



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 toxigenic *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 be used by trained laboratory personnel in clinical, hospital and reference laboratory settings.

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^{1,2}. 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^{3,4,5,6}.

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. Healthcare workers can spread the bacteria to other patients or contaminate surfaces through hand contact.

The epidemiology of CDI has changed over the last decade^{7,8}. Epidemic strains (BI / NAP1 / 027) of virulent *C. difficile* cause serious diseases that often require colectomy resulting in an increased mortality^{4,5}. 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 disease⁹.

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 CDI¹⁰. The efficiency and effectiveness of CDI diagnosis remains a challenge for clinicians and microbiologists.

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).

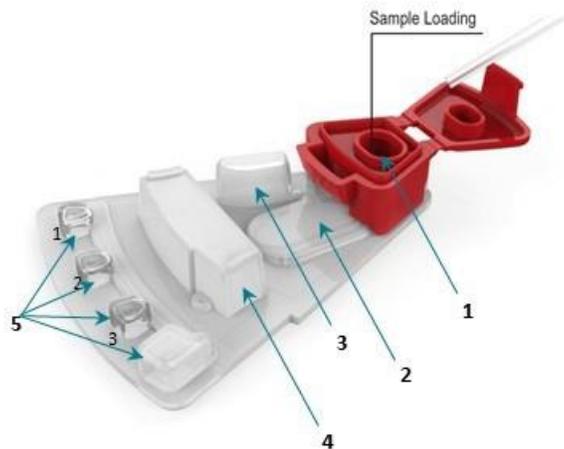


Figure 1. Top View of a PIE.
1: Sample Loading chamber, 2: Homogenization chamber, 3: Overflow chamber, 4: Dilution/Lysis chamber, 5: Three PCR wells (#1 to #3 at the left) and one waste chamber (at the right).

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:

1. 24 Disposable Transfer Loop (DTL) on the side compartment: DTL consists of a single-use 5 microliters (µL) loop for transferring the unformed (liquid or soft) stool specimen to the SBT.
2. 24 individual pouches and each pouch contains the following materials:
 - a. 1 Disposable Transfer Tool (DTT): DTT consists of a single-use transfer pipette for transferring the sample from the SBT to the PIE.
 - b. 1 Sample Buffer Tube (SBT): Barcode-labeled tube containing TE 1X buffered solution (Tris-HCl pH 8.0/EDTA, Na₂) as a dilution and preservation buffer for sample.
 - c. 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. Each PIE contains PrC, PrC-specific primers and TaqMan® chemistry-based probe, *C. difficile tcdB* gene-specific primers and Taqman® chemistry-based probe, dNTPs, buffer and DNA polymerase.

MATERIALS/EQUIPMENTS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Revogene® (cat# 610210)
2. Disposable gloves; powderless
3. Vortex mixer with a maximal speed of at least 3 200 rpm
4. Sample rack (cat# 132539; optional)
5. MOCK PIE (cat# 610210; 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 DTL, DTT and *C. difficile* PIE are used to process one sample. Do not reuse DTL, 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 Laboratories¹¹ and in CLSI Document M29-A4¹².
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.

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.
3. Inoculated SBT can be stored at 25 C for up to 2 days, or at 2-8 C for up to 3 days.
4. Store the *C. difficile* kit at 2-25 C. The expiration date is indicated on the box kit's label.
5. 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.

NOTE 2: The content of one pouch is required for each specimen to be tested.

SBT PREPARATION

1. For each specimen to be tested, unseal the right side of the pouch (when facing label) containing DTT and remove the SBT from the pouch.
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 DTL into the stool. Remove any excess of soft stool present on the outside of the loop in order to take approximately 5 µL.
4. Remove the cap from the SBT, shake the DTL 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: Processing one sample at a time:

8. Vortex the SBT for 15 seconds at maximal speed.
9. Unseal the left side of the pouch (when facing label) containing the PIE, removing it from the pouch.
10. Place the *C. difficile* PIE on the Sample rack, if used.
11. Using the DTT, 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.

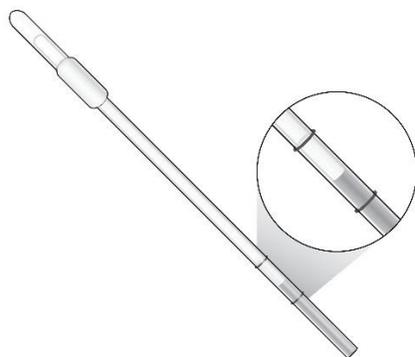


Figure 2.
Representation of an appropriate sample buffer level using the Disposable Transfer Tool (DTT).

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 Manual¹³ 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 <user name> 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 Manual¹³ 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 <user name> 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 (UNR) 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 DTL, DTT, SBT and PIE must be used for each external control preparation.

- 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.
- 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 be 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.
- 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.
- 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.

Positive External Control:

- 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 ± 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.
- Alternatively, a previously characterized stool specimen positive for toxigenic *C. difficile* could also be used as a positive external control.

Negative External Control:

- A freshly prepared cell suspension of a non-toxicogenic *C. difficile* strain from commercially available control material (e.g., ATCC® 43593™) prepared at 0.5 ± 0.05 McFarland in saline (e.g., BD BBL™ Prepared Saline Solution, cat# 221819) is recommended for use as a negative external control.
- 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	Result	Interpretation
Patient specimen		Positive	Toxigenic <i>C. difficile</i> target DNA detected.
		Negative	Toxigenic <i>C. difficile</i> target DNA not detected.
		Unresolved	Amplification/detection failure of 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 Repeat Testing Procedure section for further guidance).
		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 Repeat Testing Procedure section for further guidance).
Positive External Control		Positive	Valid positive external control result.
		Negative	A positive external control that yields a negative result is indicative of a specimen handling/preparation problem. The run is invalid. Review the specimen handling/preparation technique. Repeat testing must be performed (refer to the Repeat Testing Procedure section for further guidance).
		Unresolved	Incorrect positive external control result. The run is invalid. Repeat testing must be performed (refer to the Repeat Testing Procedure section for further guidance).
		Indeterminate	Incorrect positive external control result. The run is invalid. Repeat testing must be performed (refer to the Repeat Testing Procedure section for further guidance).
Negative External Control		Positive	A negative external control that yields a positive assay result is indicative of a specimen handling and/or contamination event. The run is invalid. Review the specimen handling technique. Repeat testing must be performed (refer to the Repeat Testing Procedure section for further guidance).
		Negative	Valid negative external control result.
		Unresolved	Incorrect negative external control result. The run is invalid. Repeat testing must be performed (refer to the Repeat Testing Procedure section for further guidance).
		Indeterminate	Incorrect negative external control result. The run is invalid. Repeat testing must be performed (refer to the Repeat Testing Procedure section for further guidance).

