewahrt werden.
3. Inokulierte SBTs können bei 25 C max. 2 Tage oder bei 2–8 C max. 3 Tage aufbewahrt werden.
4. Das C. difficile Set bei 2–25 C aufbewahren. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett des Kits angegeben.

## GEBRAUCHSANWEISUNG

### PROBENAHME UND TRANSPORT

Probentyp: Ungeformte (flüssige oder weiche) Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf eine CDI.

Den ungeformten Stuhl nach den örtlichen Richtlinien oder Verfahren in einen trockenen, sauberen Behälter geben.

1. Flüssigen oder weichen Stuhl (nicht aber Urin) in den Behälter geben. Eine Vermischung der Probe mit Toilettenpapier, Wasser oder Seife vermeiden.
2. Den Behälter mit der Proben- oder Patienten-ID kennzeichnen und zum Testen an das Labor schicken (siehe Abschnitt zur Lagerung und Stabilität).

### PROBENAUFBEREITUNG UND HANDHABUNG

**HINWEIS 1:** Den Test innerhalb von einer Stunde nach dem Öffnen des Beutels mit dem PIE beginnen.

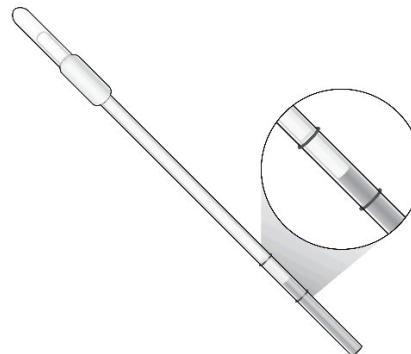
#### SBT-VORBEREITUNG

1. Entnehmen Sie aus der Kit-Verpackung ein SBT und ein LOOP für jede zu testende Probe.
2. Das SBT mit der entsprechenden Probenidentifikationsnummer identifizieren (oder kennzeichnen), ohne dabei die Barcodes zu überschreiben oder unkenntlich zu machen. Das SBT in den Revogene Probenteller einsetzen, falls verwendet.
3. Die Probe im Vortex-Mixer bei maximaler Drehzahl 15 Sekunden lang mischen. Die LOOP in den Stuhl tauchen. Überschüssigen weichen Stuhl an der Außenseite der Öse entfernen, um etwa 5 µL zu nehmen.
4. Die Kappe vom SBT nehmen, die DTL 2–3 Sekunden lang in das SBT schütteln bzw. schnell wirbeln, sodass sich die Probe von der Öse löst. Darauf achten, dass immer nur ein SBT offen ist.
5. Die Kappe wieder auf dem SBT anbringen und fest verschließen und das SBT in den Revogene Probenteller einsetzen, falls verwendet.
6. Etwaige weitere Proben zum Testen durch Wiederholung der Schritte 1 bis 5 präparieren und dann mit Schritt 7 fortfahren.
7. Wenn alle Proben aufbereitet sind, mit der Vorbereitung des C. difficile PIE fortfahren (nächster Abschnitt).

#### PIE-VORBEREITUNG

**HINWEIS 1:** Verarbeiten Sie jeweils eine Probe.

8. Das SBT im Vortex-Mixer 15 Sekunden lang bei maximaler Drehzahl mischen.
9. Den PIE-Beutel auf der linken Seite (bei Sicht auf das Etikett) öffnen und das PIE herausnehmen.
10. Das C. difficile PIE in den Revogene Probenteller einsetzen, falls verwendet.
11. Nehmen Sie ein DTT aus der Verpackung des Kits und aspirieren Sie den Probenpuffer durch Zusammendrücken des gesamten Ballons. Der Flüssigkeitspegel im DTT muss zwischen den beiden Markierungen liegen (**Abbildung 2**). Wenn der Flüssigkeitspegel nicht zwischen den beiden Markierungen liegt, die Probenpuffermenge vollständig in das SBT verbringen. Hierfür den gesamten Saugball zusammendrücken und Schritt 11 wiederholen.
12. Den Probenpuffer vollständig in die Probenaufnahmekammer des PIE verbringen (**Abbildung 1**).
13. Die PIE-Kappe fest verschließen und darauf achten, dass die Kappe sicher sitzt. Geladene PIEs nicht kühlen. Darauf achten, dass immer nur ein PIE offen ist.
14. Die Schritte 8 bis 13 für alle weiteren Proben wiederholen und anschließend mit Schritt 15 fortfahren.
15. Die Stuhlproben und das inokulierte SBT können für die im Abschnitt **Lagerung und Stabilität** angegebene Dauer bei 2–8 C bzw. 25 C aufbewahrt werden.



**Abbildung 2.**  
Darstellung eines angemessenen Probenpufferpegels unter Verwendung des Disposable Transfer Tool (DTT).

## REVOGENE-BETRIEB

**HINWEIS 1:** In einem Durchlauf mit dem Revogene können maximal acht Proben gleichzeitig verarbeitet werden (einschließlich externer Kontrollen).

**HINWEIS 2:** Bei jedem Durchlauf müssen acht PIEs in das Revogene eingesetzt sein. Wenn weniger als acht Proben bearbeitet werden, müssen die leeren Stellen mit MOCK PIEs\* gefüllt werden.

**HINWEIS 3:** Weitere Informationen zur Einrichtung und zum Betrieb des Revogene finden Sie im Revogene Benutzerhandbuch.<sup>13</sup>

1. Das Revogene einschalten (falls nicht bereits getan). Die Software startet automatisch.
2. Zur Anmeldung Ihren <Benutzernamen> und Ihr <Passwort> eingeben und auf <Anmelden> tippen. Das Hauptmenü wird automatisch angezeigt.
3. Auf <Lauf einrichten> tippen.
4. Die Probenidentifikationsnummer entweder mit dem Barcode-Scanner einlesen oder manuell eingeben. Für die manuelle Eingabe auf das Bleistift-Symbol der Zeile <Proben-ID scannen oder eingeben> tippen.
5. Mithilfe des Revogene Barcodescanners die SBT- und C. difficile PIE-Barcodes eingeben. Das PIE vorsichtig vor dem Scanner platzieren. SBT- und PIE-Barcodes können auch manuell eingegeben werden (durch Tippen auf das Bleistift-Symbol der jeweiligen Zeile). Das PIE vorsichtig handhaben und nicht fallenlassen, schütteln oder umdrehen.
6. (Optional) Auf das Bleistift-Symbol der Zeile <Kommentare hinzufügen> tippen und einen Kommentar eingeben.
7. Das C. difficile PIE an beliebiger Stelle ins Karussell des Revogene einsetzen. Die Software ordnet die Probe und das SBT automatisch dem richtigen C. difficile PIE zu.
8. In der Zeile <Das PIE in das Instrument einsetzen> auf <OK> tippen, um zu bestätigen, dass das PIE in das Instrument eingesetzt ist. Anschließend die Schritte 4 bis 8 für die restlichen Proben wiederholen.
9. Nachdem alle C. difficile PIEs und gegebenenfalls erforderliche MOCK PIEs in das Instrument eingesetzt wurden, auf <Weiter> tippen.
10. Den Retentionsring scannen und auf dem Karussell anbringen. Den Instrumentendeckel schließen.
11. Den Testlauf durch Tippen auf <Start> initiieren.

\*Wenn keine MOCK PIEs verfügbar sind, unbefüllte Assay-PIEs verwenden, die mit nicht inkulierten Probenpuffern (LEER) oder externen Kontrollen gefüllt sind.

## ANZEIGE UND EXPORT DER ERGEBNISSE

**HINWEIS 1:** Weitere Informationen zur Ermittlung von Testergebnissen finden Sie im Revogene Benutzerhandbuch.<sup>13</sup>

1. Wenn der Durchlauf abgeschlossen ist, öffnet sich der Deckel automatisch.
2. Auf das Symbol Home tippen.
3. Wenn das Revogene heruntergefahren ist, erneut den <Benutzernamen> und das <Passwort> eingegeben und auf <Anmelden> tippen. Das Hauptmenü wird automatisch angezeigt.
4. Zum Anzeigen der Testergebnisse auf das Symbol <Ergebnisse> tippen.
5. Auf <Letzter Lauf> tippen, um die zuletzt ermittelten Testergebnisse anzuzeigen.
6. Im Menü <Letzter Lauf> die Proben auswählen, für die ein Ergebnisbericht exportiert werden soll. Um alle Proben auf einmal auszuwählen, auf das erste Kästchen links neben der Spalte „Proben-ID“ tippen.
7. Auf <Export> tippen und den Speicherort (z. B. einen USB-Stick) auswählen.
8. Den Retentionsring und die C. difficile PIEs vom Revogene entfernen. Benutze C. difficile PIEs in geeigneten Abfallbehältern für potenziell infektiöses Material gemäß den gängigen Verfahren Ihrer Institution entsorgen.

