

GeneXpert.
Powered By CEPHEID INNOVATION

Xpert[®] C. difficile BT

REF GXCDIFFBT-CE-10



In vitro diagnostický prostředek



301-6190, Rev. březen 2018

Copyright © Cepheid. Cepheid[®], logo společnosti Cepheid, GeneXpert[®] a Xpert[®] jsou obchodní známky společnosti Cepheid. Windows[®] je obchodní známka Microsoft Corporation.

KOUPÍ TOHOTO PRODUKTU SE NA KUPUJÍCÍHO PŘEVÁDÍ NEPŘENOSNÉ PRÁVO K JEHO POUŽÍVÁNÍ VE SHODĚ S TOUTO PŘÍLOHOU. TÍMTO SE NEUDĚLUJÍ ŽÁDNÁ DALŠÍ PRÁVA K JAKÝMKOLI JINÝM PATENTŮM, AŽ VÝSLOVNĚ, IMPLICITNĚ NEBO NA ZÁKLADĚ PRÁVNÍ PŘEKÁŽKY. KOUPI TOHOTO PRODUKTU SE DÁLE NEUDĚLUJÍ ŽÁDNÁ PRÁVA K JEHO OPAKOVANÉMU PRODEJI.

Copyright © Cepheid 2016. Veškerá práva vyhrazena.

Obsah

1. Patentovaný název	5
2. Obecný či obvyklý název.....	5
3. Předpokládané použití.....	5
4. Shrnutí a vysvětlení	5
5. Podstata testu	7
6. Činidla a přístroje.....	7
7. Upozornění a bezpečnostní opatření	8
8. Chemická nebezpečí ^{25,26}	9
8.1 Reagencie 2	9
8.2 Vzorková reagencie	9
9. Odběr a přeprava vzorků.....	9
10. Pracovní postup.....	10
10.1 Příprava kazety	10
10.2 Zahájení testu	10
10.3 Zobrazení a tisk výsledků.....	11
11. Kontrola kvality.....	12
12. Hodnocení výsledků	13
13. Důvody pro opakování testu	18
14. Postup opakování testu.....	18
15. Omezení.....	18
16. Očekávané hodnoty.....	19
17. Charakteristiky výsledků získaných testem Xpert C. difficile BT	20
17.1 Klinické hodnocení výsledků	20
17.2 Celkové výsledky.....	20
18. Analytická účinnost	23
18.1 Analytická specifita	23

18.2 Analytická citlivost.....	24
18.3 Interferenční látky	27
19 Reproducibilita	28
20 Odkazy	30
21 Tabulka symbolů.....	32

Xpert[®] C. difficile BT

Zařízení pro lékařskou diagnostiku *In Vitro*

1. Patentovaný název

Xpert[®] C. difficile BT

2. Obecný či obvyklý název

Test Xpert[®] C. difficile BT

3. Předpokládané použití

Test Xpert C. difficile BT prováděný s pomocí přístrojů GeneXpert[®] firmy Cepheid je kvalitativní diagnostický *in vitro* test pro rychlou identifikaci C. difficile *tcdB* (genu toxinu B), *cdt* (genu binárního toxinu) a delece nukleotidu v pozici 117 genu *tcdC* z odpovídajících (tekutých či měkkých) vzorků stolice od pacientů potenciálně infikovaných bakterií *Clostridium difficile* (CDI). Test Xpert C. difficile BT má sloužit jako pomůcka při diagnóze CDI a zjišťování zdravotních poškození potenciálně souvisejících s vážnějšími chorobami. Test využívá automatizovanou real-time PCR (PCR, polymerase chain reaction) probíhající v reálném čase pro detekci *tcdB*, *cdt* a deleci báze v genu *tcdC*, na pozici 117 asociovanou s kmenem ribotypu 027. Binární toxin je produkován omezeným počtem kmenů C. difficile, včetně kmene 027. Binární toxin společně s detekcí *tcdB* je často ukazatelem závažnějšího onemocnění nebo častější recidivy onemocnění. Izoláty C. difficile, které jsou negativní pro *tcdB*, ale obsahují jen geny pro binární toxin, mohou vyvolat příznaky podobné toxigenním kmenům C. difficile, ale v současnosti je klinický význam těchto kmenů nejasný. Souběžná kultivace kultury je nutná, jen pokud je nezbytná další typizace organismů.

4. Shrnutí a vysvětlení

Clostridium difficile je gram-pozitivní, sporulující anaerobní bakterie, jejíž spojitost s onemocněním byla poprvé prokázána v r. 1978.¹

Projevy infekce bakterií *Clostridium difficile* (CDI) mohou být různé: od slabých průjmů až po těžké pseudomembranózní kolitidy ohrožující život.² Vyvinutá mikroflóra tlustého střeva u zdravého dospělého je obvykle rezistentní vůči kolonizaci bakterií C.difficile.³ Avšak tato rezistence se ztrácí, jestliže je normální mikroflóra tlustého střeva pozměněná. Nejběžnějším rizikovým faktorem je užívání antibiotik.⁴ Primárním faktorem virulence bakterie C. difficile je cytotoxin B.⁵ Geny kódující toxin A (*tcdA*; enterotoxin) a toxin B (*tcdB*) se nacházejí v místě patogenicity (PaLoc).^{6,7} Nejvíce patogenní kmeny jsou kmeny produkující toxin A i toxin B (A+B+), i když různé izoláty produkující pouze toxin B (A-B+) byly také patogenní.⁸ Některé kmeny C. difficile produkují také aktin-specifickou ADP-ribosyltransferázu nazývanou CDT nebo binární toxin. Lokus binárního toxinu obsahuje dva geny (*cdtA* a *cdtB*) a je umístěn mimo místo PaLoc.⁹⁻¹¹

Diagnostika CDI se tradičně zakládala buď na detekci toxinu B přímo ve stolici (test neutralizace cytotoxicity buněčné kultury (cell culture cytotoxicity neutralization [CCCN] test), nebo na kultivaci organismů, v jejichž kultuře se na izolovaných vzorcích následně určuje produkce toxinu B. Jak test CCCN, tak kultivace toxigenních kultur jsou pracovně náročné, ale díky specifičnosti prvního a citlivosti druhého se stále pokládají za „zlatý standard“^{12,13}

Pro detekci toxinu A a B bylo vyvinuto několik rychlých enzymatických imunotestů. Tyto testy však ve srovnání s testem CCCN vykazují sníženou citlivost a specifitu. Pro detekci genů spojených s produkcí toxinu A a/nebo B byly proto vyvinuty metody PCR, které mají vysokou citlivost a specifitu i ve srovnání s analýzou buněčné cytotoxicity a imunotesty.¹⁴

Nejnovější literatura dokazuje, že vážnost nemoci a její výsledek souvisí nejen s výskytem toxinu A a B, ale rovněž s produkcí binárního toxinu. Bauer et al.¹⁵ uvádí, že v Evropě se při CDI vyskytují binárně toxigenní geny v toxigenních izolátech ve 23 % případů. Binární toxin produkovaný geny *cdt* je často pozorován u kmenů *C. difficile* spojených se zvýšenou vážností CDI. Binární toxin patří do skupiny ADP-ribosylátových toxinů a sestává z genů *cdtA*, enzymatické ADP-ribosyltransferázy, která modifikuje aktin, a *cdtB*, který váže hostitelské buňky a přemísťuje produkt *cdtA* do cytosolu. Četné klinické studie naznačují spojení mezi přítomností binárně toxických genů v *C. difficile* a zvýšením 30denní úmrtnosti CDI nezávisle na ribotypu PCR. Existuje rovněž literatura ukazující, že lidé trpící vážnými formami CDI, fulminantní kolitidou nebo recidivami CDI jsou častěji nakaženi ribotypy *C. difficile* nesoucími geny pro produkci binárního toxinu (*cdtA/cdtB*) než pacienti bez těchto komplikací.^{16,17}

Podsoubor izolátů produkujících binární toxin má mutace v genu *tcdC* (*negative toxin regulator*), tj. delecí v nukleotidu 117 (*tcdCΔ117*) konzistentní s kmeny ribotypu 027. Infekce způsobená kmeny 027/NAP1/BI může být spojena s vyšší mírou úmrtnosti a patologií, včetně pobytu na jednotce intenzivní péče a prodlouženého pobytu v nemocnici. Rozmanité analýzy dokázaly významné spojení mezi vážností nemoci a výskytem ribotypů nesoucích gen binárního toxinu s delecí na nukleotidu 117 i bez ní. V průběhu několika posledních let propuklo několik epidemií CDI připisovaných několika „hypervirulentním“ kmenům, včetně kmenů rezistentním vůči fluorochinolonu, které náležely k PCR ribotypu 027 (jež jsou rovněž známy jako, skupina PFGE typu NAP1 a skupina REA typu BI).^{8,18} Kmeny 027 mohou vykazovat zvýšenou produkci toxinu, za níž jsou zodpovědné delecce v regulačním genu *tcdC*, a mohou produkovat více spor, což zvyšuje jejich schopnost přetrvávat v životním prostředí.^{19,20} Předpokládaný pozitivní výsledek testu výskytu 027 může pomoci v identifikaci možných zdrojů nákazy.