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The *C. difficile* assay must only be used with the Revogene by trained personnel.
- The *C. difficile* assay is not intended to differentiate carriers of *C. difficile* from those with *C. difficile* infection.
- The *C. difficile* assay does not provide susceptibility results. Culture isolates are needed for performing susceptibility testing.
- 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.
- Results from the *C. difficile* assay should be used as an adjunct to clinical observations and other information available to the physician.
- Assay results may be affected by concurrent antimicrobial therapy as *C. difficile* DNA may continue to be detected.
- A positive assay result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. It is, however, indicative for the presence of toxigenic *C. difficile* DNA.
- Erroneous assay 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 Manual¹³ and to established guidelines is necessary to avoid erroneous results.
- 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.
- Contamination or false negative results may occur if a PIE cap is incorrectly closed.
- 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.
- 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.
- Calcium Carbonate (e.g. Tums®) or Aluminum Hydroxide/Magnesium Hydroxide (e.g. Stomax®) 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 µL/mL respectively.
- Presence of *Clostridium sordellii* at a load of > 10⁵ CFU/mL of sample buffer may lead to detection of false positive results.
- A combinatory effect of *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Helicobacter pylori*, at ≥ 10⁶ CFU/mL in sample buffer, may have an inhibitory effect on the detection of toxigenic *C. difficile*.
- A combinatory effect of *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Vibrio parahaemolyticus*, at ≥ 10⁶ 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 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* assay 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	Fresh	Frozen
	N=2461	N=797	N=1664
Source of specimen			
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%)
Age Class			
< 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 the fresh specimens and in Table 3 for the 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). 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 2. 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.

Specimen Types	Site	True Positive	False Positive	False Negative	True Negative	N	Sensitivity	Specificity
Fresh	#2	14	6	2	63	85	87.5% (14/16; 95% CI: 61.7 – 98.5%)	91.3% (63/69; 95% CI: 82.0 – 96.7%)
	#3	18	2	3	135	158	85.7% (18/21; 95% CI: 63.7 – 97.0%)	98.5% (135/137; 95% CI: 94.83 – 99.8%)
	#4	6	0	1	72	79	85.7% (6/7; 95% CI: 42.1 – 99.6%)	100.0% (72/72; 95% CI: 95.0 – 100.0%)
	#5	21	5	4	115	145	84.0% (21/25; 95% CI: 63.9 – 95.5%)	95.8% (115/120; 95% CI: 90.5 – 98.6%)
	#7	16	5	7	148	176	69.6% (16/23; 95% CI: 47.1 – 86.8%)	96.7% (148/153; 95% CI: 92.6 – 98.6%)
	#9	16	2	5	131	154	76.2% (16/21; 95% CI: 52.8 – 91.8%)	98.5% (131/133; 95% CI: 94.7 – 99.8%)
Total		91	20 ^A	22 ^B	664	797		

^A Of the 20 specimens with false-positive Revogene *C. difficile* assay 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).

^B Of the 22 specimens with false-negative Revogene *C. difficile* assay 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).

Table 3. 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.

Specimen Types	Site	True Positive	False Positive	False Negative	True Negative	N	Sensitivity	Specificity
Frozen	#1	58	14	6	473	551	90.6% (58/64; 95% CI: 80.7 – 96.5%)	97.1% (473/487; 95% CI: 95.2 – 98.4%)
	#3	67	15	11	464	557	85.9% (67/78; 95% CI: 76.2 – 92.7%)	96.9% (464/479; 95% CI: 94.9 – 98.2%)
	#9	67	10	11	468	556	85.9% (67/78; 95% CI: 76.2 – 92.7%)	97.9% (468/478; 95% CI: 96.2 – 99.0%)
	Total		192	39 ^C	28 ^D	1405	1664	

^C Of the 39 specimens with false-positive Revogene *C. difficile* assay 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).

^D Of the 28 specimens with false-negative Revogene *C. difficile* assay 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).

Statistical analyses (Chi-square test) demonstrated that site poolability was not achieved for specificity and prevalence but was achieved for sensitivity.

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. Performance characteristics of the Revogene *C. difficile* assay in comparison to the direct culture method obtained with fresh stool specimens.

Specimen Types	Site	True Positive	False Positive	False Negative	True Negative	N	PPA	NPA
Fresh	#2	11	9	1	64	85	91.7% (11/12; 95% CI: 61.5 – 99.8%)	87.7% (64/73; 95% CI: 77.9 – 94.2%)
	#3	14	6	0	138	158	100.0% (14/14; 95% CI: 76.8– 100.0%)	95.8% (138/144; 95% CI: 91.2 – 98.5%)
	#4	4	2	0	73	79	100.0% (4/4; 95% CI: 39.8– 100.0%)	97.3% (73/75; 95% CI: 90.7 – 99.7%)
	#5	11	15	1	118	145	91.7% (11/12; 95% CI: 61.5 – 99.8%)	88.7% (118/133; 95% CI: 82.1 – 93.6%)
	#7	12	9	0	155	176	100.0% (12/12; 95% CI: 73.5– 100.0%)	94.5% (155/164; 95% CI: 89.8 – 97.5%)
	#9	11	7	1	135	154	91.7% (11/12; 95% CI: 61.5– 99.8%)	95.1% (135/142; 95% CI: 90.1 – 98.0%)
	Total	63	48	3	683	797		

Table 5. Performance characteristics of the Revogene *C. difficile* assay in comparison to the direct culture method obtained with frozen stool specimens.