## WIEDERHOLUNGSTESTVERFAHREN

### UNGEKLÄRTE ODER UNBESTIMMBARE ERGEBNISSE EINER PROBE

Wenn für eine Probe ungeklärte (Unresolved, UNR) oder unbestimmte (Indeterminate, IND) Ergebnisse vorliegen, ist innerhalb des im Abschnitts **Lagerung und Stabilität** angegebenen Zeitraums ein Wiederholungstest aus dem entsprechenden inkulierten SBT durchzuführen. Es ist nur ein Wiederholungstest aus dem SBT erlaubt.

Den Inhalt des SBT mindestens 15 Sekunden bei höchster Drehzahl im Vortex-Mixer mischen. Einen neuen Beutel verwenden und die Schritte 9 bis 13 in den Abschnitten **Probenaufbereitung und Handhabung/PIE-Vorbereitung** folgen. Anschließend mit dem Abschnitt **Revogene Betrieb** fortfahren.

### UNGEKLÄRTE, UNBESTIMMTE, FALSCH NEGATIVE ODER FALSCH POSITIVE ERGEBNISSE FÜR EINE EXTERNE KONTROLLE

Wenn für eine externe Kontrolle ein ungeklärtes, unbestimmtes, falsch negatives oder falsch positives Ergebnis erzielt wird, ist der Lauf ungültig. Die im Lauf enthaltenen Proben sollten unter Verwendung des entsprechenden inkulierten SBT zusammen mit frisch aufbereiteten externen Kontrollen innerhalb des im Abschnitt **Lagerung und Stabilität** angegebenen Zeitraums wiederholt werden. Informationen zur Aufbereitung frischer externer Kontrollen erhalten Sie nachfolgend im Abschnitt **Qualitätssicherung**.

Um den Wiederholungstest mit dem entsprechenden inkulierten SBT durchzuführen, das SBT im Vortex-Mixer mindestens 15 Sekunden lang bei maximaler Drehzahl mischen. Einen neuen Beutel verwenden und die Schritte 9 bis 13 in den Abschnitten **Probenaufbereitung und Handhabung/PIE-Vorbereitung** folgen. Anschließend mit dem Abschnitt **Revogene Betrieb** fortfahren.

### QUALITÄTSSICHERUNG

Qualitätskontrollverfahren dienen der Überwachung der Exaktheit und Präzision des analytischen Verfahrens. Jedes Labor muss die Anzahl, Art und Häufigkeit der Tests von Kontrollmaterial anhand der anwendbaren Vorschriften bzw. der Vorgaben von Akkreditierungsagenturen selbst festlegen. Das nachstehend beschriebene Verfahren kann, falls zutreffend, basierend auf örtlichen Richtlinien und Verfahren angewendet werden.

**HINWEIS 1:** Für jede aufbereitete externe Kontrolle sind separate LOOP, DTTs, SBTs und PIEs zu verwenden.

1. Jedes C. difficile PIE enthält eine Verfahrenskontrolle (Process Control, PrC) zur Verifizierung der Probenhomogenisierung, der Probenverdünnung, der Lyse von Zellen, der Inhibition von DNA-Amplifikation und des Assay-Reagenzienversagens.
2. Gemäß bewährter Laborpraxis empfiehlt sich der Einsatz von Kontrollmaterialien. Benutzer sollten die entsprechenden Leitlinien zur Durchführung externer Kontrollen folgen. Es wird empfohlen, in jedem Labor täglich mindestens eine externe Positivkontrolle und eine externe Negativkontrolle mit dem C. difficile Assay auf dem Revogene durchzuführen, bis das Verfahren angemessen validiert ist.
3. Externe Kontrollmaterialien werden nicht von Meridian Bioscience, Inc. bereitgestellt. Die Revogene-Software verwendet keine externen Kontrollen für die Auswertung von Probentestergebnissen. Externe Kontrollen werden wie Proben behandelt.
4. Es wird die Bereitstellung verschiedener Arten von externen Kontrollen empfohlen, damit Benutzer die für das Qualitätskontrollprogramm ihres Labors geeignete Kontrolle auswählen können. Aufbereitete externe Kontrollen gemäß dem Abschnitt **Probenaufbereitung und Handhabung** verarbeiten und testen.

Externe Positivkontrolle:

1. Zur Verwendung als externe Positivkontrolle wird eine frisch aufbereitete Zellsuspension eines toxigenen C. difficile-Stamms mit dem *tcdB*-Gen aus handelsüblichem Kontrollmaterial (z. B. ATCC® 43255™) empfohlen, die mit einem McFarland-Standard von  $0,5 \pm 0,05$  hergestellt und 1:2 in Kochsalzlösung (z. B. BD BBL™ Prepared Saline Solution, Kat.-Nr. 221819) verdünnt wurde.
2. Alternativ kann für eine externe Positivkontrolle eine zuvor charakterisierte Stuhlprobe, die positiv auf toxigenes C. difficile getestet wurde, verwendet werden.

Externe Negativkontrolle:

1. Zur Verwendung als externe Negativkontrolle wird eine frisch aufbereitete Zellsuspension eines nicht toxigenen C. difficile-Stamms aus handelsüblichem Kontrollmaterial (z. B. ATCC® 43593™) empfohlen, die mit einem McFarland-Standard von  $0,5 \pm 0,05$  in Kochsalzlösung (z. B. BD BBL™ Prepared Saline Solution, Kat.-Nr. 221819) hergestellt wurde.
2. Alternativ kann für eine externe Negativkontrolle eine zuvor charakterisierte Stuhlprobe, die negativ auf toxigenes C. difficile getestet wurde, verwendet werden.

## ERGEBNISAUSWERTUNG

Die Ergebnisse werden vom Revogene anhand von gemessenen Fluoreszenzsignalen und eingebetteten Berechnungsalgorithmen kalkuliert und im Fenster „Ergebnisse“ angezeigt. Mögliche Ergebnisse:

Probe	Symbol	Ergebnis	Interpretation
Patientenprobe		Positiv	Toxigene <i>C. difficile</i> -Ziel-DNA erkannt.
		Negativ	Keine toxigene <i>C. difficile</i> -Ziel-DNA erkannt.
		Ungeklärt	Fehler bei der Amplifikation/Erkennung in der Verfahrenskontrolle sowie für die toxigenen <i>C. difficile</i> -Ziel-DNA. Dieser könnte auf inhibitorische Proben, Mikrofluid- oder Reagenzienversagen zurückzuführen sein. Wiederholungstest erforderlich (siehe Abschnitt <b>Wiederholungstestverfahren</b> für weitere Informationen).
		Unbestimmt	Aufgrund eines möglichen Erkennungsfehlers des Revogene während der Assay-Verarbeitung, der Datenanalyse oder infolge einer Laufunterbrechung durch den Benutzer kein Ergebnis anzeigbar. Wiederholungstest erforderlich (siehe Abschnitt <b>Wiederholungstestverfahren</b> für weitere Informationen).
Externe Positiv-kontrolle		Positiv	Gültiges positives Ergebnis für die externe Kontrolle.
		Negativ	Eine externe Positivkontrolle, die ein negatives Ergebnis erzielt, weist auf ein Problem bei der Probenhandhabung/-aufbereitung hin. <b>Der Testlauf ist ungültig.</b> Die Technik der Probenhandhabung/-aufbereitung überprüfen. Wiederholungstest erforderlich (siehe Abschnitt <b>Wiederholungstestverfahren</b> für weitere Informationen).
		Ungeklärt	Falsches positives Ergebnis für die externe Kontrolle. <b>Der Testlauf ist ungültig.</b> Wiederholungstest erforderlich (siehe Abschnitt <b>Wiederholungstestverfahren</b> für weitere Informationen).
		Unbestimmt	Falsches positives Ergebnis für die externe Kontrolle. <b>Der Testlauf ist ungültig.</b> Wiederholungstest erforderlich (siehe Abschnitt <b>Wiederholungstestverfahren</b> für weitere Informationen).
Externe Negativ-kontrolle		Positiv	Eine externe Negativkontrolle, die ein positives Ergebnis erzielt, weist auf ein Problem bei der Probenhandhabung und/oder eine Kontaminierung hin. <b>Der Testlauf ist ungültig.</b> Das Verfahren der Probenhandhabung überprüfen. Wiederholungstest erforderlich (siehe Abschnitt <b>Wiederholungstestverfahren</b> für weitere Informationen).
		Negativ	Gültiges negatives Ergebnis für die externe Kontrolle.
		Ungeklärt	Falsches negatives Ergebnis für die externe Kontrolle. <b>Der Testlauf ist ungültig.</b> Wiederholungstest erforderlich (siehe Abschnitt <b>Wiederholungstestverfahren</b> für weitere Informationen).
		Unbestimmt	Falsches negatives Ergebnis für die externe Kontrolle. <b>Der Testlauf ist ungültig.</b> Wiederholungstest erforderlich (siehe Abschnitt <b>Wiederholungstestverfahren</b> für weitere Informationen).

## EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

- Das *C. difficile* Assay darf mit dem Revogene nur von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden.
- Das *C. difficile* Assay ist nicht zur Unterscheidung von *C. difficile*-Trägern von Personen mit einer *C. difficile*-Infektion gedacht.
- Das *C. difficile* Assay liefert keine Empfindlichkeitsergebnisse. Für Empfindlichkeitstests werden Kulturisolat benötigt.
- Die Leistungsmerkmale des *C. difficile* Assays wurden mit ungeformten (flüssigen oder weichen) Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf eine *C. difficile*-Infektion geprüft. Der Einsatz des *C. difficile* Assays bei anderen klinischen Probentypen als vorgegeben ist nicht erprobt, und es liegen keine Leistungsmerkmale dazu vor.
- Die Ergebnisse des *C. difficile* Assays sollten als Zusatz zu klinischen Beobachtungen und anderen dem Arzt verfügbaren Informationen herangezogen werden.
- Die Testergebnisse können durch eine gleichzeitige antimikrobielle Therapie beeinträchtigt werden, da *C. difficile*-DNA weiterhin nachweisbar sein kann.
- Ein positives Testergebnis bedeutet nicht notwendigerweise, dass lebensfähige Organismen vorhanden sind. Es deutet jedoch auf die Anwesenheit toxiger *C. difficile*-DNA hin.
- Falsche Testergebnisse können durch unsachgemäße Probennahme, -handhabung oder -lagerung, technische Fehler oder das Vertauschen von Proben auftreten. Um falsche Ergebnisse zu vermeiden, ist eine sorgfältige Einhaltung der Anleitungen in dieser Beilage, dem Revogene Benutzerhandbuch<sup>13</sup> sowie bewährter Leitlinien erforderlich.
- Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit einer Besiedelung mit *C. difficile* nicht aus. Falsche negative Ergebnisse können auftreten, wenn die *C. difficile*-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze dieses Assays liegt. Wenn der Patient objektive oder subjektive Infektionssymptome hat, dann sollten andere Labortests und klinische Informationen zur Bestätigung eines negativen Ergebnisses herangezogen werden.
- Eine Kontamination oder falsche Negativergebnisse können auftreten, wenn eine PIE-Kappe nicht richtig verschlossen wurde.
- Es gibt zwar keine bekannten *C. difficile*-Stämme ohne das *tcdB*-Gen, sollte aber ein solcher Stamm auftauchen, dann könnte er zu einem falschen Ergebnis des *C. difficile* Assays führen.
- Mutationen oder Polymorphismen in der Primer- oder Sondenbindungsregion könnten die Erkennung von *tcdB*-Genvariationen von *C. difficile* beeinträchtigen und zu falschen Negativergebnissen des *C. difficile* Assays führen.
- Calciumcarbonat (z. B. Tums®) oder Aluminiumhydroxid/Magnesiumhydroxid (z. B. StomaaX®) kann die Erkennung von toxigenem *C. difficile* verhindern, wenn eine dieser Substanzen im Probenpuffer in einer Konzentration von > 0,5 mg/mL bzw. > 0,5 µL/mL vorhanden ist.
- Die Anwesenheit von *Clostridium sordellii* zu > 10<sup>5</sup> CFU/mL des Probenpuffers kann zu falsch positiven Ergebnissen führen.
- Eine kombinatorische Wirkung von *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* O157:H7 und *Helicobacter pylori* zu ≥ 10<sup>6</sup> CFU/mL des Probenpuffers kann die Erkennung von toxigenem *C. difficile* verhindern.
- Eine kombinatorische Wirkung von *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Streptococcus agalactiae* und *Vibrio parahaemolyticus* zu ≥ 10<sup>6</sup> CFU/mL des Probenpuffers kann die Erkennung von toxigenem *C. difficile* verhindern.

## ERWARTETE WERTE

Die Prävalenz von *C. difficile*-Infektionen (CDI) hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie etwa der Infektionsneigung infolge einer vorausgegangenen Therapie mit Breitband-Antibiotika, vorhandenen Symptomen sowie dem Behandlungsstandard. In einer kombinierten prospektiven und retrospektiven Studie wurden Proben an acht verschiedenen Klinikstandorten von 2.581 Probanden im Alter von 0 bis 2 Jahren bis über 60 Jahre genommen. Von den 2.461 Proben, die alle Einschlusskriterien aber keine der Ausschlusskriterien erfüllten, waren 333 infolge der kombinierten Ergebnisse der toxigenen Direkt- und Anreicherungskultur bei einer beobachteten Prävalenz von 13,5 % [333/2461; 95 % CI: 12,2–15 %] positiv. Der Prozentsatz der positiven Ergebnisse des Revogene *C. difficile* Assays in der Studienpopulation betrug 11,5 % [283/2461; 95 % CI: 10,3–12,8 %].

## KLINISCHE LEISTUNGSMERKMAL

Die klinische Leistung des Revogene *C. difficile* Assays wurde in einer prospektiven und retrospektiven Untersuchung an mehreren Standorten ermittelt, die von einer unabhängigen Ethikkommission (Independent Ethics Committee, IEC) genehmigt wurde. Die Ergebnisse wurden dabei mit einer toxigenen Kultur verglichen, für die Reste von anonymisierten, ungeformten (flüssigen oder weichen) Stuhlproben von Probanden mit Verdacht auf CDI verwendet wurden. Zwischen dem 4. Februar 2017 und dem 15. Juli 2017 wurden 2.581 Proben prospektiv an sieben verschiedenen Standorten in den USA und Kanada von symptomatisch geeigneten Probanden genommen. Es wurden nur Proben zugelassen, die alle Einschlusskriterien der Studie, aber keines der Ausschlusskriterien erfüllten. Zur Ermittlung der Leistung des Revogene *C. difficile* Tests anhand des Vergleichs der kombinierten Methode aus Direkt- und Anreicherungskulturen wurden 2.463 Proben verwendet. Alle 2.463 frisch gesammelten Proben wurden in Kultur getestet, 798 wurden als frische Proben mit dem Revogene *C. difficile* Assay analysiert, und eine Teilmenge von 1.665 Proben wurde zum späteren Test mit dem Revogene *C. difficile* Assay eingefügt.

Die toxige Kulturmethode wurde an einem zentralen Referenzlabor durchgeführt und das Revogene *C. difficile* Assay an den sieben dafür geeigneten Standorten. Die toxige Kulturmethode beinhaltete eine Direkt- und eine Anreicherungskultur folgt von Zytotoxitätstests. Bei der Direktkulturmethode wurde ein Abstrich der Stuhlprobe vom anaeroben Transportmedium zu einem vorreduzierten selektiven anaeroben Medium in Form einer standardmäßigen CCFA-Platte (Cycloserin-Cefoxitin-Fructose-Agar) transferiert. Dem folgte ein Zytotoxitätstest an vom Stuhl isolierten *C. difficile*-Kolonien. Die Identität der in Direktkulturen isolierten Kolonien, die morphologisch *C. difficile* ähneln (d. h. gelb trüb mit Stalgeruch), wurde in einem Aero-Intoleranztest auf Schokolade-Agar-Platten und auf einer Blut-Agar-Platte (BAP) unter anaeroben Bedingungen bestätigt.

Nach Identifizierung der Kolonien wurde eine zweite BAP-Platte, die eine Vancomycin-Scheibe (5 mcg) enthielt, platziert. Anschließend wurde eine anaerobe Fleischbrühe mithilfe einer Impföse inkuliert. Die inkulierte Brühe wurde anaerob bei 35–37 °C für 48 Stunden zu Zytotoxitätstests mittels Cell Cytotoxicity Neutralization Assay (CCNA; Cytotoxicity Assay für *Clostridium difficile*-Toxin, diagnostische Hybriden) inkuliert. Für die Anreicherungskulturmethode wurde der zum Inkulieren der CCFA-Platte verwendete Tupfer auch zum Inkulieren eines Röhrchens mit Cycloserin-Cefoxitin-Mannitol-Brühe mit Taurocholat und Lysozym (CCMB-TAL) genutzt. Die angereicherte Brühe wurde auf einer weiteren CCFA-Platte subkultiviert und mit demselben Verfahren wie für die Direktmethode analysiert. Eine Probe gilt für toxigenes *C. difficile* als positiv getestet, wenn *C. difficile* durch Direkt- oder Anreicherungskultur aus Stuhl gewonnen und Bakterienisolate mit CCNA positiv getestet wurden. Wenn *C. difficile* aus der Direktkultur isoliert und das Isolat beim Zytotoxitätstest positiv getestet wurde, erfolgte keine weitere Analyse der Anreicherungskultur. Proben galten nur dann für toxigenes *C. difficile* als negativ getestet, wenn sie sowohl bei der Direktkultur als auch bei der kombinierten Kultur (Anreicherungskultur) als negativ getestet wurden.