Dodatečné studie uvádějí rovněž případy pacientů s průjmem a s podezřením na infekci *C. difficile* způsobenou toxinotypem XI/PCR ribotypu 033 nebo mu podobnými kmeny, které byly pozitivní na binární toxin, ale negativní na toxin A a B.^{21,22} Klinický význam těchto kmenů pozitivních na binární toxin a negativních na toxin B ještě není plně objasněn.

5. Podstata testu

Systém GeneXpert automatizuje a integruje přípravu vzorku, čištění a amplifikaci nukleové kyseliny a detekci cílové sekvence v jednoduchých nebo komplexních vzorcích za použití RT-PCR analýzy. Systém obsahuje přístroj, osobní počítač s instalovaným softwarem pro testování shromážděných vzorků a hodnocení výsledků. Systém vyžaduje použití jednorázových GeneXpert kazet, které obsahují činidla pro PCR a v nichž probíhají procesy extrakce, amplifikace a detekce DNA. Jelikož jsou kazety samostatné a uzavřené, nehrozí nebezpečí vzájemné kontaminace vzorků. Úplný popis systémů je uveden v operačním manuálu systému GeneXpert Dx (*GeneXpert Dx System Operator Manual* resp. *GeneXpert Infinity Systém Operator Manual*).

Xpert *C. difficile* BT analýza obsahuje reagenty k detekci kmenů *C. difficile* produkujících toxin a také kontrolu zpracování vzorků (Sample Processing Control – SPC). SPC kontroluje správné zpracování cílové bakterie a sleduje přítomnost inhibitorů PCR reakce. Kontrolní systém sondy (Probe Check Control – PCC) ověřuje rehydrataci reagentů, náplň PCR zkumavky v kazetě, neporušenost sondy a stabilitu barviva.

Primery a sondy použité v analýze Xpert *C. difficile* BT detekují sekvence v genech kódujících toxin B (*tcdB*), binární toxin (*cdt*) a *tcdA*117.

6. Činidla a přístroje

Dodaný materiál

Sada Xpert *C. difficile* BT obsahuje dostatek činidel k analýze 10 vzorků nebo kontrol kvality.

Sada obsahuje následující činidla:

Kazeta s integrovanými reakčními zkumavkami pro Xpert <i>C.difficile</i> BT analýzu	10
částice 1, částice 2, částice 3 (mražené-sušené)	od každé 1 na kazetu
Reagencie 1	3,0 ml na kazetu
Reagencie 2 (hydroxid sodný)	3,0 ml na kazetu

Xpert <i>C. difficile</i> BT reagentie v balení	10
Sample Reagent (guanidinium thiokyanát)	10 x 2,0 ml v balení
CD	1 v sadě

- soubor s definicí testu
- instrukce pro import ADF do softwaru GX
- příbalový leták

Poznámka:

Listy s bezpečnostními údaji (SDS) jsou dostupné na www.cepheid.com nebo www.cepheidinternational.com pod záhlavím SUPPORT.

Poznámka:

Bovinní sérový albumin (BSA) použitý v tomto výrobku byl získán výlučně z bovinní plazmy ze zdrojů na území US. Zpracování BSA bylo také prováděno na území US. Zvířata nebyla krmena žádným proteinem přežvýkavců ani jiných zvířat; zvířata byla testována před porážkou i po ní. Během zpracování nedošlo k žádnému mísení materiálu s jinými zvířecími materiály.

Skladování a manipulace

- Kazety a reagenty Xpert *C. difficile* BT skladujte při 2-28 °C.
- Nepoužívejte činidla nebo kazety s prošlou dobou trvanlivosti.
- Neotevírejte kazetu, pokud nejste připraveni k provedení testu.
- Nepoužívejte žádná činidla, která jsou zakalená či změnila barvu.
- Nepoužívejte kazetu, která netěsní.

Potřebný materiál, který není součástí testu

- Systém GeneXpert Dx nebo Systém GeneXpert Infinity (katalogové číslo se liší v závislosti na konfiguraci): GeneXpert přístroj, počítač s autorizovaným GeneXpert Software Version 4.3 nebo vyšší, snímač čárového kódu a operační manuál.
- Tiskárna: je-li požadován tisk, kontaktujte našeho zástupce, který vám zprostředkuje nákup a instalaci doporučené tiskárny.
- Vortex
- Jednorázové sterilní pipety
- Zařízení pro sběr a přenos vzorků, například tampón, který naleznete v Cepheid Sample Collection Device (katalogové číslo firmy Cepheid 900-0370), jednorázový odběrový tampon (kat. č. SDPS-120) nebo v Copan Dual Swab a Transport Systems (139C LQ STUART)

7. Upozornění a bezpečnostní opatření

- Se všemi biologickými vzorky i s použitými kazetami zacházejte jako s potenciálními nosiči infekčních částic. Jelikož je často nemožné zjistit, který materiál je infekční, se všemi biologickými vzorky by mělo být manipulováno za použití všeobecných bezpečnostních opatření. Návod pro manipulaci se vzorky je k dispozici v amerických Centrech pro kontrolu a prevenci chorob (U.S. Centers for Disease Control and Prevention) a v Institutu klinických a laboratorních standardů (Clinical and Laboratory Standards Institute)^{18,19}.
- Dodržujte bezpečnostní předpisy stanovené vaší institucí pro práci s chemikáliemi a biologickými vzorky.
- Mějte čisté laboratorní pláště a rukavice. Mezi zpracováním jednotlivých vzorků si rukavice vyměňujte.
- Nenahrazujte činidla Xpert *C. difficile* BT jinými činidly.
- Víko kazety Xpert *C. difficile* BT otvírejte pouze v případě přidávání vzorků a činidel nebo při přenosu vzorku z původní kazety do nové kazety kvůli opakování testu.
- Nepoužívejte kazetu, která po vybalení upadla.
- S kazetou netřeste. Otřesy nebo pády kazety po otevření víka mohou být příčinou neplatných výsledků.
- Nepoužívejte kazetu, která obsahuje poškozenou reakční zkumavku.
- Nedávejte identifikační štítek vzorku na víko kazety a na čárový kód.
- Každá kazeta Xpert *C. difficile* BT k jednorázovému použití je určena k provedení jednoho testu. Upotřebenou kazetu znovu nepoužívejte.

- O správné likvidaci použitých kazet a činidel se informujte u personálu odpovědného za nakládání s odpadem ve vaší instituci. Tento materiál může vykazovat charakteristiky nebezpečného odpadu, na jehož likvidaci jsou kladeny specifické požadavky. Instituce by měly kontrolovat dodržování místních a celostátních předpisů o nakládání s nebezpečným odpadem. Použitou kazetu *Xpert C. difficile* BT likvidujte v souladu s bezpečnostními předpisy pro likvidaci nebezpečného odpadu platnými ve vaší instituci.
- V případě kontaminace pracoviště nebo prostředí vzorkem nebo kontrolními látkami důkladně vyčistěte kontaminovanou plochu roztokem chlorového bělidla pro domácnosti zředěným v poměru 1:10 a pak opakujte čištění pracovní plochy 70 % etanolem. Před dalším pokračováním vytřete pracovní povrchy dosucha.

8. Chemická nebezpečí^{25,26}

8.1 Reagencie 2

- Obsahuje hydroxid sodný
- Výstražný signál: Varování
- Charakterizace nebezpečnosti podle CLP/GHS (Globálně harmonizovaného systému klasifikace, označování a balení chemických látek): H302: Nebezpečné při požití, H315: Působí podráždění pokožky, H319: Působí vážné podráždění oční sliznice.

8.2 Vzorková reagencie

- Obsahuje guanidinium thiokyanát
- Výstražný signál: Varování
- Charakterizace nebezpečnosti podle CLP/GHS: H302: Nebezpečné při požití, H412: Nebezpečný pro vodní organizmy s dlouhodobými účinky, EUH031: Při kontaktu s kyselinami uvolňuje toxický plyn.
- Doporučená bezpečnostní opatření:
 - P264: Po manipulaci si důkladně umyjte ruce.
 - P280: Mějte ochranné rukavice/ochranu očí/ ochranu tváře.
 - P273: Zabraňte úniku do životního prostředí.
 - P303+P352: JESTLIŽE SE DOSTANE NA KŮŽI: Umyjte velkým množstvím mýdla a vody.
 - P305+P351+P338: JESTLIŽE SE DOSTANE DO OČÍ: Opatrně několik minut proplachujte vodou. Máte-li kontaktní čočky, odstraňte je, půjde-li to snadno. Pokračujte v proplachování.
 - P312: Necítíte-li se dobře, volejte tísňovou linku nebo lékaře.
 - P501: Při nakládání s obsahy a nádobami dodržujte místní a regionální/celostátní/mezinárodní předpisy.
 - P362: Sundejte kontaminované oděvy a před opětovným použitím je vyperte.
 - P321: K specifickému ošetření viz doplňkovou informaci o první pomoci.
 - P332+P313: Dojde-li k podráždění pokožky, vyhledejte radu/pomoc lékaře.
 - P337+P313: Přetrvává-li podráždění očí, vyhledejte radu/pomoc lékaře.

9. Odběr a přeprava vzorků

1. Odeberte vzorek stolice do sterilní nádoby. Dodržujte předpisy vaší instituce pro sběr vzorků na testy *C. difficile*.
2. Označte vzorek identifikačním číslem pacienta a zašlete do laboratoře k testování.