Specimen Types	Site	True Positive	False Positive	False Negative	True Negative	N	PPA	NPA
Frozen	#1	44	28	3	476	551	93.6% (44/47; 95% CI: 82.5 – 98.7%)	94.4% (476/504; 95% CI: 92.1 – 96.3%)
	#3	58	24	3	472	557	95.1% (58/61; 95% CI: 86.3 – 99.0%)	95.2% (472/496; 95% CI: 92.9 – 96.9%)
	#9	58	19	2	477	556	96.7% (58/60; 95% CI: 88.5 – 99.6%)	96.2% (477/496; 95% CI: 94.1 – 97.7%)
		Total	160	71	8	1425	1664	

Statistical analyses (Chi-square test) demonstrated that site poolability was achieved for sensitivity, specificity and prevalence.

ANALYTICAL PERFORMANCE CHARACTERISTICS

ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity (Limit of Detection or LoD) of the CDiff 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 IIIb) 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 20th, 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 assay, 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 $\geq 10^5$ CFU/mL of SB. Nucleic acids from 6 viruses and human DNA were tested at a load of $\geq 10^5$ 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 10^5 CFU/mL of SB for one replicate out of 3, but was found non-reactive at a load of approximately 10^5 CFU/mL of SB. *Clostridium novyi* and *Clostridium scindens* strains produced false positive reactions in one replicate out of six tested at approximately 10^5 CFU/mL of SB. No reactivity was observed for three replicates tested at 10^5 CFU/mL of SB. *Enterococcus faecalis* strain produced false positive reactions in one replicate out of three tested at approximately 10^7 CFU/mL of SB. No reactivity was observed for three replicates tested at 10^5 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 7th, 2017 and August 11th, 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 bifementans</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-toxicogenic) – ATCC® 43593™	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Clostridium difficile</i> (non-toxicogenic) – 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>arizonae</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)
<i>Coxsackievirus (in silico)</i>	
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 assay, 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 toxigenic *C. difficile*-negative liquid stool matrix, and tested in duplicate in presence of either 3 750 CFU/mL of SB of the toxigenic *C. difficile* ATCC® 43255™ strain or 4 500 CFU/mL of SB of the toxigenic *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ strain, to assess their potential interference on detection of toxigenic *C. difficile* or PrC. Each organism within group was diluted to reach a load of $\geq 10^5$ 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 $\geq 10^5$ 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 toxigenic *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ strain.

Group 3 and group 5 showed a potentially inhibitory effect on detection of the toxigenic *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 toxigenic *C. difficile* negative samples and toxigenic *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 toxigenic *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 ¹	Results ²
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 ³
Antacids (Stomax®)	0,5% V/V	I ⁴
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 ²	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 ²	NI
Moist towelettes (Wet Ones®)	Square of 2 mm ²	NI
Endogenous substances		
Substance	Concentration or amount in SBT ¹	Results ²
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

¹ W/V: Weight/Volume; V/V: Volume/Volume

² I: Interference with the *C. difficile* assay; NI: No Interference with the *C. difficile* assay

³ No Interference at 0,05% W/V

⁴ 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 toxigenic *C. difficile*-negative liquid stool matrix to reach a final concentration of > 10⁷ CFU/mL of SB of the toxigenic *C. difficile* ATCC® 43255™ strain. Negative samples, prepared with the toxigenic *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

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 toxigenic *C. difficile*-negative liquid stool matrix, were tested. Two toxigenic *C. difficile* strains were used for positive samples: ATCC® 43255™ (toxintype 0, Ribotype 087) and ATCC® BAA-1805™ (toxintype 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. Negative (NEG): samples without toxigenic *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 NEG, LP and MP of toxigenic *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ strain. The overall percent agreement for LP and MP of toxigenic *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 NEG and MP of toxigenic *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ strain categories and 98,9% for LP. The overall percent agreement for LP and MP of toxigenic *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 ¹	Overall 95% CI	Ct Values ²		
		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
NEG	N/A	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	97,5%-100%	33,09	1,02	3,09

¹ For the NEG category, percent agreement was calculated for negative results.

² For the LP and MP categories, Ct values reported are for the toxigenic *C. difficile* target. For the NEG 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 ¹	Overall 95% CI	Ct Values ²		
		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
NEG	N/A	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	97,5%-100%	33,21	0,90	2,71

¹ For the NEG category, percent agreement was calculated for negative results.

² For the LP and MP categories, Ct values reported are for the toxigenic *C. difficile* target. For the NEG category, Ct values reported are for the PrC.

PRECISION

Precision study was performed on one site, by two operators, over 20 days using one *C. difficile* assay kit lot. For each sample category, 2 runs per day with 2 replicates per run were performed for a total of 80 replicates.

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™ (toxintype 0, Ribotype 087) and ATCC® BAA-1805™ (toxintype IIIb, NAP1, Ribotype 027).

Sample categories were described as follows:

1. Low Positive (LP): ATCC® 43255™ and ATCC® BAA-1805™ strains were spiked at 2 925 CFU/mL of SB
2. Moderate Positive (MP): ATCC® 43255™ and ATCC® BAA-1805™ strains were spiked at 4 500 CFU/mL of SB
3. Negative (NEG): samples without toxigenic *C. difficile* strain

Precision study results for NEG and LP of toxigenic *C. difficile* ATCC® 43255™ and *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ strains demonstrated 100% agreement. Precision study results for MP of toxigenic *C. difficile* ATCC® 43255™ and *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ strains demonstrated agreement of 98,8% (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 ¹	Overall 95% CI
LP	ATCC® 43255™	100%	96,3%-100%
	ATCC® BAA-1805™	100%	96,3%-100%
MP	ATCC® 43255™	98,8%	93,2%-100%
	ATCC® BAA-1805™	98,8%	93,2%-100%
NEG	N/A	100%	96,3%-100%

¹For the NEG category, percent agreement was calculated for negative results.

E-LABELING

Documentation related to this product can be accessed online at 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.

REF 410300

IVD Utilisation diagnostique *in vitro*

UTILISATION PRÉVUE

L'essai Revogene® 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 toxino-gène 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. Le test Revogene C. difficile est destiné à être utilisé par du personnel de laboratoire qualifié en milieu clinique, hospitalier et environnement de laboratoire.

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^{1,2}. 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 mégacolon toxique et la septicémie^{3,4,5,6}.

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 manutention.

L'épidémiologie des ICD a évolué au cours de la dernière décennie^{7,8}. Des souches épidémiques et virulentes (BI / NAP1 / O27) de *C. difficile* causent de graves maladies qui nécessitent souvent une colectomie qui entraîne un surcroît de mortalité^{4,5}. 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 maladie⁹.