Die Werte für die Sensitivität, die Spezifität, den positiven prädiktiven Wert (PPV) sowie den negativen prädiktiven Wert (NPV) wurden anhand des Vergleichs der Revogene *C. difficile* Assay-Ergebnisse mit den kombinierten Ergebnissen der Direkt- und Anreicherungskulturmethode (Referenzmethode) berechnet. An einem Teil der Proben mit abweichenden Ergebnissen zwischen dem Revogene *C. difficile* Assay und der kombinierten Kulturmethode wurde mithilfe des Routine-PCR-Assays von vier Standorten eine Diskrepanzanalyse durchgeführt. Schließlich wurden die prozentuale positive Übereinstimmung (Positive Percent Agreement, PPA) und die prozentuale negative Übereinstimmung (Negative Percent Agreement, NPA) anhand des Vergleichs des Revogene *C. difficile* Assays mit den Ergebnissen der Direktkultur ermittelt.

## ERGEBNISSE

Die demografischen Merkmale der Studienpopulation sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

**Tabelle 1.** Demografische Merkmale der Studienpopulation aller konformen Proben auf allen Ebenen

Probanden	Alle Probanden N=2461	Frisch N=797	Gefroren N=1664
<b>Herkunft der Probe</b>			
Stationäre Patienten	1804 (73,3 %)	617 (77,4 %)	1187 (71,3 %)
Ambulante Patienten	420 (17,1 %)	123 (15,4 %)	297 (17,8 %)
Notaufnahme	234 (9,5 %)	57 (7,2 %)	177 (10,6 %)
Keine Angabe	3 (0,1 %)	0 (0,0 %)	3 (0,2 %)
<b>Altersgruppe</b>			
< 2	9 (0,4 %)	4 (0,5 %)	5 (0,3 %)
3–18	105 (4,3 %)	30 (3,8 %)	75 (4,5 %)
19–60	1199 (48,7 %)	399 (50,1 %)	800 (48,1 %)
> 60	1148 (46,6 %)	364 (45,7 %)	784 (47,1 %)

Von den qualifizierten 798 frischen und 1665 gefrorenen Proben, die auf Proben- und PCR-Ebene konform waren, wurden 9 bzw. 13 während der Erstprüfung als ungeklärt eingestuft (1,1 % der frischen und 0,8 % der gefrorenen Proben). Nach den Wiederholungstests blieb nur eine frische Probe ungeklärt. Die Rate der ungeklärten Proben lag nach den Wiederholungstests bei 0,1 % (1/798) für die frischen und bei 0,0 % (0/1665) für die gefrorenen Proben.

Von den qualifizierten 798 frischen und 1665 gefrorenen Proben, die auf Proben- und PCR-Ebene konform waren, wurden 12 bzw. 28 während der Erstprüfung als unbestimmt eingestuft (1,5 % der frischen und 1,7 % der gefrorenen Proben). Nach den Wiederholungstests blieb nur eine gefrorene Probe unbestimmt. Die Rate der unbestimmten Proben lag nach den Wiederholungstests bei 0,0 % (0/798) für die frischen und bei 0,1 % (1/1665) für die gefrorenen Proben.

Die Rate der nicht ausweisbaren Ergebnisse für die frischen Proben lag zu Beginn bei 2,6 % (21/798) und nach den Wiederholungstests bei 0,1 % (1/798). Die Rate der nicht ausweisbaren Ergebnisse für die gefrorenen Proben lag zu Beginn bei 2,5 % (41/1665) und nach den Wiederholungstests bei 0,1 % (1/1665).

## VERGLEICH MIT KOMBINIERTER DIREKT- UND ANREICHERUNGSKULTUR

Die klinische Leistung des Revogene *C. difficile* Assays im Vergleich zu den kombinierten Ergebnissen der toxigenen Direkt- und Anreicherungskultur sind in **Tabelle 2** für frische und in **Tabelle 3** für gefrorene Proben aufgeführt.

Von den 2463 qualifizierten Proben erzielten 2461 gültige Ergebnisse bei der toxigenen Direktkultur, der toxigenen Anreicherungskultur und dem Revogene *C. difficile* Assay. Von den 2461 Proben waren 333 infolge der kombinierten Ergebnisse der toxigenen Direkt- und Anreicherungskultur bei einer beobachteten Prävalenz von 13,5 % [333/2461; 95 % CI: 12,2–15,0 %] positiv.

Die Leistungsmerkmale des *C. difficile* Assays, ermittelt anhand von frischen Stuhlproben, erzielten eine Sensitivität von 80,5 % (91/113; 95 % CI: 72,0–87,4 %) und eine Spezifität von 97,1 % (664/684; 95 % CI: 95,5–98,2 %) im Vergleich zur Referenzmethode (kombinierte Direkt- und Anreicherungskulturmethode), ermittelt anhand von frischen Stuhlproben (**Tabelle 2**).

**Tabelle 2.** Allgemeine Leistungsmerkmale des Revogene *C. difficile* Assays im Vergleich zur Referenzmethode (kombinierte Direkt- und Anreicherungskulturmethode), ermittelt anhand von frischen Stuhlproben.

Gesamtleistung Frischer Stuhl		Referenzmethode		
C. difficile Assay	Positiv	Positiv	Negativ	Summe
	Negativ	22 <sup>b</sup>	664	686
	Summe	113	684	797

Sensitivität: 80,5 % (91/113; 95 % CI: 72,0–87,4 %)

Spezifität: 97,1 % (664/684; 95 % CI: 95,5–98,2 %)

PPV: 82,0 % (91/113; 95 % CI: 73,6–88,6 %)

NPV: 96,8 % (664/686; 95 % CI: 95,2–98,0 %)

<sup>a</sup> Von den 20 Proben mit falsch positiven Revogene *C. difficile* Testergebnissen relativ zur kombinierten Direkt- und Anreicherungskultur waren unter Anwendung einer zweiten NAAT-Methode (Routine-PCR-Assay der Standorte) 8 Proben positiv und 4 negativ.

<sup>b</sup> Von den 22 Proben mit falsch negativen Revogene *C. difficile* Testergebnissen relativ zur kombinierten Direkt- und Anreicherungskultur waren unter Anwendung einer zweiten NAAT-Methode (Routine-PCR-Assay der Standorte) 13 Proben negativ und 4 positiv.

Die Leistungsmerkmale des *C. difficile* Assays, ermittelt anhand von gefrorenen Stuhlproben, erzielten eine Sensitivität von 87,3 % (192/220; 95 % CI: 82,1–91,4 %) und eine Spezifität von 97,3 % (1405/1444; 95 % CI: 96,3–98,1 %) im Vergleich zur Referenzmethode (**Tabelle 3**).

**Tabelle 3.** Allgemeine Leistungsmerkmale des Revogene *C. difficile* Assays im Vergleich zur Referenzmethode (kombinierte Direkt- und Anreicherungskulturmethode), ermittelt anhand von gefrorenen Stuhlproben.

Gesamtleistung Gefrorener Stuhl		Referenzmethode		
C. difficile Assay	Positiv	Positiv	Negativ	Summe
	Negativ	28 <sup>b</sup>	1405	1433
	Summe	220	1444	1664

Sensitivität: 87,3 % (192/220; 95 % CI: 82,1–91,4 %)

Spezifität: 97,3 % (1405/1444; 95 % CI: 96,3–98,1 %)

PPV: 83,1 % (192/231; 95 % CI: 77,7–87,7 %)

NPV: 98,0 % (1405/1433; 95 % CI: 97,2–98,7 %)

<sup>a</sup> Von den 39 Proben mit falsch positiven Revogene *C. difficile* Testergebnissen relativ zur kombinierten Direkt- und Anreicherungskultur waren unter Anwendung einer zweiten NAAT-Methode (Routine-PCR-Assay der Standorte) 17 Proben positiv und 15 negativ.

<sup>b</sup> Von den 28 Proben mit falsch negativen Revogene *C. difficile* Testergebnissen relativ zur kombinierten Direkt- und Anreicherungskultur waren unter Anwendung einer zweiten NAAT-Methode (Routine-PCR-Assay der Standorte) 14 Proben negativ und 12 positiv.

## VERGLEICH MIT DIREKTKULTUR

Die klinische Übereinstimmung des Revogene *C. difficile* Assays im Vergleich zu den Ergebnissen der toxigenen Direktkultur sind in **Tabelle 4** für frische Proben und in **Tabelle 5** für gefrorene Proben aufgeführt.

**Tabelle 4.** Allgemeine Leistungsmerkmale des Revogene *C. difficile* Assays im Vergleich zur Direktkulturmethode, ermittelt anhand von frischen Stuhlproben.