3. Vzorky skladujte při 2-8 °C. Vzorek je stabilní po dobu 5 dnů při 2 – 8 °C. Alternativně mohou být vzorky skladovány při pokojové teplotě (20-30 °C) po dobu 24 h.

10. Pracovní postup

10.1 Příprava kazety

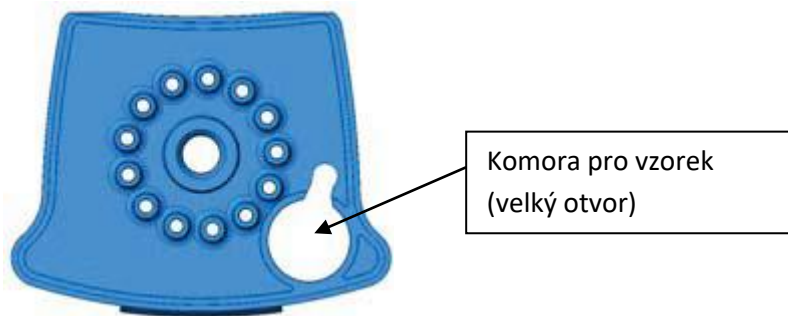
Důležité: Test zahajte do 30 minut po přidání vzorku do kazety.

Přidání vzorku do kazety (Xpert *C. difficile* BT):

1. Vyjměte kazetu a činidla z obalu.
2. Krátce omočte tampon ve vzorku stolice. Tampon nemusí být úplně nasáklý.
3. Ponořte tampon do zkumavky Sample Reagent obsahující činidlo na vzorky.

Poznámka: Použijte sterilní gázu pro snížení rizika kontaminace.

4. Držte tampon za tyčinku blízko okraje zkumavky, povytáhněte tampon několik milimetrů nad dno zkumavky a zatlačte tyčinku proti okraji zkumavky, aby se zlomila. Přesvědčte se, že je tyčinka dostatečně krátká, aby bylo možné zkumavku pevně uzavřít víčkem.
5. Uzavřete víčko a vortexujte 10 sekund při vysoké rychlosti.
6. Otevřete víko kazety. Použijte čistou pipetu a přeneste celý obsah zkumavky Sample Reagent do otvoru „S“ v kazetě Xpert *C. difficile* BT.
7. Uzavřete víko kazety.



Obrázek č. 1: Kazeta Xpert *C. difficile* BT (pohled shora)

10.2 Zahájení testu

Důležité: Před zahájením testu se ujistěte, že popis analýzy Xpert *C. difficile* BT byl vložen do počítače.

Tato část popisuje základní kroky testu. Pro podrobný návod viz operační manuál systému GeneXpert Dx nebo GeneXpert Infinity.

1. Zapněte přístrojový systém GeneXpert:
 - Používáte-li přístroj GeneXpert Dx, nejprve zapněte přístroj a pak zapněte počítač. Software GeneXpert se automaticky načte nebo může vyžadovat dvojklik na ikonu Windows® na obrazovce.

nebo

- Pokud používáte přístroj GeneXpert Infinity, zapněte přístroj. Software se načte automaticky nebo může vyžadovat dvojklik na ikonu na obrazovce.
2. Přihlaste se do software přístrojového systému GeneXpert za použití vašeho uživatelského jména a hesla.
 3. V okně systému GeneXpert klikněte na **Create Test** (GeneXpert Dx) nebo **Orders a Order Test** (Infinity). Otevře se okno **Create Test**.
 4. Naskenujte identifikační číslo pacienta (skenování není nezbytné). Pokud zadáte identifikační číslo pacienta přes klávesnici, přesvědčte se, že jste vyplnili správně. Toto číslo je přiřazeno k výsledkům testu a zobrazí se v okně View Results (zobrazení výsledků). Naskenujte identifikační číslo vzorku. Pokud zadáte identifikační číslo vzorku přes klávesnici, přesvědčte se, že jste vyplnili správně. Toto číslo je přiřazeno k výsledkům testu a zobrazí se v okně View Results (zobrazení výsledků).
 5. Naskenujte čárový kód na kazetě Xpert *C. difficile* BT. Pomocí informací z čárového kódu software automaticky vyplní následující pole: Select Assay (vybrat analýzu), Reagent Lot ID (číslo šarže činidel), Cartridge SN (výrobní č. kazety) a Expiration Date (expirační doba).
Poznámka: Pokud se čárový kód neoskenuje, opakujte test s novou kazetou. Potupujte přitom podle pokynů z části 15, Postup opakování testu.
 6. Klikněte na **Start Test** (GeneXpert Dx) nebo **Submit** (Infinity). Uveďte své heslo do dialogového okna, které se objeví.
 7. U systému GeneXpert Infinity umístěte kazetu na dopravníkový pás. Kazeta se načte automaticky, test se spustí a použitá kazeta bude vyhozena do odpadní nádoby.

nebo

Pro přístroj GeneXpert DX:

- a. Otevřete dvířka přístrojového modulu s blikajícím zeleným světlem a vložte kazetu.
- b. Zavřete dvířka. Testování je zahájeno a zelené světlo přestane blikat. Po ukončení testu světlo zhasne.
- c. Vyčkejte, až systém uvolní zámek dvířek; poté vyjměte kazetu.
- d. Použité kazety by měly být likvidovány v příslušných odpadních nádobách podle obvyklých postupů vaší instituce.

10.3 Zobrazení a tisk výsledků

V této části jsou popsány základní kroky při prohlížení a tisku výsledků. K podrobným instrukcím týkajícím se zobrazení a tisku výsledků viz operační manuál systému Gene Xpert Dx nebo GeneXpert Infinity.

11 Kontrola kvality

Každý test zahrnuje kontrolu zpracování vzorků (SPC) a kontrolu sondy (PCC).

Kontrola zpracování vzorků (**SPC**) – zajišťuje, že vzorek byl správně zpracován. SPC obsahuje spory bakterie *Bacillus globigii* ve formě suché destičky spor, která je přítomná v každé kazetě a zajišťuje odpovídající zpracování bakterií ve vzorku. SPC prověřuje, že proběhla lýza bakterií *C. difficile* (jsou-li ve vzorku přítomné) a spory a ověřuje tak, že zpracování vzorků je odpovídající. Navíc tato kontrola zjišťuje inhibici testu real-time PCR, , zajišťuje vhodné podmínky (teplotu a čas) reakce PCR, aby umožňovaly amplifikaci reakce, i funkčnost reagensů PCR. SPC by měla být pozitivní v negativních vzorcích a může být negativní či pozitivní v pozitivních vzorcích. SPC je vyhovující, pokud splní potvrzené podmínky platnosti.

Kontrola sondy (**PCC**) – před zahájením PCR reakce systém GeneXpert měří intenzitu fluorescence sondy pro kontrolu rehydratace lyofilizované kapky, naplnění reakčních zkumavek, neporušenost sondy a stability barviva. Kontrola sondy je vyhovující, pokud splní stanovené podmínky platnosti.

12. Hodnocení výsledků

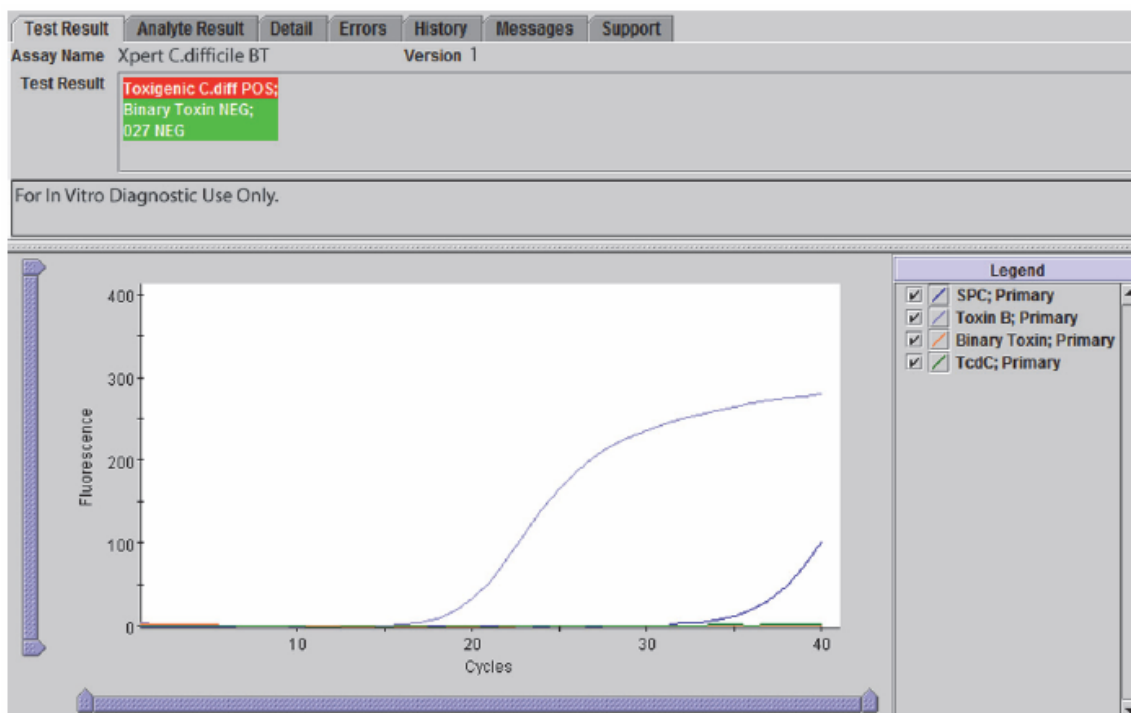
Výsledky jsou přístrojovými systémy GeneXpert interpretovány za použití uloženého algoritmu výpočtu z naměřených hodnot fluorescence a zobrazí se v okně **View Results**. Možné výsledky jsou zobrazeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Výsledky a interpretace testu Xpert *C. difficile* BT