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 ICD¹⁰. L'efficacité 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 PIE 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).

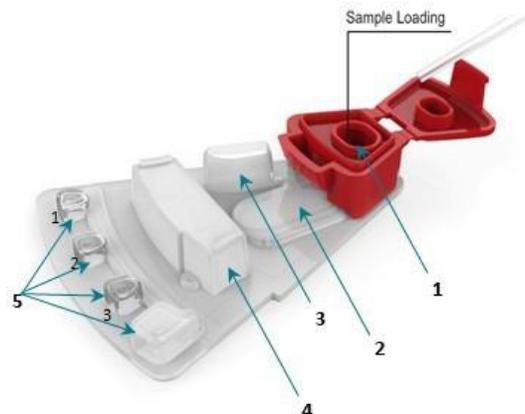


Figure 1. Vue du dessus d'un PIE.

1 : Chambre de chargement des échantillons, 2 : Chambre d'homogénéisation, 3 : Chambre de débordement, 4 : Chambre de dilution et de lyse, 5 : Trois chambres de PCR (à gauche) et une chambre réservée aux déchets (à 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 suffisamment de réactifs et de matériel pour traiter 24 échantillons. Le kit comporte les éléments suivants :

1. 24 unités de boucle de transfert jetable (BTJ) dans le compartiment de côté : La BTJ est une boucle de 5 microlitres (µL) à usage unique pour le transfert de selles non moulées (liquides ou molles) au tube échantillon.
2. 24 sachets individuels, chacun comprenant les matériaux suivants :
 - a. Une unité d'outil de transfert jetable (OTJ) : L'OTJ est une pipette à usage unique servant au transfert de l'échantillon du tube échantillon au PIE.
 - b. Un tube d'échantillon (SBT) : Le tube échantillon à code-barres contient la solution tampon TE 1X (Tris-HCl pH 8,0/EDTA.Na) qui agit comme tampon de dilution et de conservation de l'échantillon.
 - c. Un PIE C. difficile : Ce dispositif intégré à codes-barres est composé de réactifs séchés permettant de traiter les échantillons et d'effectuer de façon simultanée les étapes de PCR en temps réel pour la détection et l'amplification de l'ADN du contrôle de procédé et de l'ADN du gène codant la toxine B de *C. difficile*. Chaque PIE comprend un contrôle de procédé, une sonde basée sur la chimie Taqman® et des amorces spécifiques du contrôle de procédé, une sonde basée sur la chimie Taqman® et des amorces spécifiques du gène *tcdB*, des dNTP, un tampon et de l'ADN polymérase.

MATÉRIEL/ÉQUIPEMENT REQUIS MAIS NON FOURNI

1. Revogene® (réf. cat. 610210)
2. Gants jetables, non poudrés
3. Agitateur-mélangeur vortex à vitesse maximale de 3 200 T/M
4. Porte-échantillons (réf. cat. 132539, facultatif)
5. MOCK PIE (réf. cat. 610208, facultatif)

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Ce produit doit être utilisé sur l'instrument Revogene uniquement.
2. N'utilisez pas le kit si l'étiquette qui scelle l'emballage externe est brisée à l'arrivée.
3. N'utilisez pas les PIEs C. *difficile* si les sachets de protection sont ouverts ou brisés à l'arrivée.
4. N'alternez pas les OTJ, les tubes échantillon et les PIEs entre les lots de kits.
5. Chaque BTJ, OTJ ou PIE à usage unique permet de traiter un échantillon à la fois. Ne réutilisez pas une BTJ, un OTJ ou un PIE usagé.
6. 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 Laboratories¹¹ et le document CLSI M29-A4¹².
7. Portez des gants non poudrés jetables lorsque vous manipulez les échantillons et bien se lavez les mains ensuite.
8. 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.
9. Mettez au rebut le matériel et les réactifs inutilisés et les déchets (y compris les PIEs utilisés) conformément à la réglementation de votre pays, de votre État, de votre province ou de votre municipalité.
10. N'ouvrez et ne détruisez pas le PIE après utilisation pour éviter toute contamination par les produits de l'amplification ou les particules infectieuses.
11. N'utilisez pas un PIE ayant subi une chute ou ayant été secoué ou retournée une fois l'échantillon chargé sous peine de fausser les résultats.
12. L'analyse C. *difficile* ne produit pas de résultats de sensibilité. La mise en culture et les tests de sensibilité nécessitent plus de temps.
13. N'utilisez pas de kits dont la date de péremption est dépassée.
14. Ne mettez pas le PIE chargé au réfrigérateur.
15. Une quantité de selles au-delà de la quantité recommandée peut empêcher la réalisation de l'analyse C. *difficile*.
16. Il doit y avoir huit PIEs dans le carrousel Revogene pour chaque analyse, afin de maintenir l'équilibre thermodynamique et mécanique durant le test.

CONSERVATION ET STABILITÉ

1. Pendant le transport, les échantillons prélevés doivent être conservés à une température comprise entre 2 C et 25 C.
2. Les échantillons de selles peuvent être conservés à 25 C pendant 2 jours maximum ou entre 2 et 8 C pendant 4 jours maximum.
3. Les SBT 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.
4. Conservez le kit C. *difficile* à une température comprise entre 2 et 25 C. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du kit.
5. 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

PRÉLÈVEMENT ET TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

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.

1. Transférez les selles liquides ou molles (sans urine) dans le flacon. Évitez de mélanger l'échantillon avec du papier hygiénique, de l'eau ou du savon.
2. 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**).

PRÉPARATION ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS

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

REMARQUE 2 : Le contenu d'un sachet est nécessaire pour chaque échantillon à tester.