Gesamtleistung Frischer Stuhl		Direktkulturmethode		
C. difficile Assay	Positiv	Positiv	Negativ	Summe
	Negativ	3	683	686
	Summe	66	731	797

PPA: 95,5 % (63/66; 95 % CI: 87,3–99,1 %)

NPA: 93,4 % (683/731; 95 % CI: 91,4–95,1 %)

**Tabelle 5.** Allgemeine Leistungsmerkmale des Revogene *C. difficile* Assays im Vergleich zur Direktkulturmethode, ermittelt anhand von gefrorenen Stuhlproben.

Gesamtleistung Gefrorener Stuhl		Direktkulturmethode		
C. difficile Assay	Positiv	Positiv	Negativ	Summe
	Negativ	8	1425	1433
	Summe	168	1496	1664

PPA: 95,2 % (160/168; 95 % CI: 90,8–97,9 %)

NPA: 95,3 % (1425/1496; 95 % CI: 94,1–96,3 %)

## ANALYTISCHE LEISTUNGSMERKMALE

### ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die analytische Sensitivität (Nachweisgrenze bzw. Limit of Detection, LoD) des *C. difficile* Assays wurde mithilfe einer zuvor für toxigenes *C. difficile* negativ getesteten klinischen Matrix für flüssigen Stuhl bestimmt, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von toxigenen *C. difficile*-Bakteriensuspensionen angereichert wurde. Pro Konzentration wurden in 24 Replikaten zwei toxige *C. difficile*-Stämme (ATCC® 43255™, Ribotyp 087, Toxinotyp 0 und ATCC® BAA-1805™, NAP1, Ribotyp 027, Toxinotyp IIIb) getestet. Die Nachweisgrenze ist als die geringste Konzentration definiert, bei der mindestens 95 % aller Replikate positiv getestet wurden. Bei den beiden getesteten Stämmen lag die Nachweisgrenze des *C. difficile* Assays bei 1.500 CFU/mL der Pufferprobe (Sample Buffer, SB). Die Ergebnisse sind in **Tabelle 6** zusammengefasst.

**Tabelle 6.** Nachweisgrenze des *C. difficile* Assay

ATCC® Nummer des toxigenen <i>C. difficile</i> -Stamms	LoD (CFU/mL des SB)
ATCC® 43255™	1.500
ATCC® BAA-1805™	1.500

### ZUGEHÖRIGKEIT

Die Zugehörigkeit des *C. difficile* Assays wurde für 20 toxige *C. difficile*-Stämme ermittelt, die acht verschiedene Toxinotypen unterschiedlicher geografischer Herkunft repräsentieren. Jeder Stamm wurde anhand einer quantifizierten Zellkultur getestet, die in einer für toxigenes *C. difficile* negativen Matrix für flüssigen Stuhl zu 3.750 CFU/mL des SB angereichert wurde. Dies entspricht dem zwei- bis dreifachen LoD-Wert eines ATCC® 43255™-Stamms. Pro Stamm wurden drei Replikate mit drei verschiedenen *C. difficile* Set-Chargen getestet. Alle getesteten toxigenen *C. difficile*-Stämme wurden bei 3.750 CFU/mL des SB erkannt. Die getesteten Stämme sind in **Tabelle 7** beschrieben.

**Tabelle 7.** Toxige *C. difficile*-Stämme, die hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zum *C. difficile* Assay getestet wurden

Toxige <i>C. difficile</i> -Stämme	Toxinotyp
ATCC® 9689™	(Toxinotyp 0, A+, B+)
ATCC® 700792™	(Toxinotyp 0, A+, B+)
ATCC® 17858™	(Toxinotyp 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1382™	(Toxinotyp 0, A+, B+)
ATCC® 51695™	(Toxinotyp 0, A+, B+)
ATCC® 43600™	(Toxinotyp 0, A+, B+)
ATCC® 43599™	(Toxinotyp 0, A+, B+)
ATCC® 43596™	(Toxinotyp 0, A+, B+)
ATCC® 43594™	(Toxinotyp 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1804™	(Toxinotyp 0, A+, B+)
ATCC® 17857™	(Toxinotyp 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1873™	(Toxinotyp 0, A+, B+)
ATCC® BAA-1870™	(Toxinotyp IIIb, NAP1, A+, B+)
ATCC® BAA-1803™	(Toxinotyp IIIc, NAP1, A+, B+)
ATCC® BAA-1875™	(Toxinotyp V, A+, B+)
ATCC® 43598™	(Toxinotyp VIII, A-, B+)
CCUG 8864	(Toxinotyp X, A-, B+)
ATCC® BAA-1812™	(Toxinotyp XII, A+, B+)
ATCC® BAA-1814™	(Toxinotyp XXII, A+, B+)
ATCC® BAA-2155™	(Toxinotyp XXII, A+, B+)

Zusätzlich wurde am 20. Juli 2017 eine *In-silico*-Analyse durchgeführt, um die Zugehörigkeit der Primer und der Sonde des *C. difficile* Assay-Ziels in Bezug auf 52 toxige *C. difficile*-Stämme aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) zu bewerten. Die Übereinstimmungsergebnisse zeigten keine Abweichungen zu den 52 ausgewählten Sequenzen. Die Erkennung wurde in der Analyse all dieser toxigenen *C. difficile*-Stämme prognostiziert.

### KREUZREAKTIVITÄT

Die Kreuzreaktivität des *C. difficile* Assays wurde mit hohen Anreicherungen von Organismen bewertet, die bei dem Test unberücksichtigt bleiben, phylogenetisch mit *C. difficile* verwandt sind, nicht toxige *C. difficile*-Stämme sind oder in der normalen Darmflora vorhanden sind. Die Studie umfasste 50 Bakterien, eine Hefe, sieben Viren und humane DNA (**Tabelle 8**). Bakterien und Hefe wurden zu  $\geq 10^5$  CFU/mL des SB getestet. Nukleinsäuren von sechs Viren und humane DNA wurden zu  $\geq 10^5$  DNA- oder RNA-Kopien/mL des SB getestet. Die Tests der Organismen erfolgten unter Verwendung von quantifizierten Zellkulturen oder Nukleinsäurelösungen, die in einer für *C. difficile* negativen Matrix für flüssigen Stuhl angereichert waren. Jeder Organismus wurde in drei PCR-Assays getestet.

Unter Studienbedingungen wurde *Clostridium sordellii* im Rahmen des *C. difficile* Assays zu etwa  $10^6$  CFU/mL des SB für ein von drei Replikaten erkannt, war aber bei etwa  $10^5$  CFU/mL des SB nicht reaktiv. Die Stämme des *Clostridium novyi* und *Clostridium scindens* produzierten falsch positive Reaktionen in einem von sechs Replikaten, getestet zu etwa  $10^6$  CFU/mL des SB. Bei drei Replikaten, getestet zu  $10^5$  CFU/mL des SB, wurde keine Reaktivität beobachtet. Der Stamm des *Enterococcus faecalis* produzierte falsch positive Reaktionen in einem von drei Replikaten, getestet zu etwa  $10^7$  CFU/mL des SB. Bei drei Replikaten, getestet zu  $10^6$  CFU/mL des SB, wurde keine Reaktivität beobachtet. Die anderen getesteten Organismen und Nukleinsäuren waren mit dem *C. difficile* Assay nicht reaktiv.

Nur für das Coxsackievirus wurde die Kreuzreaktivität mit Primern und sonden des *C. difficile* Assays durch eine *In-silico*-Analyse aller Stammsequenzen des Coxsackievirus bewertet, die zwischen dem 7. Februar 2017 und dem 11. August 2017 in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) vorhanden waren. Aus der Analyse ging hervor, dass die Stämme des Coxsackievirus nicht mit dem *C. difficile* Assay reaktiv sein sollten.

**Tabelle 8.** Liste der Organismen, die zum Test der Kreuzreaktivität mit dem *C. difficile* Assay herangezogen wurden

Bakterien		
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
<i>Campylobacter jejuni</i> ( <i>Campylobacter coli</i> )	<i>Bacillus cereus</i>	
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	
<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	
<i>Clostridium novyi</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Flavonifractor plautii</i> ( <i>Clostridium orbiscindens</i> )	<i>Enterobacter aerogenes</i>	
<i>Clostridium scindens</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Escherichia coli</i>	
<i>Clostridium difficile</i> (nicht toxigen) – ATCC® 43593™	<i>Klebsiella oxytoca</i>	
<i>Clostridium difficile</i> (nicht toxigen) – ATCC® 43601™	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Prevotella melaninogenica</i>	
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	
<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizona</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
<i>Shigella boydii</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella sonnei</i>	
Hefe		
<i>Candida albicans</i>		
Viren		
Humanes Adenovirus 1 (DNA)	Rotavirus (RNA)	
Enterovirus D68 (RNA)	Norovirus (RNA)	
Echovirus 4 (RNA)	Humanes Herpesvirus 5 (Cytomegalovirus) (DNA)	
Coxsackievirus ( <i>In silico</i> )		
Humane DNA		
	Humane gDNA	

## INTERFERIERENDE ORGANISMEN

Die potenziell hemmende Wirkung von 30 Organismen, die in der normalen Darmflora vorhanden sein können und bei dem Test unberücksichtigt bleiben, wurde anhand von Organismen aus der Kreuzreaktivitätsstudie bewertet (**Tabelle 8**). Es wurde darauf geachtet, dass jede Organismuskategorie (d. h. Bakterien, Hefe, Viren) die häufigsten Erreger von Darminfektionen umfasst. In der für toxigenes *C. difficile*-Stamm ATCC® 43255™ zu 3.750 CFU/mL des SB oder dem toxigenen *C. difficile*-Stamm ATCC® BAA-1805™ zu 4.500 CFU/mL des SB getestet, um ihre Einflussnahme auf die Erkennung von toxigenem *C. difficile* oder die PrC zu bewerten. Jeder Organismus einer Gruppe wurde für Bakterien und Hefe zu  $\geq 10^6$  CFU/mL des SB und für Viren zu  $\geq 10^5$  Kopien/mL des SB verdünnt. Die 30 Organismen der Studie sind in **Tabelle 9** aufgeführt.