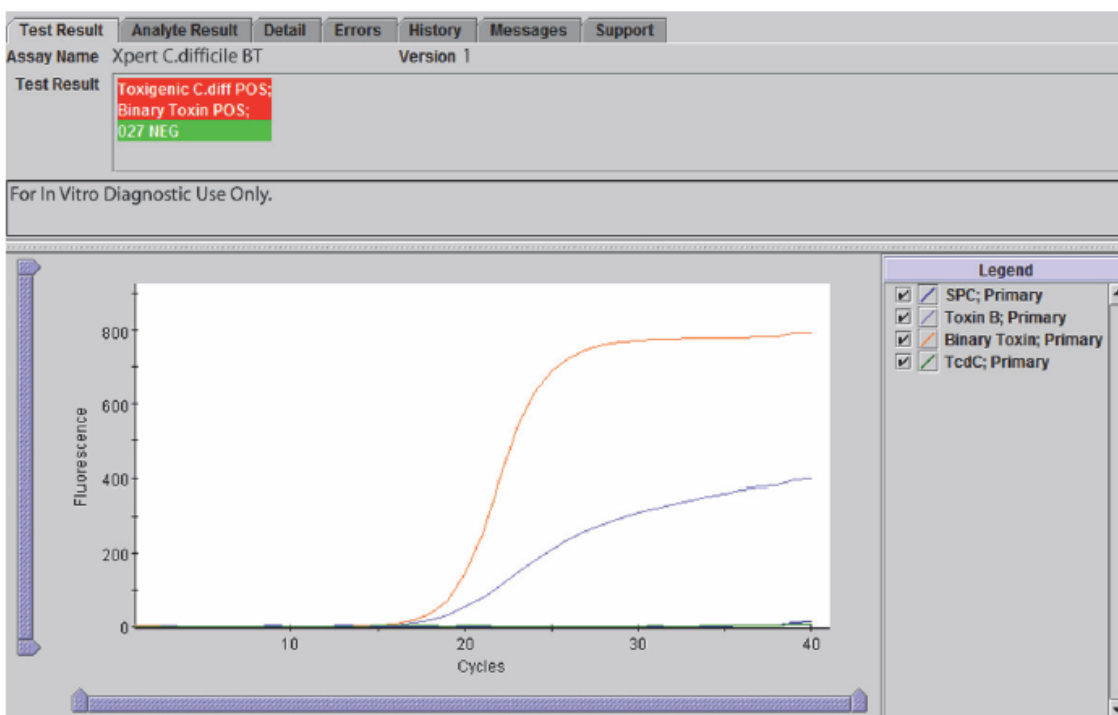
Výsledek	Interpretace
Toxigenic C. diff POS, Binary Toxin NEG, 027 NEG Viz obr. 2	Byly detekovány cílové sekvence DNA <i>C. difficile</i> produkující toxin. <ul style="list-style-type: none"> <i>C. difficile</i> produkující toxin – cílová sekvence <i>C. difficile</i> (gen toxinu B) má Ct v platném rozmezí a koncové vyhodnocení nad minimálním nastavením. Gen binárního toxinu a delece <i>tcdC</i> na 117 nejsou detekovány. SPC – NA (not applicable – nehodnotí se); SPC se pomíjí, protože amplifikace cílové sekvence <i>C. difficile</i> může konkurovat této kontrole. Probe Check (kontrola sondy) – PASS; všechny výsledky kontroly sondy jsou platné.
Toxigenic C. diff POS, Binary Toxin POS, 027 NEG Viz obr. 3	Byly detekovány cílové sekvence DNA <i>C. difficile</i> produkující toxin. <ul style="list-style-type: none"> Cílové sekvence <i>C. difficile</i> (gen toxinu B plus gen binárního toxinu) mají Ct v platném rozmezí a koncová vyhodnocení nad minimálním nastavením; delece <i>tcdC</i> na 117 není detekována. SPC – NA (not applicable – nehodnotí se); SPC se pomíjí, protože amplifikace cílové sekvence <i>C. difficile</i> může konkurovat této kontrole. Probe Check (kontrola sondy) – PASS; všechny výsledky kontroly sondy jsou platné.
Toxigenic C. diff POS, Binary Toxin POS, 027 PRESUMPTIVE POS Viz obr. 4	Byly detekovány cílové sekvence DNA bakterie <i>C. difficile</i> a předpokládaný typ 027 produkující toxin. <ul style="list-style-type: none"> Všechny cílové sekvence <i>C. difficile</i> a předpokládaný typ 027 produkující toxin (toxin B, binární toxin a delece <i>tcdC</i> na 117), mají hodnotu Ct v platném rozmezí a koncová vyhodnocení nad minimálním nastavením. SPC – NA (not applicable – nehodnotí se); SPC se pomíjí, protože amplifikace cílové sekvence <i>C. difficile</i> může konkurovat této kontrole. Probe Check (kontrola sondy) – PASS; všechny výsledky kontroly sondy jsou platné.
Toxigenic C. diff NEG, Binary Toxin POS, 027 NEG Viz obr. 5	Nebyly detekovány genové sekvence DNA <i>C. difficile</i> produkující toxin B; ale je detekována jiná sekvence (gen binárního toxinu), která má Ct v platném rozmezí a koncové vyhodnocení nad minimálním nastavením. Klinický význam izolátů pozitivních jen na binární toxin ještě není určen. <ul style="list-style-type: none"> SPC – NA (not applicable – nehodnotí se); SPC se pomíjí, protože amplifikace cílové sekvence <i>C. difficile</i> může konkurovat této kontrole. Probe Check (kontrola sondy) – PASS; všechny výsledky kontroly sondy jsou platné.
Toxigenic C. diff NEG, Binary Toxin NEG, 027 NEG	Cílové sekvence DNA <i>C. difficile</i> (gen toxinu B, gen binárního toxinu) nejsou detekovány. <ul style="list-style-type: none"> Cílové sekvence <i>C. difficile</i> produkující toxin (toxin B a binární toxin) nejsou detekovány; jiné cílové sekvence DNA pro toxigenní <i>C. difficile</i> (delece <i>tcdC</i> na 117) nejsou detekovány. SPC – PASS; SPC má Ct v platném rozmezí a koncové vyhodnocení nad minimálním

Viz obr. 6	<p>nastavením.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Probe Check (kontrola sondy) – PASS; všechny výsledky kontroly sondy jsou platné.
<p>INVALID</p> <p>Viz obr. 7</p>	<p>Přítomnost nebo nepřítomnost cílové DNA <i>C. difficile</i> nemůže být stanovena, opakujte test podle návodu v části 15, Postup opakování testu. SPC nesplňuje požadované podmínky platnosti, vzorek nebyl náležitě zpracován nebo došlo i inhibici reakce PCR.</p> <ul style="list-style-type: none"> • INVALID – Přítomnost nebo nepřítomnost cílové DNA <i>C. difficile</i> nemůže být stanovena. • SPC – FAIL; cílový výsledek SPC je negativní a Ct SPC není v platném rozmezí a koncové vyhodnocení je pod minimálním nastavením. • Probe Check (kontrola sondy) – PASS; všechny výsledky kontroly sondy jsou platné.
ERROR	<p>Přítomnost nebo nepřítomnost cílové DNA <i>C. difficile</i> nemůže být stanovena, opakujte test podle návodu v části 15, Postup opakování testu. Probe Check (kontrola sondy) selhala pravděpodobně v důsledku nesprávného naplnění reakční zkumavky, nebo byl zjištěn problém ve zkoušce integrity nebo byly překročeny limity maximálního tlaku.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Toxin B – ŽÁDNÝ VÝSLEDEK • Binární toxin – ŽÁDNÝ VÝSLEDEK • <i>tcdCΔ117</i> – ŽÁDNÝ VÝSLEDEK • SPC – ŽÁDNÝ VÝSLEDEK • Probe Check (kontrola sondy) – FAIL* (neaplikovatelná) <p>*Jestliže kontrola sondy proběhne, je chyba způsobena selháním nějaké součásti systému.</p>
NO RESULT	<ul style="list-style-type: none"> • Toxin B – ŽÁDNÝ VÝSLEDEK • Binární toxin – ŽÁDNÝ VÝSLEDEK • <i>tcdCΔ117</i> – ŽÁDNÝ VÝSLEDEK • SPC – ŽÁDNÝ VÝSLEDEK • Probe Check (kontrola sondy) – NA (neaplikovatelná)