PRÉPARATION DU TUBE ÉCHANTILLON

1. Pour chaque échantillon à tester, décachetez le côté droit du sachet (lorsque vous regardez l'étiquette) contenant l'OTJ et le tube échantillon et retirez le tube échantillon du sachet.
2. Identifier le tube échantillon à l'aide d'une étiquette portant l'identification appropriée sans masquer ni écrire sur les codes-barres. Placez le tube échantillon sur le porte-échantillons, le cas échéant.
3. Mélangez l'échantillon dans l'agitateur-mélangeur vortex à vitesse maximale pendant 15 secondes. Plongez la BTJ fournie dans les selles. Retirez toute quantité de selles molles débordant de la boucle pour prélever environ 5 µl.
4. Retirez le bouchon du tube échantillon, secouez la BTJ 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.
5. Fermez bien le bouchon du tube échantillon et placez ce dernier sur le porte-échantillons (si vous en utilisez un).
6. Préparez les échantillons supplémentaires à tester en répétant les étapes 1 à 5, puis passez à l'étape 7.
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 : Traitez un échantillon à la fois :

8. Mélangez le tube échantillon pendant 15 secondes à vitesse maximale.
9. Décachetez le côté gauche du sachet (lorsque vous regardez l'étiquette) contenant le PIE et retirez celle-ci du sachet.
10. Placez le PIE C. *difficile* sur le porte-échantillons, le cas échéant.
11. À l'aide de l'OTJ, transférez le contenu du tube échantillon en pressant la poire. Le niveau de liquide dans l'OTJ doit se situer entre les deux marques (**figure 2**). Si le niveau de 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.
12. Placez tout le contenu de l'OTJ dans la chambre de chargement de l'échantillon de la PIE (**figure 1**).
13. 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.
14. Répétez les étapes 8 à 13 pour les autres échantillons, puis passez à l'étape 15.
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**.

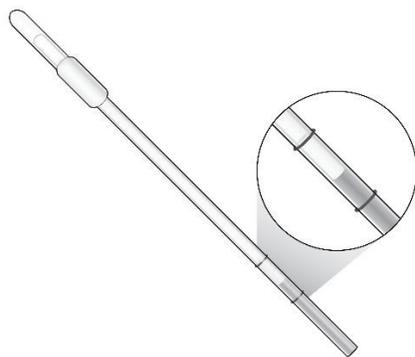


Figure 2.
Représentation du niveau approprié du tube échantillon à l'aide de l'outil de transfert jetable (OTJ).

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'utilisation¹³ du Revogene.

1. Mettez le Revogene sous tension (s'il ne l'est pas déjà). Le logiciel se lance automatiquement.
2. 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.
3. Appuyez sur **<Configuration de l'exécution>**.
4. 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>**.
5. 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 SBT 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.
6. (Facultatif) Appuyez sur l'icône **crayon** de la ligne **<Ajouter des commentaires>** et entrez un commentaire.
7. 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*.
8. 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.
9. 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>**.
10. Balayez l'anneau de rétention et installez-le dans le carrousel. Fermez le couvercle de l'instrument.
11. Lancez le test en appuyant sur **<Démarrer>**.

*En l'absence de MOCK PIE, utilisez des PIEs d'essai inutilisées remplies d'une solution tampon non inoculée (BLANC) ou de contrôles externes.

AFFICHAGE ET EXPORTATION DES RÉSULTATS

REMARQUE 1 : Pour de plus amples renseignements sur l'acquisition des résultats de test, reportez-vous au manuel d'utilisation¹³ du 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.

RÉPÉTER LE TEST

RÉSULTATS NON RÉSOLUS OU INDÉTERMINÉS OBTENUS POUR UN ÉCHANTILLON

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

RÉSULTAT NON RÉSOLU, INDÉTERMINÉ, FAUX NÉGATIF OU FAUX POSITIF POUR UN CONTRÔLE EXTERNE

Lorsqu'un résultat non résolu, indéterminé, 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 SBT 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**.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

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 BTJ, des OTJ, 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 dans chaque environnement de laboratoire.
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 toxigène 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'étalon 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 toxigène 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 toxigène 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'étalon 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 toxigène à *C. difficile* peut également être recommandé comme contrôle négatif.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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

Échantillon	Symbole	Résultat	Interprétation
Échantillon patient		Positif	ADN cible de <i>C. difficile</i> toxigène détecté.
		Négatif	ADN cible de <i>C. difficile</i> toxigène non détecté.
		Non résolu	Erreur d'amplification/de détection pour le contrôle de procédé ainsi que pour l'ADN cible de <i>C. difficile</i> toxigène. 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. L'analyse n'est pas valide. 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. L'analyse n'est pas valide. 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. L'analyse n'est pas valide. 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. L'analyse n'est pas valide. 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. L'analyse n'est pas valide. 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. L'analyse n'est pas valide. Il convient de répéter les tests (reportez-vous à la section Répéter le test pour obtenir d'autres directives).

LIMITES DE LA PROCÉDURE

- L'analyse *C. difficile* ne peut être utilisée sur l'instrument Revogene que par du personnel qualifié.
- 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*.
- L'analyse *C. difficile* ne produit pas de résultats de sensibilité. Des isolats de prélèvement sont nécessaires pour réaliser des tests de sensibilité.
- 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.
- 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.
- Les résultats du test pourraient être altérés par un traitement antimicrobien concomitant, car le test pourrait toujours détecter l'ADN de *C. difficile*.
- 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* toxigène.
- Les résultats des tests peuvent être faussés par un prélèvement, une manipulation ou une conservation inadéquates 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'utilisation¹³ du Revogene ou les directives établies.
- 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.
- 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.
- Bien qu'on ne connaisse aucune souche ni aucun isolat de *C. difficile* toxigène dépourvu du gène *tcdB*, la présence d'une telle souche produirait un résultat erroné (faux négatif) avec l'analyse *C. difficile*.
- Les mutations ou polymorphismes des sites de liaison des amorces (ou sondes) peuvent influencer sur la détection des variantes du gène *tcdB* de *C. difficile*, donnant lieu à un faux négatif dans le cadre de l'analyse 0. *C. difficile*.
- Le carbonate de calcium (p. ex., Tums®) et l'hydroxyde d'aluminium/hydroxyde de magnésium (p. ex., Stomax®) peuvent inhiber la détection des souches toxigènes 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.
- La présence de *Clostridium sordellii* à une charge de > 10⁵ UFC/mL dans le tampon d'échantillon peut entraîner la détection de faux positifs.
- L'effet combiné de *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae subsp. cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* O157:H7 et *Helicobacter pylori* à ≥ 10⁶ UFC/mL dans le tampon d'échantillon peut avoir un effet inhibiteur sur la détection des souches toxigènes de *C. difficile*.
- L'effet combiné de *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, *Streptococcus agalactiae* et *Vibrio parahaemolyticus* à ≥ 10⁶ UFC/mL dans le tampon d'échantillon peut avoir un effet inhibiteur sur la détection des souches toxigènes 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 répondaient à tous les critères d'inclusion et ne répondaient à aucun critère d'exclusion, 333 se sont avérés positifs selon les résultats combinés d'une culture toxigène 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 toxigène 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 répondaient aux critères d'inclusion de l'étude et ne répondaient 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 toxigène 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 toxigène comprenait une culture directe et enrichie, suivie d'une analyse de la cytotoxicité. La méthode de culture directe consistait à transférer un écouvillon d'échantillon de selles d'un milieu de transport anaérobie à un milieu anaérobie sélectif préréduit (milieu CCFA [gélose cyclosérine-céfoxitine-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* au plan morphologique (c.-à-d. apparence de verre cassé de couleur jaune et odeur d'étable) a été confirmée par un test d'aéro-intolérance sur des géloses chocolatées et dans une boîte de gélose au sang dans des conditions anaérobies.