**Tabelle 9.** Liste der Organismen, die zum Test der Beeinflussung des *C. difficile* Assays herangezogen wurden

Gruppe 1		
<i>Aeromonas hydrophila</i>		<i>Bacillus cereus</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>		<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> ( <i>Campylobacter coli</i> )		
Gruppe 2		
<i>Candida albicans</i>		<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Clostridium difficile</i> (nicht toxigen) – ATCC® 43593™		<i>Clostridium difficile</i> (nicht toxigen) – ATCC® 43601™
<i>Clostridium perfringens</i>		<i>Clostridium sordellii</i>
Gruppe 3		
<i>Enterobacter aerogenes</i>		<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Escherichia coli</i> O157:H7
<i>Helicobacter pylori</i>		
Gruppe 4		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>		<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
Gruppe 5		
<i>Shigella boydii</i>		<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Shigella sonnei</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Gruppe 6		
Rotavirus (RNA)		Norovirus (RNA)

Keiner der 30 Organismen, die bei Bakterien und Hefe zu  $\geq 10^6$  CFU/mL des SB und bei Viren zu  $\geq 10^5$  Kopien/mL des SB vorhanden waren, hat die Erkennung der PrC und des toxigenen *C. difficile*-Stamms ATCC® BAA-1805™ beeinflusst.

Gruppe 3 und 5 wiesen eine potenziell hemmende Wirkung auf die Erkennung des toxigenen *C. difficile*-Stamms ATCC® 43255™ auf. Wenn jedoch jedes Bakterium dieser Gruppen einzeln zu  $\geq 10^6$  CFU/mL des SB mit dem *C. difficile*-Stamm ATCC® 43255™ getestet wurde, trat keine Beeinträchtigung auf.

## INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Die potenziell hemmende Wirkung von 16 exogenen und 5 endogenen Substanzen, die in der Darmflora vorhanden sein können, wurde mit negativen toxigenen *C. difficile*-Proben und den toxigenen *C. difficile*-Stämmen ATCC® 43255™ und ATCC® BAA-1805™ unter zwei- bis dreifacher Erhöhung der jeweiligen Nachweigrenze (3.750 CFU/mL des SB bzw. 4.500 CFU/mL des SB) unter Verwendung der Matrix für flüssigen Stuhl bewertet. Die Substanzen wurden mit der jeweils potenziell höchsten Konzentration getestet, die in Stuhlproben zu finden sein könnte. Die Ergebnisse der 21 Substanzen sind in **Tabelle 10** aufgeführt.

Die Ergebnisse zeigten keine ausweisbare Beeinflussung der PrC. Calciumcarbonat (z. B Tums®) und Aluminiumhydroxid/Magnesiumhydroxid (z. B. Stomaax®) könnte die Erkennung von toxigenem *C. difficile* gegebenenfalls verhindern, wenn eine dieser Substanzen im SBT in einer Konzentration von 5 mg/mL (0,5 % W/V) bzw. 5 µL/mL (0,5 % V/V) vorhanden ist. Bei Tests zu 0,5 mg/mL (0,05 % W/V) bzw. 0,5 µL/mL (0,05 % V/V) zeigten diese Substanzen keine ausweisbare Beeinflussung des *C. difficile* Assays.

**Tabelle 10.** Liste der mit dem *C. difficile* Assay getesteten exogenen und endogenen Substanzen

Exogene Substanzen		
Substanz (Handelsname)	Konzentration oder Menge in SBT1	Ergebnisse2
Antimykotika/Anti-Juckreiz (Nystatin)	0,5 % W/V	NI
Cremes/Salben (Personnelle Hydrocortisone Creme)	0,5 % V/V	NI
Hämorrhoidencremes-/salben (Preparation H®)	0,5 % V/V	NI
Antazida (Tums®)	0,5 % W/V	I <sup>3</sup>
Antazida (Stomaax®)	0,5 % V/V	I <sup>4</sup>
Einläufe (Life BRAND™ Heavy Mineral Oil USP)	0,5 % V/V	NI
Einläufe (Mesalazin oder 5-Aminosalicylsäure) Acid)	0,5 % W/V	NI
Kondom mit spermizidem Gleitmittel (Trojan® Kondom mit spermizidem Gleitmittel)	Quadrat von 2 mm <sup>2</sup>	NI
Antidiarrhoika (Pepto Bismol™)	0,5 % V/V	NI
Antidiarrhoika (Imodium®)	0,5 % V/V	NI
Laxativa (Senokot®)	0,5 % V/V	NI
Orale und topische Antibiotika (Vancomycin)	0,5 % V/V	NI
Orale und topische Antibiotika (Metronidazol)	0,5 % W/V	NI
Nicht-steroide Entzündungshemmer (Aleve®)	0,5 % W/V	NI
Erfischungstücher (Equate™ Flushable Moist Wipes)	Quadrat von 2 mm <sup>2</sup>	NI
Erfischungstücher (Wet Ones®)	Quadrat von 2 mm <sup>2</sup>	NI
Endogene Substanzen		
Substanz	Konzentration oder Menge in SBT1	Ergebnisse2
Koffett, Triglyceridmischung (C2-C10)	0,5 % V/V	NI
Koffett, Palmitinsäure	1,0 % W/V	NI
Koffett, Stearinäsure	0,5 % W/V	NI
Gesamtes Blut	0,5 % V/V	NI
Schleim	0,5 % V/V	NI

<sup>1</sup>W/V: Weight/Volume; V/V: Volume/Volume

<sup>2</sup>I (Interference): Beeinflussung des *C. difficile* Assays; NI (No Interference): Keine Beeinflussung des *C. difficile* Assays

<sup>3</sup> Keine Beeinflussung bei 0,05 % W/V

<sup>4</sup> Keine Beeinflussung bei 0,05 % V/V

## VERSCHLEPPUNG UND KREUZKONTAMINATION

Die Verschleppung und Kreuzkontamination während und zwischen Läufen wurde anhand von positiven Proben bewertet, die in einer für toxigenes *C. difficile* negativen Matrix für flüssigen Stuhl so aufbereitet wurden, dass sie eine Endkonzentration von  $> 10^7$  CFU/mL des SB des toxigenen *C. difficile*-Stamms ATCC® 43255™ erreicht haben. Es wurden auch echte Negativproben getestet, die nur mit der für toxigenes *C. difficile* negativen Matrix für flüssigen Stuhl aufbereitet wurden.

Für die Studie während Läufen wurden insgesamt zehn Läufe von zwei Bedienern ausgeführt, wobei das *C. difficile* Assay auf einem Revogene erfolgte. Es wurden bei jedem Lauf vier hoch positive Proben und vier negative Proben jeweils im Wechsel getestet. Für die Studie zwischen Läufen wurde von zwei Bedienern insgesamt zehn Läufe auf einem Revogene ausgeführt. Dabei erfolgte ein Lauf mit acht Replikaten hoch positiver Proben gefolgt von einem Lauf mit acht Replikaten negativer Proben.

Die Abwesenheit von Verschleppung und Kreuzkontamination wurde nachgewiesen.

## REPRODUZIERBARKEIT/PRÄZISION

### REPRODUZIERBARKEIT

An drei Standorten wurde von zwei Bedienern pro Standort eine Studie zur Reproduzierbarkeit zwischen Standorten durchgeführt. Die Studie erfolgte an fünf verschiedenen Tagen unter Verwendung einer einzigen *C. difficile* Assay-Set-Charge.