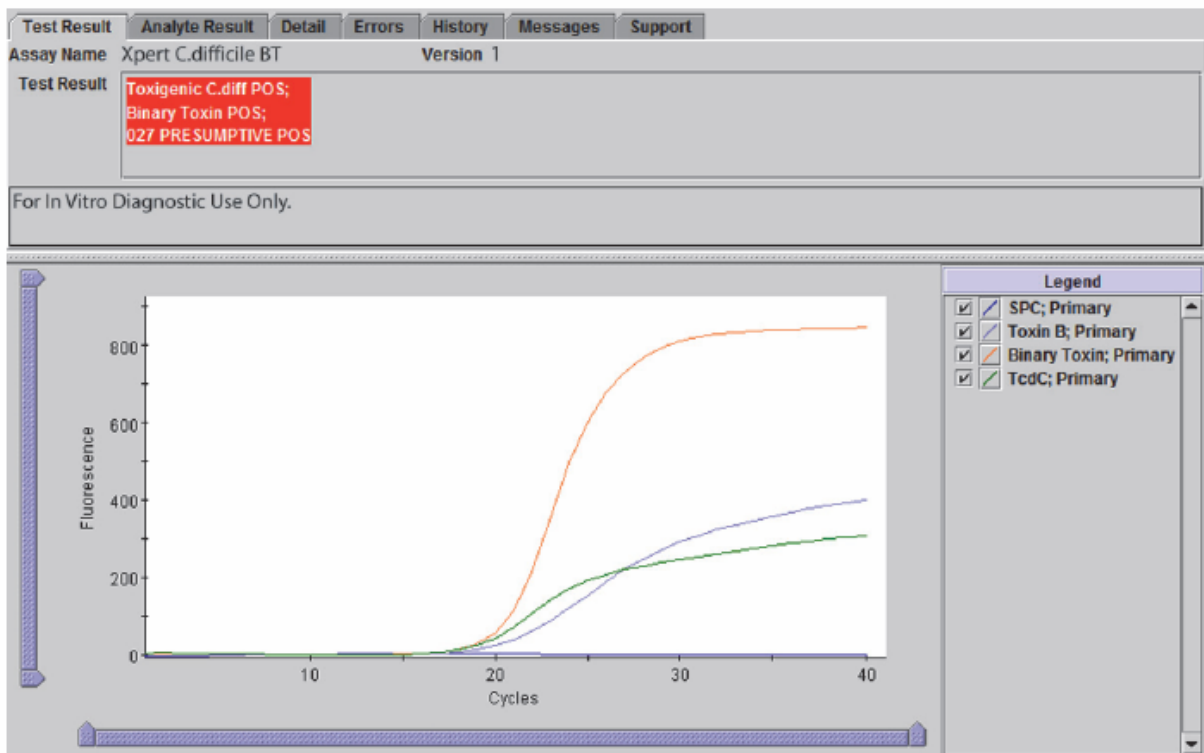
Poznámka: Ilustrace v této části (Obr. 2, Obr. 3, Obr. 4, Obr. 5, Obr. 6, Obr. 7) zobrazují monitory přístroje GeneXpert Dx řízené softwarem GeneXpert Dx.



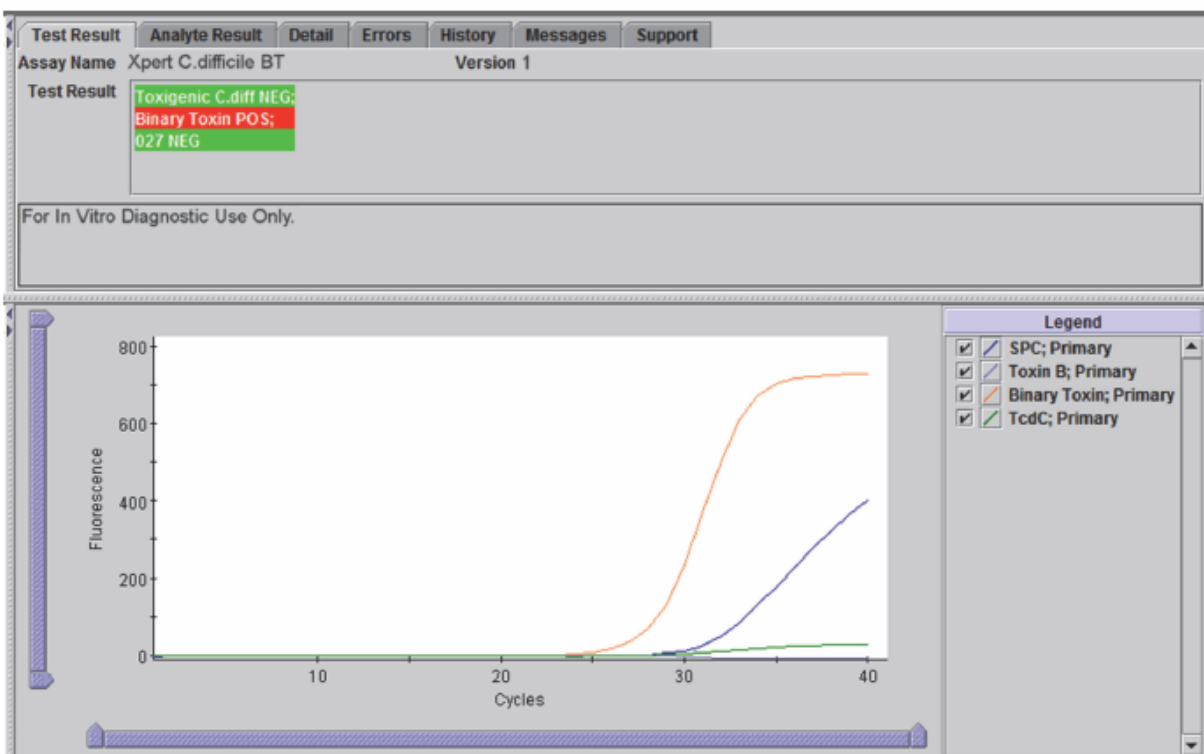
Obrázek 2: Příklad výsledků: toxigenní C. diff pozitivní, binární toxin negativní a 027 negativní.



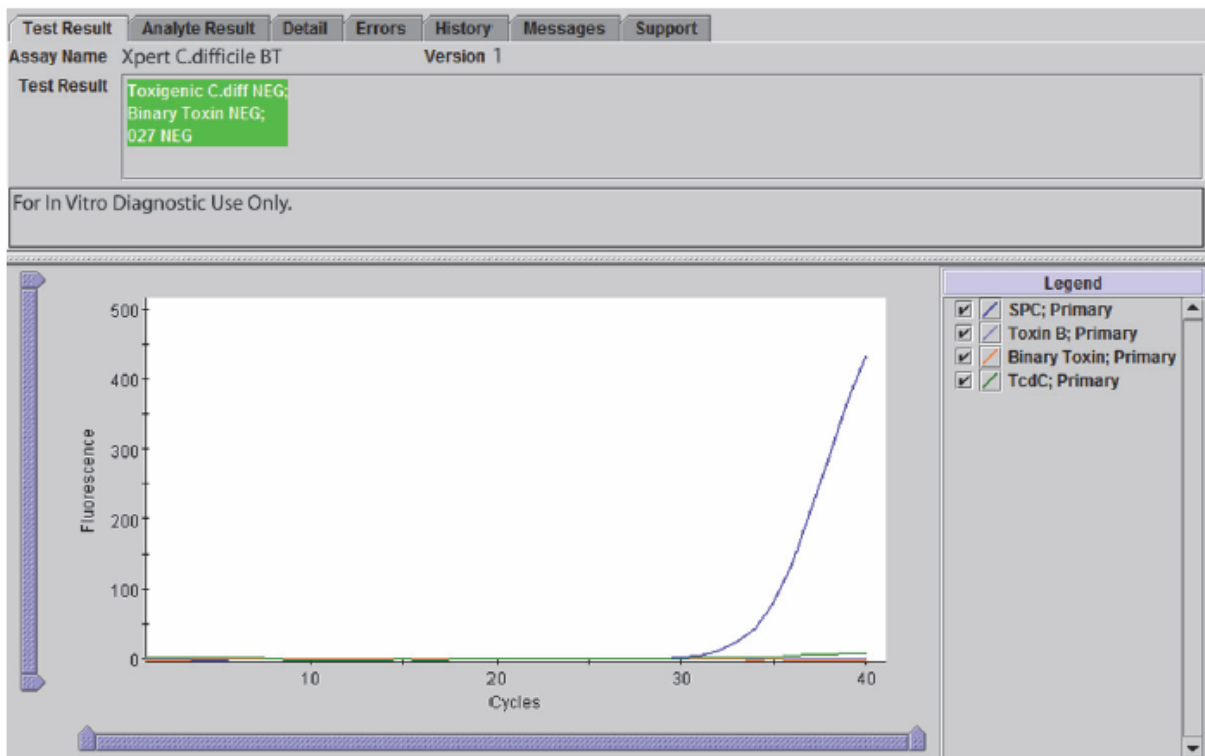
Obrázek 3: Příklad výsledků: toxigenní C. diff pozitivní, binární toxin pozitivní a 027 negativní.