Une fois les colonies identifiées, une deuxième boîte de gélose au sang contenant un disque de vancomycine (5 µg) et une boucle d'inoculation ont été utilisées 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 écouvillon utilisé pour inoculer la plaque CCNA a été utilisé pour inoculer un bouillon de cyclosérine-céfoxitine-mannitol avec un tube de taurocholate et lysosyme (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 toxigène 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 toxigène 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 Revogène *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 Revogène *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 Revogène *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	Selles congelées
	N = 2 461	N = 797	N = 1 664
Source des échantillons			
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 %)
Groupe d'âge			
< 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 Revogène *C. difficile* par rapport aux résultats combinés des cultures toxigènes 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 toxigène directe, la culture toxigène enrichie et l'essai Revogène *C. difficile*. Parmi les 2 461 échantillons, 333 se sont avérés positifs selon les résultats combinés d'une culture toxigène 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 de 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**). Les caractéristiques de performance du test *C. difficile* obtenu avec les échantillons de selles congelées ont démontré une sensibilité de 87,3 % (192/220; IC 95%: 82,1 - 91,4%) et une spécificité de 97,3 % (1405/1444; IC 95%: 96,3 - 98,1%) en comparaison à la méthode de référence (**tableau 3**).

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

Types de spécimen	Centre	Vrai Positive	Faux Positive	Faux Négative	Vrai Négative	N	Sensibilité	Spécificité
Frais	#2	14	6	2	63	85	87.5% (14/16; 95% CI: 61.7 – 98.5%)	91.3% (63/69; 95% CI: 82.0 – 96.7%)
	#3	18	2	3	135	158	85.7% (18/21; 95% CI: 63.7 – 97.0%)	98.5% (135/137; 95% CI: 94.83 – 99.8%)
	#4	6	0	1	72	79	85.7% (6/7; 95% CI: 42.1 – 99.6%)	100.0% (72/72; 95% CI: 95.0 – 100.0%)
	#5	21	5	4	115	145	84.0% (21/25; 95% CI: 63.9 – 95.5%)	95.8% (115/120 95% CI: 90.5 – 98.6%)
	#7	16	5	7	148	176	69.6% (16/23; 95% CI: 47.1 – 86.8%)	96.7% (148/153; 95% CI: 92.6 – 98.6%)
	#9	16	2	5	131	154	76.2% (16/21; 95% CI: 52.8 – 91.8%)	98.5% (131/133; 95% CI: 94.7 – 99.8%)
Total	91	20 ^a	22 ^b	664	797			

^a Parmi les 20 échantillons ayant produit des résultats faux positifs avec l'essai Revogène *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).

^b Parmi les 22 échantillons ayant produit des résultats faux négatifs avec l'essai Revogène *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).

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

Types de spécimen	Centre	Vrai Positive	Faux Positive	Faux Négative	Vrai Négative	N	Sensibilité	Spécificité
Congelé	#1	58	14	6	473	551	90.6% (58/64; 95% CI: 80.7 – 96.5%)	97.1% (473/487; 95% CI: 95.2 – 98.4%)
	#3	67	15	11	464	557	85.9% (67/78; 95% CI: 76.2 – 92.7%)	96.9% (464/479; 95% CI: 94.9 – 98.2%)
	#9	67	10	11	468	556	85.9% (67/78; 95% CI: 76.2 – 92.7%)	97.9% (468/478; 95% CI: 96.2 – 99.0%)
	Total	192	39 ^c	28 ^d	1405	1664		

^c Parmi les 39 échantillons ayant produit des résultats faux positifs avec l'essai Revogène *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).

^d Parmi les 28 échantillons ayant produit des résultats faux négatifs avec l'essai Revogène *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).

Les analyses statistiques (test du chi carré) ont démontré que la mise en pool des sites n'a pas été atteinte pour la spécificité et la prévalence mais a été atteinte pour la sensibilité.

COMPARAISON AVEC LA CULTURE DIRECTE

La performance clinique de l'essai Revogène *C. difficile* par rapport aux résultats combinés des cultures toxigènes 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 de l'essai Revogène *C. difficile* par rapport aux résultats de la méthode de culture directe à partir de selles fraîches.

Types de spécimen	Centre	Vrai Positive	Faux Positive	Faux Négative	Vrai Négative	N	% concordance positif	% concordance négatif
Frais	#2	11	9	1	64	85	91.7% (11/12; 95% CI: 61.5 – 99.8%)	87.7% (64/73; 95% CI: 77.9 – 94.2%)
	#3	14	6	0	138	158	100.0% (14/14; 95% CI: 76.8 – 100.0%)	95.8% (138/144; 95% CI: 91.2 – 98.5%)
	#4	4	2	0	73	79	100.0% (4/4; 95% CI: 39.8 – 100.0%)	97.3% (73/75; 95% CI: 90.7 – 99.7%)
	#5	11	15	1	118	145	91.7% (11/12; 95% CI: 61.5 – 99.8%)	88.7% (118/133; 95% CI: 82.1 – 93.6%)
	#7	12	9	0	155	176	100.0% (12/12; 95% CI: 73.5 – 100.0%)	94.5% (155/164; 95% CI: 89.8 – 97.5%)
	#9	11	7	1	135	154	91.7% (11/12; 95% CI: 61.5 – 99.8%)	95.1% (135/142; 95% CI: 90.1 – 98.0%)
Total	63	48	3	683	797			

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

Types de spécimen	Centre	Vrai Positive	Faux Positive	Faux Négative	Vrai Négative	N	% concordance positif	% concordance négatif
Congelé	#1	44	28	3	476	551	93.6% (44/47; 95% CI: 82.5 – 98.7%)	94.4% (476/504; 95% CI: 92.1 – 96.3%)
	#3	58	24	3	472	557	95.1% (58/61; 95% CI: 86.3 – 99.0%)	95.2% (472/496; 95% CI: 92.9 – 96.9%)
	#9	58	19	2	477	556	96.7% (58/60; 95% CI: 88.5 – 99.6%)	96.2% (477/496; 95% CI: 94.1 – 97.7%)
	Total	160	71	8	1425	1664		

Les analyses statistiques (test du chi carré) ont démontré que la mise en pool des sites a été atteinte pour la sensibilité, spécificité et prévalence.