An einem Standort wurde von zwei Bedienern eine Studie zur Reproduzierbarkeit zwischen Chargen durchgeführt. Die Studie erfolgte über 15 Tage unter Verwendung von drei *C. difficile* Assay-Set-Chargen (fünf Tage pro Set-Charge). Für jede Reproduzierbarkeitsstudie wurden insgesamt 120 Replikate für negative Proben und 90 Replikate für jede Kategorie positiver Proben getestet. Diese waren allesamt in einer für toxigenes *C. difficile* negativen Matrix für flüssigen Stuhl aufbereitet. Zwei toxigene *C. difficile*-Stämme wurden als positive Proben verwendet: ATCC® 43255™ (Toxinotyp 0, Ribotyp 087) und ATCC® BAA-1805™ (Toxinotyp IIb, NAP1, Ribotyp 027).

Probenkategorien wurden wie folgt beschrieben:

1. Gering positiv (Low Positive, LP): Die Stämme ATCC® 43255™ und ATCC® BAA-1805™ wurden zu 2.438 CFU/mL bzw. 2.925 CFU/mL des SB angereichert
2. Moderat positiv (MP): Die Stämme ATCC® 43255™ und ATCC® BAA-1805™ wurden zu 3.750 CFU/mL bzw. 4.500 CFU/mL des SB angereichert
3. Echt negativ (True Negative, TN): Proben ohne toxigenen *C. difficile*-Stamm

Die Ergebnisse der einzelnen Probenkategorien, die im Rahmen der Studien zur Reproduzierbarkeit zwischen Standorten und Chargen getestet wurden, sind in **Tabelle 11** bzw. **Tabelle 12** aufgelistet. Bei der Reproduzierbarkeit zwischen Standorten lag die gesamte prozentuale Übereinstimmung für TN, LP und MP bei 100 % des toxigenen *C. difficile*-Stamms ATCC® BAA-1805™. Die gesamte prozentuale Übereinstimmung für LP und MP des toxigenen *C. difficile*-Stamms ATCC® 43255™ betrug 94,4 % bzw. 96,7 % (**Tabelle 11**). Bei der Reproduzierbarkeit zwischen Chargen lag die gesamte prozentuale Übereinstimmung für TN und MP bei 100 % des toxigenen *C. difficile*-Stamms ATCC® BAA-1805™ und für LP bei 98,9 %. Die gesamte prozentuale Übereinstimmung für LP und MP des toxigenen *C. difficile*-Stamms ATCC® 43255™ betrug 91,1 % bzw. 96,7 % (**Tabelle 12**).

Die allgemeinen Mittelwerte für den Zyklusgrenzwert (Cycle Threshold, Ct) mit Varianzkomponenten (SD und % CV) sind in **Tabelle 11** und **Tabelle 12** aufgelistet.

**Tabelle 11.** Ergebnisse der Studie zur Reproduzierbarkeit zwischen Standorten mit einer *C. difficile* Assay-Set-Charge

Kategorie	Toxiger <i>C. difficile</i> -Stamm (ATCC®-Nummer)	Standort 1		Standort 2		Standort 3		Gesamt-ergebnisse/Gesamtzahl	Gesamte prozentuale Übereinstimmung <sup>1</sup>	Gesamt 95 % CI	Ct-Werte <sup>2</sup>		
		Ergebnisse/Gesamt	Prozentuale Übereinstimmung	Ergebnisse/Gesamt	Prozentuale Übereinstimmung	Ergebnisse/Gesamt	Prozentuale Übereinstimmung				Mittelwert gesamt	SD	% CV
LP	ATCC® 43255™	27/30	90,0 %	28/30	93,3 %	30/30	100 %	85/90	94,4 %	87,5 %–98,2 %	38,48	1,56	4,05
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	90/90	100 %	96,7 %–100 %	36,37	2,74	7,54
MP	ATCC® 43255™	29/30	96,7 %	29/30	96,7 %	29/30	96,7 %	87/90	96,7 %	90,6 %–99,3 %	37,68	1,63	4,32
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	90/90	100 %	96,7 %–100 %	36,57	1,65	4,52
TN	N/A	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	97,5 %–100 %	33,09	1,02	3,09

<sup>1</sup>Für die TN-Kategorie wurde für negative Ergebnisse eine prozentuale Übereinstimmung berechnet.

<sup>2</sup>Für die LP- und MP-Kategorie beziehen sich die gemeldeten Ct-Werte auf das toxogene *C. difficile*-Ziel. Für die TN-Kategorie beziehen sich die gemeldeten Ct-Werte auf die PrC.

**Tabelle 12.** Ergebnisse der Studie zur Reproduzierbarkeit zwischen Chargen mit drei *C. difficile* Assay-Set-Chargen

Kategorie	Toxiger <i>C. difficile</i> -Stamm (ATCC®-Nummer)	Charge 1		Charge 2		Charge 3		Gesamt-ergebnisse/Gesamtzahl	Gesamte prozentuale Übereinstimmung <sup>1</sup>	Gesamt 95 % CI	Ct-Werte <sup>2</sup>		
		Ergebnisse/Gesamt	Prozentuale Übereinstimmung	Ergebnisse/Gesamt	Prozentuale Übereinstimmung	Ergebnisse/Gesamt	Prozentuale Übereinstimmung				Mittelwert gesamt	SD	% CV
LP	ATCC® 43255™	27/30	90,0 %	27/30	90,0 %	28/30	93,3 %	82/90	91,1 %	83,2 %–96,1 %	38,57	1,72	4,46
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100 %	29/30	96,7 %	30/30	100 %	89/90	98,9 %	94,0 %–100 %	37,02	1,98	5,35
MP	ATCC® 43255™	29/30	96,7 %	30/30	100 %	28/30	93,3 %	87/90	96,7 %	90,6 %–99,3 %	37,55	2,16	5,75
	ATCC® BAA-1805™	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	90/90	100 %	96,7 %–100 %	36,86	1,31	3,56
TN	N/A	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	97,5 %–100 %	33,21	0,90	2,71

<sup>1</sup>Für die TN-Kategorie wurde für negative Ergebnisse eine prozentuale Übereinstimmung berechnet.

<sup>2</sup>Für die LP- und MP-Kategorie beziehen sich die gemeldeten Ct-Werte auf das toxogene *C. difficile*-Ziel. Für die TN-Kategorie beziehen sich die gemeldeten Ct-Werte auf die PrC.

## PRÄZISION

An einem Standort wurde von zwei Bedienern über 12 Tage eine Präzisionsstudie mit einer einzigen *C. difficile* Assay-Set-Charge durchgeführt.

Die Proben jeder Kategorie wurden in einer für das toxogene *C. difficile* negativen Matrix für flüssigen Stuhl aufbereitet. Zwei toxigene *C. difficile*-Stämme wurden als positive Proben verwendet: ATCC® 43255™ (Toxinotyp 0, Ribotyp 087) und ATCC® BAA-1805™ (Toxinotyp IIb, NAP1, Ribotyp 027).

Probenkategorien wurden wie folgt beschrieben:

1. Gering positiv (Low Positive, LP): Die Stämme ATCC® 43255™ und ATCC® BAA-1805™ wurden zu 2.438 CFU/mL bzw. 2.925 CFU/mL des SB angereichert
2. Moderat positiv (MP): Die Stämme ATCC® 43255™ und ATCC® BAA-1805™ wurden zu 3.750 CFU/mL bzw. 4.500 CFU/mL des SB angereichert
3. Echt negativ (True Negative, TN): Proben ohne toxigenen *C. difficile*-Stamm

Die Präzisionstudien für TN und LP des toxigenen *C. difficile*-Stamms ATCC® BAA-1805™ ergaben eine Übereinstimmung von 100 % und für MP 97,2 %. Die Präzisionstudien für LP und MP des toxigenen *C. difficile*-Stamms ATCC® 43255™ ergaben eine Übereinstimmung von 88,9 % bzw. 95,8 % (**Tabelle 13**).

**Tabelle 13.** Prozentuale Übereinstimmung der Präzisionstudie an einem Standort mit einer einzigen *C. difficile* Assay-Set-Charge

Kategorie	Toxiger <i>C. difficile</i> -Stamm (ATCC®-Nummer)	Gesamte prozentuale Übereinstimmung <sup>1</sup>	Gesamt 95 % CI
LP	ATCC® 43255™	88,9 %	79,3 %–95,1 %
	ATCC® BAA-1805™	100 %	95,9 %–100 %
MP	ATCC® 43255™	95,8 %	88,3 %–99,1 %
	ATCC® BAA-1805™	97,2 %	90,3 %–99,7 %
TN	N/A	100 %	96,9 %–100 %

<sup>1</sup>Für die TN-Kategorie wurde für negative Ergebnisse eine prozentuale Übereinstimmung berechnet.

## E-LABELING

Die Dokumentation zu diesem Produkt steht online unter [www.meridianbioscience.com/pi](http://www.meridianbioscience.com/pi). Zur Verfügung. Papierexemplare sind auf Anfrage von Ihrem örtlichen Vertriebspartner oder telefonisch über die auf der Verpackung des Sets aufgeführten Rufnummern erhältlich.