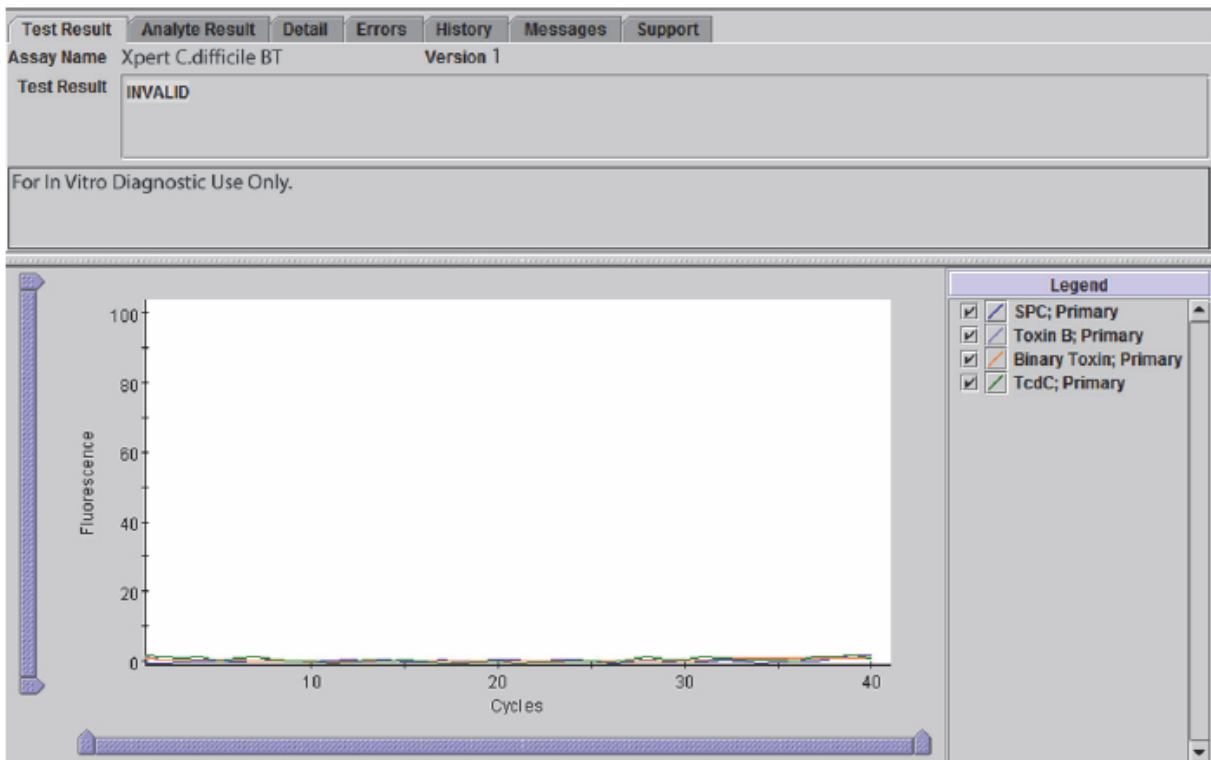
Obrázek 4: Příklad výsledků: toxigenní C. diff pozitivní, binární toxin pozitivní a 027 presumptivně pozitivní.



Obrázek 5: Příklad výsledků: toxigenní C. diff negativní, binární toxin pozitivní a 027 negativní.



Obrázek 6: Příklad výsledků: toxigenní C. diff negativní, binární toxin negativní a 027 negativní.



Obrázek 7: Příklad neplatného výsledku.

13 Důvody pro opakování testu

Pokud se vyskytne některý z níže uvedených výsledků testu, opakujte test podle návodu v části 14. Postup opakování testu (viz níže).

- Neplatný (INVALID) výsledek naznačuje, že kontrola SPC je neplatná. Vzorek nebyl řádně zpracován nebo reakce PCR byla inhibována.
- Chybný výsledek (ERROR) naznačuje, že kontrola sondy je neplatná a test selhal pravděpodobně následkem nesprávného naplnění reakční zkumavky, zjištěnému problému s integritou sondy, nebo byl překročen maximální povolený limit tlaku či zjištěna chyba nastavení ventilu.
- Žádný výsledek (NO RESULT) naznačuje, že shromážděná data nebyla dostatečná. Například obsluha zastavila právě probíhající test.

14 Postup opakování testu

Opakování testu provádějte **do** 3 hodin po získání neurčitého výsledku, použijte novou kazetu (kazetu nepoužívejte znovu) a nová činidla.

1. Ze soupravy vyjměte novou kazetu.
2. Celý zbývající obsah z komory vzorků přeneste do nové zkumavky Sample Reagent pomocí jednorázové přenosové pipety.
3. Promíchejte na vortexu a přeneste celý obsah Sample Reagent do otvoru S komory vzorků na nové kazetě Xpert *C. difficile* BT.
4. Uzavřete víčko a začněte nový test.

Pokud opakujete test po 3 hodinách od získání neurčitého výsledku, použijte nový tampon pro odebrání materiálu z původního vzorku pacienta.

15 Omezení

- Izoláty představující toxintyp XIV (bez ribotypu 027) budou ve zkoušce Xpert *C. difficile* BT vyhodnoceny jako **Toxigenic C. diff POS; Binary Toxin POS; 027 Presumptive POS**.
- Výsledek **Toxigenic C. diff NEG; Binary Toxin POS; 027 Presumptive NEG** může skrývat toxin B genu nebo *tcdCΔ117* pod LoD zkoušky.
- Izoláty představující toxintypy IV, V, X (bez ribotypu 027) mohou být ve zkoušce Xpert *C. difficile* BT příležitostně vyhodnoceny jako **Toxigenic C. diff POS; Binary Toxin POS; 027 Presumptive POS**.
- Platnost testu Xpert *C. difficile* BT může být potvrzena pouze při dodržení postupů uvedených v tomto příbalovém letáku. Změny těchto postupů mohou pozměnit výsledky testu.
- Výsledky testu Xpert *C. difficile* BT by měly být hodnoceny ve spojitosti s dalšími laboratorními a klinickými údaji, které jsou lékaři k dispozici.
- Chybný výsledek testu může vzniknout následkem nesprávného odběru vzorků, při nedodržení doporučených postupů pro sběr, manipulaci a skladování vzorků, v důsledku technické chyby, záměny a smíšení vzorků, nebo pokud je množství mikroorganismů ve vzorku příliš nízké, a proto tímto testem nedetekovatelné. Aby nedocházelo k chybným výsledkům, je nutné pečlivě dodržovat pokyny uvedené v tomto letáku.

- V důsledku zředění při opakování testu je možné, že vzorky pozitivní na *C. difficile*, které jsou velmi blízko nebo na hranici detekce (LoD) zkoušky *C. difficile* BT, budou vykazovat falešné negativní výsledky.
- Byla pozorována inhibice zkoušky *C. difficile* BT v přítomnosti následujících substancí: oxid zinečnatý v kosmetických přípravcích a krému Vagisil®.
- Příčinou infekce SDI mohou být jiné kmeny než 027.
- Falešné negativní výsledky se mohou objevit v důsledku genomových mutací, vložení, delecí nebo přeuspořádání nebo když je zkouška provedena velmi brzy v průběhu onemocnění.
- Pozitivní výsledky získané u pacientů s oslabenou imunitou mohou být odrazem asymptomatického výskytu *C. difficile*.
- Detekce nukleové kyseliny *C. difficile* ve stolici potvrzuje výskyt těchto organismů v těle pacientů s průjemným onemocněním, ale nemusí dokazovat, že *C. difficile* je příčinou tohoto onemocnění.
- Charakteristiky prováděných testů se netýkají pacientů mladších dvou let.

16 Očekávané hodnoty

Do klinické studie provedené testem Xpert *C. difficile* BT bylo zahrnuto 2 293 vzorků nezatvrdlé stolice ze sedmi středisek ze Spojených států a Kanady. Počty a procenta případů kultur pozitivních na toxigenní *C. difficile* jsou v Tabulce 2 a v Tabulce 3 uvedeny podle věku, resp. pohlaví.

Tabulka 2: Pozorovaný výskyt toxigenní *C. difficile* podle věkových skupin^a

Věková skupina	N	Výskyt <i>C. difficile</i> (včetně 027)	Výskyt binárního toxinu	Výskyt 027
2-5	16	37,5 % (6/16)	12,5 % (2/16)	12,5 % (2/16)
6-21	105	12,4 % (13/105)	2,9 % (3/105)	0,9 % (1/105)
22-59	898	16,4 % (147/898)	4,8 % (43/898)	3,3 % (30/898)
≥ 60	1274	20,7 % (264/1274)	9,2 % (117/1274)	7,2 % (92/1274)
Celkem	2293	18,8 % (430/2293)	7,2 % (165/2293)	5,5 % (125/2293)

^a Na základě výsledků Xpert *C. difficile* BT

Tabulka 3: Pozorovaný výskyt toxigenní *C. difficile* podle pohlaví^a

Pohlaví	N	Výskyt <i>C. difficile</i> (včetně 027)	Výskyt binárního toxinu	Výskyt 027
Muži	1072	18,8 % (195/1072)	6,3 % (68/1072)	5,0 % (54/1072)
Ženy	1221	19,2 % (235/1221)	7,9 % (97/1221)	5,8 % (71/1221)
Celkem	2293	18,8 % (430/2293)	7,2 % (165/2293)	5,5 % (125/2293)

^a Na základě výsledků Xpert *C. difficile* BT

17 Charakteristiky výsledků získaných testem Xpert *C. difficile* BT

17.1 Klinické hodnocení výsledků

Charakteristiky testu Xpert *C. difficile* BT byly zjišťovány ve výzkumné studii prováděné v sedmi amerických a kanadských institucích. Studie se zakládala na srovnání testu Xpert *C. difficile* BT s testem neutralizace cytotoxicity buněčné kultury (CCCN) na izolátech referenční kultury a testem kmenové typizace na toxigenních kmenech s následnou ribotypizací pozitivních vzorků za použití PCR.