CARACTÉRISTIQUES DE LA PERFORMANCE ANALYTIQUE

SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

L'insensibilité 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 toxigène, 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 toxigènes 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 toxigènes 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 toxigènes de C. difficile ont été détectées à 3 750 UFC/mL (SB). Les souches testées sont décrites dans le **tableau 7**.

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

Souche toxigène 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 IIIb, 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 toxigènes 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 toxigènes de C. difficile.

RÉACTIVITÉ CROISÉE

La réactivité croisée du dosage 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 toxigènes 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 10⁸ UFC/mL de tampon d'échantillon. Les acides nucléiques de six virus ainsi que l'ADN humain ont été testés à une charge d'au moins 10⁵ cp/mL d'ADN ou d'ARN de tampon d'échantillon. Ces organismes ont été testés au moyen de cultures cellulaires quantifiées ou de solutions d'acide nucléique enrichies dans une matrice de selles liquides négatives pour les souches de C. difficile. Chaque organisme a été soumis à un test PCR en trois réplicats.

Dans les conditions de l'étude, Clostridium sordellii a été détecté par l'essai C. difficile à une charge d'environ 10⁸ UFC/mL de tampon d'échantillon (SB) pour un réplicat sur trois, mais a été non réactif à une charge d'environ 10⁵ 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 10⁵ UFC/mL de SB. Aucune réactivité n'a été observée pour trois réplicats testés à 10⁵ UFC/mL de SB. Une souche d'Enterococcus faecalis a produit des résultats faux positifs dans un réplicat sur trois testés à environ 10⁷ UFC/mL de SB. Aucune réactivité n'a été observée pour trois réplicats testés à 10⁵ UFC/mL de SB. Les autres organismes et les acides nucléiques se sont avérés non réactifs lors du dosage 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 bifementans</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 toxigène) – ATCC® 43593™	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Clostridium difficile</i> (non-toxigène) – 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>arizonae</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 toxigènes de *C. difficile* et ont été testés en duplicats en présence de 3 750 UFC de tampon d'échantillon de la souche toxigène de *C. difficile* ATCC® 43255™ ou de 4 500 UFC de tampon d'échantillon de la souche toxigène de *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ pour évaluer leur potentiel d'interférence dans la détection des souches toxigènes de *C. difficile* ou du contrôle de procédé. Chaque organisme a été dilué pour atteindre une charge d'au moins 10⁵ UFC/mL de tampon d'échantillon pour les bactéries et la levure et d'au moins 10⁵ 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 toxigène) – ATCC® 43593™	<i>Clostridium difficile</i> (non toxigène) – 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 10⁵ UFC/mL de tampon d'échantillon pour les bactéries et la levure et dans au moins 10⁵ 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 toxigène de *C. difficile* ATCC® BAA-1805™.

Les groupes 3 et 5 ont présenté un effet inhibiteur potentiel sur la détection de la souche toxigène de *C. difficile* ATCC® 43255™. Toutefois, lorsque chacune des bactéries de ce groupe a été testée individuellement à une charge d'au moins 10⁶ 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 toxigènes de *C. difficile* et des souches toxigènes de *C. difficile* ATCC® 43255™ et ATCC® BAA-1805™ à deux à trois fois leur LD 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 toxigènes 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 échantillon ¹		Résultats ²
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 (Préparation H®)	0,5 % V/V		AI
Antacides (Tums®)	0,5 % P/V		I ³
Antacides (Stomaax®)	0,5 % V/V		I ⁴
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 ²		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 (Métroindazole)	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 ²		AI
Lingettes humides (Wet Ones®)	Carré de 2 mm ²		AI
Substances endogènes			
Substance	Concentration ou quantité dans le tube échantillon ¹		Résultats ²
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

¹ P/V : Poids/Volume; V/V : Volume/Volume

² I : Interférence avec l'essai *C. difficile*; AI : Aucune interférence avec l'essai *C. difficile*

³ Aucune interférence à 0,05 % P/V

⁴ 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 toxigènes de *C. difficile* pour obtenir une concentration finale de > 10⁷ UFC/mL de tampon échantillon de la souche toxigène de *C. difficile* ATCC® 43255™. Des échantillons négatifs, préparés dans une matrice de selles liquides négatives pour les souches toxigènes 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 Revogène. 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 Revogène.

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

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 toxigènes de *C. difficile*, ont été testés. Deux souches toxigènes 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. Négatif (NEG) : échantillons sans souche toxigène 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 NEG, les FP et les MP de la souche toxigène de *C. difficile* ATCC® BAA-1805™. Le pourcentage de concordance global pour les FP et les MP de la souche toxigène 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 NEG et les MP de la souche toxigène 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 toxigène 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 (ÉT 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 toxigène <i>C. difficile</i> (numéro ATCC®)	Centre 1		Centre 2		Centre 3		Résultats globaux/total	Pourcentage de concordance global ¹	IC globale à 95 %	Valeurs Ct ²		
		Résultats/total	Pourcentage de concordance	Résultats /total	Pourcentage de concordance	Résultats/total	Pourcentage de concordance				Moyenne globale	ÉT	% 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
NEG	S/O	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	97,5 %-100 %	33,09	1,02	3,09

¹ Pour la catégorie NEG, le pourcentage de concordance a été calculé pour les résultats négatifs.