**REFERENCES**

1. Rousseau et al. *Clostridium difficile* carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains. *Clin Infect Dis* 2012;55(9):1209-1215.
2. Collignon et al. Heterogeneity of *Clostridium difficile* isolates from infants. *Eur J Pediatr*. 1993;152(4):319-322.
3. Kyne et al. Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis*. 2002;34(3):346-353.
4. Loo 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. (Erratum, *N Engl J Med* 2005;354(20):2200, 2006.)
5. McDonald et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2005;353(23):2433-2441.
6. O'Brien et al. The emerging infectious challenge of *Clostridium difficile*-associated disease in Massachusetts hospitals: clinical and economic consequences. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28(11):1219- 1227.
7. Bartlett. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann Intern Med*. 2006;145(10):758-764.
8. Drudy et al. Emergence and control of fluoroquinolone- resistant, toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28(8):932-940.
9. Cohen et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010;31(5):431-455.
10. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med*. 2002;346(5):334-339.
11. Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories-5th ed. HHS Publication No. (CDC) 21- 1112. Revised Dec 2009
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline- 4th ed.
14. SN134822 Revogene<sup>®</sup> Operator's Manual.



SN134773

REV. 05/23

 Manufactured By	<p><b>Meridian Bioscience, Inc.</b>          3471 River Hills Drive          Cincinnati, OHIO - 45244 USA  <a href="http://www.meridianbioscience.com">www.meridianbioscience.com</a></p> <p><b>Contacts:</b>          Main Telephone (+1) 513.271.3700          Customer Service/Orders 800.543.1980          Technical Support Center 800.343.3858          Information Fax: 513.272.5432          Ordering Fax: 513.271.0124          E-mail: <a href="mailto:info@meridianbioscience.com">info@meridianbioscience.com</a></p>
	<p><b>Meridian Bioscience Europe, SRL</b>          Via Dell'Industria 7, 20035 Villa Cortese          (Milano) ITALY  <a href="http://www.meridianbioscience.com">www.meridianbioscience.com</a></p> <p><b>Contacts:</b>          Main Telephone (+39) 0331.433636          E-mail: <a href="mailto:info@meridianbioscience.eu">info@meridianbioscience.eu</a>          Technical Support: <a href="mailto:MBE-TechService@meridianbioscience.eu">MBE-TechService@meridianbioscience.eu</a>          Customer Service/Orders:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• For Italian Customers:  <a href="mailto:ordini@meridianbioscience.com">ordini@meridianbioscience.com</a></li> <li>• For Distributors / International Customers:  <a href="mailto:Export.CustomerService@meridianbioscience.eu">Export.CustomerService@meridianbioscience.eu</a></li> </ul> </p>
<b>AUSTRALIAN SPONSOR</b>	<p><b>Emergo Australia</b>          Level 20, Tower II          Darling Park          201 Sussex Street          Sydney, NSW 2000          Australia</p>

	<p><b>MedEnvoy Switzerland</b>          Gotthardstrasse 28          6302 Zug          Switzerland</p>
---	---

## INTERNATIONAL SYMBOLS USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:

**Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simblos, Zeichenerklärung)**

	Use-by date / Data di scadenza / Date de péremption / Fecha de caducidad / Verwendbar bis
<b>LOT</b>	Batch code / Codice di lotto / Code de lot / Código de lote / Chargennummer
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i> / Instrument de test diagnostique <i>in vitro</i> / Producto sanitario para diagnóstico <i>In vitro</i> / <i>In-vitro-Diagnostikum</i>
<b>CE</b>	CE Mark / Marcatura CE / Symbole CE / Marcado CE / CE-Kennzeichen
<b>REF</b>	Catalog number / Numero di catalogo / Référence catalogue / Referencia / Bestellnummer
	Consult instructions for use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter le mode d'emploi / Consultar las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten
	Manufacturer / Produttore / Fabricant / Fabricante / Hersteller
	Contains sufficient for <n> tests / Contiene una quantità sufficiente per <n> test / Contient le matériel suffisant pour <n> tests / Contiene la cantidad suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Tests
	Temperature limit / Limite di temperatura / Limite de température / Límite de temperatura / Temperaturgrenze
<b>EC REP</b>	Authorized representative in the European Community / Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea / Représentant agréé dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter EU-Représentant
	Do not reuse / Non riutilizzare / Ne pas réutiliser / No reutilizar / Nicht wiederverwenden
	Keep dry / Conservare all'asciutto / Conserver au sec / Mantener seco / Vor Feuchtigkeit schützen
	Contains # pouches: 1 Disposable Transfer Tool (DTT), 1 Sample Buffer Tube (SBT), 1 PIE / Contiene # buste: 1 PIE, 1 Sample Buffer Tube (SBT), 1 Disposable Transfer Tool (DTT) / Contient # sachets: Une cartouche PIE, Un tube échantillon, Un outil de transfert jetable (OTJ) / Incluye # bolsitas: 1 PIE, 1 Sample Buffer Tube (SBT), 1 Disposable Transfer Tool (DTT) / Enthält # Beutel: 1 PIE, 1 Sample Buffer Tube (SBT), 1 Disposable Transfer Tool (DTT)
	Humidity Limitation / Limitazione dell'umidità / Limite d'humidité / Limitación de humedad / Feuchtigkeitsbegrenzung
<b>Rx Only</b>	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig
	Do not use if package is damaged / Non utilizzare se la confezione è danneggiata / Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé / No utilizar si el envase está dañado / Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist
	Keep away from sunlight / Tenere lontano dalla luce del sole / Tenir à l'écart de la lumière du soleil / Mantener alejado de la luz solar / Vor Sonnenlicht schützen
24x	Contains 24 Disposable Transfer Loops (DTL) / Contiene 24 loop di trasferimento monouso (DTL) / Contient 24 boucles de transfert jetables (DTL) / Contiene 24 bucles de transferencia desecharables (DTL) / Enthält 24 Einwegübertragungsschleifen (DTL)
<b>DTT</b>	Disposable Transfer Tool (DTT) / Disposable Transfer Tool 9DTT / Un outil de transfert jetable (OTJ) / Disposable Transfer Tool (DTT) / Disposable Transfer Tool (DTT)
<b>PIE</b>	Revogene Test Device / Dispositivo Test Revogene / Dispositif de test Revogene / Dispositivo para la Prueba Revogene / Revogene-Analysegefäß
<b>EUA</b>	For Emergency Use Authorization only / Solo per l'autorizzazione per l'uso di emergenza / pour autorisation d'utilisation d'urgence uniquement / para autorización de uso de emergencia solamente / nur für Notfallverwendungsaufzierung
<b>LOOP</b>	Disposable Transfer Loop / Loop di trasferimento monouso / Boucles de transfert jetables / Bucleas de transferencia desecharables / Einwegübertragungsschleifen
<b>SBT</b>	Sample Buffer Tube / Sample Buffer Tube / Un tube échantillon / Smaple Buffer Tube / Sample Buffer Tube
	Revogene Test Device / Dispositivo Test Revogene / Dispositif de test Revogene / Dispositivo para la Prueba Revogene / Revogene-Analysegefäß
<b>CH REP</b>	Swiss Authorized Representative / Mandatario svizzero / Mandataire Suisse / Representante Autorizado Suizo / Schweizer Bevollmächtigter

For technical assistance, call Technical Support Services at 800-343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at 800-543-1980.

TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc.  
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.  
BBL is a trademark of Becton, Dickinson and Company.  
Revogene and associated logos are registered trademarks of Meridian Bioscience, Inc.  
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.  
Made in Canada

TaqMan è un marchio registrato di Roche Molecular Systems, Inc.  
ATCC è un marchio commerciale di American Type Culture Collection.  
BBL è un marchio commerciale di Becton, Dickinson and Company.  
Revogene e i loghi associate sono marchi commerciali di Meridian Bioscience, Inc.  
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.  
Prodotto in Canada.

TaqMan est une marque commerciale déposée de Roche Molecular Systems, Inc.  
ATCC est une marque commerciale de l'American Type Culture Collection.  
BBL est une marque commerciale de Becton, Dickinson and Company.  
Revogene et les logos connexes sont des marques déposées de Meridian Bioscience, Inc.  
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.  
Fabriqué au Canada.

TaqMan es una marca registrada de Roche Molecular Systems, Inc.  
ATCC es una marca comercial de American Type Culture Collection.  
BBL es una marca comercial de Becton, Dickinson and Company.  
Revogene así como los logotipos asociados son marcas comerciales de Meridian Bioscience, Inc.  
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.  
Hecho en Canadá

TaqMan ist eine eingetragene Marke von Roche Molecular Systems, Inc.  
ATCC ist eine Marke der American Type Culture Collection.  
BBL ist eine Marke von Becton, Dickinson and Company.  
Revogene und die damit verbundenen Logos sind Marken von Meridian Bioscience, Inc.  
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.  
Made in Canada.