Zkoumanými subjekty byli jednotlivci, u nichž rutinní péče vyžadovala testování na přítomnost *C. difficile*. Pro testování zkouškou Xpert *C. difficile* BT byla odebrána část vzorku nezatvrdlé stolice každého pacienta. Zbývající množství vzorku bylo odesláno do ústřední laboratoře k testování referenční kultury a cytotoxinu B. Každý vzorek stolice byl naočkován do předredukovaného cykloserin-cefoxitin-fruktózového agaru – v misce D (direkt plate) pro přímé testování (CCFA-D) a do cykloserin-cefoxitinového mannitolu s taurocholátním lysozomním cysteinem (CCMB-TAL). Po 24 hodinách byla kultura z CCMB-TAL přenesena do druhé misky (obohacené – enriched). Tato metoda kultivace přímých a obohacených kultur bude dále označována jako „referenční kultura“.

Jestliže byla z misky D izolována *C. difficile* a jestliže byl izolát ve zkoušce CCCN pozitivní, vzorek byl klasifikován jako „toxigenní *C. difficile* pozitivní“ a CCFA-E se už dále neanalyzovala. Jestliže z misky D *C. difficile* izolována nebyla nebo byl izolát ve zkoušce CCCN negativní, dále se neanalyzovala CCFA-E.

Jestliže byla CCFA-E na *C. difficile* pozitivní, jestliže byl izolát ve zkoušce CCCN pozitivní, vzorek byl klasifikován jako „toxigenní *C. difficile* pozitivní“. Vzorek byl hodnocen jako negativní, pokud CCFA-E byla negativní na *C. difficile* nebo byl izolát zjištěn jako negativní ve zkoušce CCCN.

Při následujícím testování referenční kultury byly toxigenní *C. difficile* pozitivní izoláty zaslány do druhého souboru referenčních laboratoří pro identifikaci kmene ribotypizací metodou PCR.

Výsledky zkoušky Xpert *C. difficile* BT byly vypočítány vzhledem k výsledkům přímé kultury s typizací kmenů a referenční kultury s typizací kmenů.

17.2 Celkové výsledky

Zkouškou Xpert *C. difficile* BT metodami přímé kultury a referenční kultury bylo testováno celkem 2 293 vzorků.

Výsledky testu Xpert *C. difficile* BT vs. přímá kultivace

V porovnání přímé kultivace s PCR-ribotypizací vykazoval test Xpert *C. difficile* BT citlivost a specifitu pro toxigenní *C. difficile* 98,78 %, resp. 90,86 %. Test Xpert *C. difficile* BT rovněž vykazoval 100% shodu u pozitivního nálezu 027 a 97,70% shodu u negativního nálezu 027 (Tabulka 4).

Tabulka 4: Test Xpert *C. difficile* BT vs. přímá kultivace a PCR-ribotypizace

Direct Culture and PCR-Ribotyping					
		Toxin B+ 027 +	Toxin B+ 027 -	NEG	Total ^a
Xpert <i>C. difficile</i> BT ^b	Toxin B+ 027+	74	4	47	125
	Toxin B+ 027-	0	164	140	304
	NEG	0	3	1860	1863
	Total	74	171	2047	2292
		Toxigenic <i>C. difficile</i>		Toxigenic <i>C. difficile</i> / 027	
		Sensitivity: 98.78% (242/245) Specificity: 90.86% (1860/2047) Accuracy: 91.71% (2102/2292) PPV ^c : 56.41% (242/429) NPV ^d : 99.84% (1860/1863)		Pos Agreement: 100% (74/74) Neg Agreement: 97.70% (2167/2218) Accuracy: 97.77% (2241/2292) PPV: 59.20% (74/125) NPV: 100% (2218/2218)	

^a Jeden izolát nebo klasifikovatelný v důsledku kontaminace: tento vzorek nebyl ve statistikách zahrnut.

^b Uvedené výsledky Xpert *C. difficile* BT zahrnují první a druhý pokus. Při prvním pokusu bylo neurčitelných přibližně 3,2% vzorků.

^c pozitivní prediktivní hodnota.

^d negativní prediktivní hodnota.

Výsledky testu Xpert *C. difficile* BT vs. referenční kultura

Vzhledem k referenční kultuře s PCR-ribotypizací vykazovala Xpert *C. difficile* BT citlivost a specifitu pro toxigenní *C. difficile* 93,39%, resp. 94,02%. Xpert *C. difficile* BT rovněž vykazovala 98,89% shodu u pozitivního nálezu 027 a 98,36% shodu u negativního nálezu 027 (Tabulka 5).

Tabulka 5: Test Xpert *C. difficile* BT vs. referenční kultura a PCR-ribotypizace

Reference Culture and PCR-Ribotyping					
		Toxin B+ 027 +	Toxin B+ 027 -	NEG	Total ^a
Xpert <i>C. difficile</i> BT ^b	Toxin B+ 027+	89	5	31	125
	Toxin B+ 027-	0	217	86	303
	NEG	1	21	1841	1863
	Total	90	243	1958	2291
		Toxigenic <i>C. difficile</i>		Toxigenic <i>C. difficile</i> / 027	
		Sensitivity: 93.39% (311/333) Specificity: 94.02% (1841/1958) Accuracy: 93.93% (2152/2291) PPV ^c : 72.66% (311/428) NPV ^d : 98.82% (1841/1863)		Pos Agreement: 98.89% (89/90) Neg Agreement: 98.36% (2165/2201) Accuracy: 98.38% (2254/2291) PPV: 71.20% (89/125) NPV: 99.95% (2165/2166)	

^a Jeden izolát nebo klasifikovatelný v důsledku kontaminace: tento vzorek nebyl ve statistikách zahrnut.

^b Uvedené výsledky Xpert *C. difficile* BT zahrnují první a druhý pokus. Při prvním pokusu bylo neurčitelných přibližně 3,2 % vzorků.

^c pozitivní prediktivní hodnota.

^d negativní prediktivní hodnota.

Shrnutí

Tabulka 6 uvádí celkový počet vzorků pro každý z různých výsledků u 2 293 vzorků zahrnutých v analýze klinických výsledků.

Tabulka 6: Celkové výsledky zkouška Xpert *C. difficile* BT

Test Result	N
Toxigenic <i>C. diff</i> POS; Binary Toxin NEG; O27 NEG	272
Toxigenic <i>C. diff</i> POS; Binary Toxin POS; O27 NEG	36
Toxigenic <i>C. diff</i> POS; Binary Toxin POS; O27 PRESUMPTIVE POS	122
Toxigenic <i>C. diff</i> NEG; Binary Toxin POS; O27 NEG	7 ^a
Toxigenic <i>C. diff</i> NEG; Binary Toxin NEG; O27 NEG	1856
Total	2293

^a V dodatečných testech vykazaly 4 ze 7 kmenů gen toxinu B.

Užívání antibiotik

Mezi 2 293 případy zahrnutými v hlavní databázi bylo užívání antibiotik během 2 měsíců před sběrem vzorků hlášeno u 1 630 pacientů, u 570 bylo potvrzeno, že žádná antibiotika neužívali; u 93 případu byl status ohledně antibiotik neznámý. Užívání antibiotik nezpůsobilo statisticky významný rozdíl ve výsledcích.

18. Analytická účinnost

18.1 Analytická specifita

Ve zkoušce Xpert *C. difficile* BT bylo sebráno, kvantifikováno a testováno padesát pět kmenů. Tyto kmene pocházely z Americké sbírky typů kultur (American Type Culture Collection, ATCC), Sbírký kultur Univerzity v Göteborgu (Cultur Collection University of Göteborg, CCUG), Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ), Středisek pro kontrolu a prevenci chorob (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), Institutu veřejného zdraví, Maribor, Slovinsko, a švédského Institutu infekčních chorob (SMI).

Mezi testovanými bakteriálními druhy bylo deset (10) netoxigenních kmenů *C. difficile* a jedenáct (11) jiných druhů než *Clostridium difficile*, patřících ke stejnému rodu. Testované organismy byly identifikovány buď jako gram-pozitivní, nebo gram-negativní (18). Organismy byly dále klasifikovány jako aerobní (24), anaerobní (29) nebo 2 mikroaerobní.

Každý kmen byl testován ve třech exemplářích v koncentracích od $1,1 \times 10^8$ po $2,2 \times 10^{10}$ CFU/stěr. Do studie byly zahrnuty pozitivní a negativní kontroly. V podmínkách studie všechny izoláty vykazovaly negativní výsledky pro toxigenní *C. diff*, binární toxin i 027 (viz tabulka 7). Analytická specifita byla 100 %.