² Pour les catégories FP et MP, les valeurs Ct indiquées correspondent à la cible de *C. difficile* toxigène. Pour la catégorie NEG, 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 toxigène <i>C. difficile</i> (numéro ATCC®)	Lot 1		Lot 2		Lot 3		Résultats globaux/total	Pourcentage de concordance global ¹	IC globale à 95 %	Valeurs Ct ²		
		Résultats/total	Pourcentage de concordance	Résultats /total	Pourcentage de concordance	Résultats /total	Pourcentage de concordance				Moyenne globale	ÉT	% 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
NEG	S/O	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	97,5 %-100 %	33,21	0,90	2,71

¹ Pour la catégorie VNEG, le pourcentage de concordance a été calculé pour les résultats négatifs.

² Pour les catégories FP et MP, les valeurs Ct indiquées correspondent à la cible de *C. difficile* toxigène. Pour la catégorie NEG, les valeurs Ct indiquées correspondent au contrôle de procédé.

PRÉCISION

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 d'échantillon, 2 analyses par jour avec 2 répétitions par analyse ont été effectuées pour un total de 80 réplicats.

Pour chaque catégorie, tous les échantillons ont été préparés dans une matrice de selles liquides négatives pour les souches toxigènes de *C. difficile*. Deux souches toxigènes de *C. difficile* ont été utilisées pour les échantillons positifs : ATCC® 43255™ (toxintype 0, ribotype 087) et ATCC® BAA-1805™ (toxintype 111b, 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 2 925 UFC/mL de SB.
2. Modéré positif (MP) : Des souches ATCC® 43255™ et ATCC® BAA-1805™ ont été enrichies à 4 500 UFC/mL de SB.
3. Négatif (NEG) : échantillons sans souche toxigène de *C. difficile*

Les résultats de l'étude sur la précision pour les NEG et les FP des souches toxigènes de *C. difficile* ATCC® 43255™ et *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ ont démontré une concordance de 100 %. Les résultats de l'étude sur la précision pour les MP des souches toxigènes de *C. difficile* ATCC® 43255™ et *C. difficile* ATCC® BAA-1805™ ont été de 98,8 % (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 toxigènes <i>C. difficile</i>	Pourcentage de concordance global ¹	IC globale à 95 %
FP	ATCC® 43255™	100%	96,3%-100%
	ATCC® BAA-1805™	100%	96,3%-100%
MP	ATCC® 43255™	98,8%	93,2%-100%
	ATCC® BAA-1805™	98,8%	93,2%-100%
NEG	S/O	100%	96,3%-100%

¹ Pour la catégorie NEG, le pourcentage de concordance a été calculé pour les résultats négatifs.

ÉTIQUETAGE ÉLECTRONIQUE

La documentation relative à ce produit est accessible en ligne à l'adresse www.meridianbioscience.com/pi. De plus, des copies papier sont disponibles sur demande en contactant votre distributeur local ou via le numéro de téléphone indiqué sur la boîte du kit.

REFERENCES

1. Rousseau et al. 2012. *Clostridium difficile* carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains. Clin Infect Dis. 55(9):1209-1215.
2. Collignon et al. 1993. Heterogeneity of *Clostridium difficile* isolates from infants. Eur J Pediatr. 152(4):319-322.
3. Kyne et al. 2002. Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. Clin Infect Dis. 34(3):346-353.
4. Loo et al. 2005. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. N Engl J Med. 353(23):2442-2449. (Erratum, N Engl J Med 354(20):2200, 2006.)
5. McDonald et al. 2005. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med. 353(23):2433-2441.
6. O'Brien et al. 2007. The emerging infectious challenge of *Clostridium difficile*-associated disease in Massachusetts hospitals: clinical and economic consequences. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 28(11):1219-1227.
7. Bartlett. 2006. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. Ann. Intern. Med. 145(10):758-764.
8. Drudy et al. 2007. Emergence and control of fluoroquinolone-resistant, toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 28(8):932-940.
9. Cohen et al. 2010. 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. 31(5):431-455.
10. Bartlett JG. 2002. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. N Engl J Med. 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 December 2009
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline-4th ed.
13. SN134822 Revogene® Operator's Manual.

The purchase of this product grants the purchaser rights under certain Roche patents to use it solely for providing human *in vitro* diagnostic services. No general patent or other license of any kind other than this specific right of use from purchase is granted hereby.

L'achat de ce produit octroie à l'acquéreur, dans le cadre de certains brevets Roche, le droit de l'utiliser uniquement pour proposer des services de diagnostic *in vitro* humain. Aucun brevet général ni aucun autre permis de quelque sorte que ce soit, autre que ce droit précis d'utilisation octroyé par l'achat de ce produit, n'est accordé par les présentes.

SN134778

REV. 01/20



Manufactured By

Meridian Bioscience, Inc.
Corporate Office
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244 USA
Telephone: 513.271.3700
Orders/Customer Service:
800.543.1980
Technical Support Center:
800.343.3858
Information Fax: 513.272.5432
Ordering Fax: 513.271.0124

INTERNATIONAL SYMBOLS USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:
Key guide to symbols (Guide des symboles)

	Use-by date / Date de péremption
	Batch code / Code de lot
	In vitro diagnostic medical device / Instrument de test diagnostique <i>in vitro</i>
	Catalog number / Référence catalogue
	Consult instruction for use / Consulter le mode d'emploi
	Manufacturer / Fabricant
	Contains sufficient for <n> tests / Contient le matériel suffisant pour <n> tests
	Temperature limit / Limite de température
	Authorized representative in the European Community / Représentant agréé dans la Communauté européenne
	Do not reuse / Ne pas réutiliser
	Keep dry / Conserver au sec
	Contains 24 pouches: 1 Disposable Transfer Tool (DTT), 1 Sample Buffer Tube (SBT), 1 PIE / Contient 24 sachets: Un outil de transfert jetable (OTJ), Un tube échantillon, Une cartouche C Diff PIE
	Humidity Limitation / Limite d'humidité
	Do not use if package is damaged / Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé
	Keep away from sunlight / Tenir à l'écart de la lumière du soleil
	Contains 24 Disposable Transfer Loops (DTL) / Contient 24 unités de boucle de transfert jetable (BTJ)

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 800-543-1960.

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 trademarks of Meridian Bioscience, Inc.
 © 2020-01 Meridian Bioscience, Inc.
 Made 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.
 © 2020-01 Meridian Bioscience, Inc.
 Fait au Canada