K důkazu specifity zkoušky na binární toxin byly testovány další řady druhů rodu *Clostridium*.

Tabulka 7: Specificita výsledků studie pro výskyt genu binárního toxinu

Genus	Species	Number Tested	Toxin A/B	Binary Toxin
<i>Clostridium</i>	<i>aldenense</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>aminovaletricum-like</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>baratii</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>bartletti</i>	1	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>bifermentans</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>bolteae</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>cadaveris</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>celerecrescens</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>citroniae</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>clostridioforme</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>cochlearium</i>	1	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>colicanis</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>disporicum</i>	1	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>fallax</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>glycolicum</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>hastiforme</i>	1	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>hathewayi</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>hylemonae</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>innocuum</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>lactatifermentans</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>lavalense</i>	1	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>limosum</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>mangenotii</i>	1	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>mayombei-like</i>	1	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>novyi</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>paraputrificum</i>	2	neg	neg
<i>Clostridium</i>	<i>perfringens</i>	2	neg	neg

Všechny izoláty neobsahující binární toxin byly při zkoušce Xpert *C. difficile* BT negativní.

18.2 Analytická citlivost

K určení 95% intervalů spolehlivosti pro analytickou mez detekce (LoD) byly provedeny studie *C. difficile* zředěné do fekální matrice lidského původu, které lze zjistit pomocí testu Xpert *C. difficile* BT. Matrice sestávala z lidských fekálií (testem Xpert *C. difficile* BT určených jako *C. difficile* negativní) zředěných v PBS s 15% glycerolem. LoD je definována jako nejnižší počet jednotek tvořících kolonii (CFU) na jeden tampón, který lze reprodukovatelně rozlišit od negativních vzorků s 95% jistotou.

U každé zkoušené koncentrace *C. difficile* (CFU/stěr) bylo zkoušeno a vyhodnoceno 20 replikátů byly vyhodnoceny pro 7 různých kmenů *C. difficile* představujících toxinotypy 0 (dva kmeny), III (dva kmeny), IV, V a VIII (jeden z každého kmene).

Odhady a intervaly spolehlivosti byly stanoveny pomocí logistické regrese (počet pozitivních výsledků na počet replikátů na každé úrovni) v rozsahu testovaných CFU. Intervaly spolehlivosti byly stanoveny pomocí odhadů maximální pravděpodobnosti na parametrech logistického modelu za použití velkého vzorku variačně-kovarianční matice.. Body odhadu LoD a 95% horní a dolní intervaly spolehlivosti pro každý testovaný toxinotyp *C. difficile* jsou shrnuty v tabulce 8.

Tabulka 8: 95% intervaly spolehlivosti pro analytické LoD- *C. difficile*

Strain ID	Toxinotype	LoD _{95%} (CFU/Swab)	Lower 95% CI	Upper 95% CI
VPI 10463 (CCUG19126)	0	255	190	632
90556-M6S (ATCC9689)	0	460	419	587
LUMC-1 (027) ^a	III	23	19	31
LUMC-5 (027) ^a	III	75	45	176
LUMC-7	V	45	34	104
LUMC-6	VIII	60	50	74
9101	XII	41	34	49

^a PCR ribotypování

Výsledky této studie ukazují, že test Xpert *C. difficile* BT bude vykazovat pozitivní výsledek *C. difficile* 95% času u fekálního vzorku obsahujícího 460 CFU/výtěrový tampón a presumtivní pozitivní výsledek 027 95% času pro 75 CFU/výtěrový tampón.

Kromě stanovení LoD bylo pomocí testu Xpert *C. difficile* BT testováno osmnáct kmenů *C. difficile* představujících toxinotyp 0 plus 12 variant toxinotypů, včetně čtyř 027 izolátů toxinotypu III. Kmeny *C. difficile* byly vybrány tak, aby široce reprezentovaly většinu toxinotypů *C. difficile*, které se v praxi vyskytují. Zásobní kultury byly připraveny rozsuspendováním bakteriálního nárůstu z agarových destiček v pufru PBS obsahujícím 15% glycerolu. Koncentrace každého roztoku byla upravena na 1,4-5,9 jednotek McFarland. Všechny kmeny byly sériově zředěny na přibližně 900 CFU / tampón a testovány trojmo.

Za podmínek této studie test Xpert *C. difficile* BT správně identifikoval všech 18 kmenů testovaných jako toxické *C. diff* POS. V panelu bylo zařazeno 8 toxinotypů, které byly pozitivní také pro produkci binárního toxinu (CDT). Všechny byly s použitím testu Xpert *C. difficile* BT CDT pozitivní. Všechny čtyři 027 izoláty reprezentující toxinotyp III byly správně označeny jako toxické *C. dif.* POS; Binární toxin POS; 027 PRESUMPNÍ POS.

Sedm izolátů *C. difficile* z PCR ribotypu 033 a tři další izoláty *C. difficile* příbuzných PCR ribotypu, které byly negativní pro *tcdA* a *tcdB*, ale produkovaly binární toxin (CDT) 22, byly testovány pomocí testu Xpert *C. difficile* BT. Všechny 10 izolátů poskytlo pozitivní výsledky pouze pro binární toxin (tabulka 9), což potvrzuje schopnost testu detekovat izoláty, které jsou toxin A-, toxin B-, binární toxin +).

Tabulka 9: Testované organismy, které produkují pouze binární toxin (Toxin A-, Toxin B-) v testu Xpert *C. difficile* BT

Organism	Strain ID	PCR Ribotype	Test Result
<i>C. difficile</i>	CD12-066	033	Toxigenic <i>C.diff</i> NEG; Binary Toxin POS; 027 NEG
<i>C. difficile</i>	CD12-203	033	Toxigenic <i>C.diff</i> NEG; Binary Toxin POS; 027 NEG
<i>C. difficile</i>	CD13-022	033	Toxigenic <i>C.diff</i> NEG; Binary Toxin POS; 027 NEG
<i>C. difficile</i>	06-08-02	033	Toxigenic <i>C.diff</i> NEG; Binary Toxin POS; 027 NEG
<i>C. difficile</i>	06-20-01	033	Toxigenic <i>C.diff</i> NEG; Binary Toxin POS; 027 NEG
<i>C. difficile</i>	NT077	033	Toxigenic <i>C.diff</i> NEG; Binary Toxin POS; 027 NEG
<i>C. difficile</i>	AI-0016	238	Toxigenic <i>C.diff</i> NEG; Binary Toxin POS; 027 NEG
<i>C. difficile</i>	WA-0012	239	Toxigenic <i>C.diff</i> NEG; Binary Toxin POS; 027 NEG
<i>C. difficile</i>	ES-0145	288	Toxigenic <i>C.diff</i> NEG; Binary Toxin POS; 027 NEG
<i>C. difficile</i>	R-0010	033	Toxigenic <i>C.diff</i> NEG; Binary Toxin POS; 027 NEG

18.3 Interferenční látky

Na interferenci s testem Xpert C. difficile BT bylo testováno dvacet jedna (21) biologických a chemických látek občas používaných nebo nalézáných ve vzorcích stolice. Potenciálně rušivé látky zahrnují krém Vagisil a pastu z oxidu zinečnatého (viz oddíl Omezení). U 19 látek uvedených v tabulce 10 jsme nedetekovali žádné rušení testu Xpert C. difficile BT.

Tabulka 10: Testované látky, které neinterferovaly s testem Xpert C. difficile BT

Substance	Substance
Whole Blood Karolinska University Hospital	K-Y Jelly/Gelée® McNeil-PPC
Mucin (porcine) Sigma	Vaseline Unilever
Kaopectate® Chattam	Dulcolax® Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals
Immodium® McNeil-PPC	Preparation H Portable Wipes Wyeth Consumer Healthcare
Pepto-Bismol® Proctor & Gamble	Vaginal Contraceptive Film (VCF) Apothecus Pharmaceutical
Preparation H® Wyeth Consumer Healthcare	Vancomycin Fluka
Fleet® CB Fleet Company	Metronidazole Actavis
Fecal fats Karolinska University Hospital	Anusol® Plus TM Warner-Lambert Company
Monistat® McNeil-PPC	E-Z HDTM High Density Barium Sulfate for suspension E-Z EM Canada
Hydrocortisone Cream Longs Drugs	

19 Reproducibilita

Panel 7 vzorků s různými koncentracemi toxigenní *C. difficile* a *C. difficile* Ribotype 027 byl testován v 10 různých dnech dvěma různými operátory na třech místech (7 vzorků × 2 operátoři/den × 10 dní × 3 místa). Jedna šarže testu Xpert *C. difficile* BT byla použita na každém ze tří testovacích míst. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 11 a tabulce 12.

Tabulka 11: Shrnutí výsledků reproducibility (všechny)

Specimen ID	% Agreement ^a			% Total Agreement by Sample
	Site 1	Site 2	Site 3	
Negative	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Toxigenic <i>C. difficile</i> High Negative	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Toxigenic <i>C. difficile</i> Low Positive	100% (20/20)	85% (17/20)	85% (17/20)	90% (54/60)
Toxigenic <i>C. difficile</i> Moderate Positive	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Toxigenic <i>C. difficile</i> Ribotype 027 High Negative	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Toxigenic <i>C. difficile</i> Ribotype 027 Low Positive	100% (20/20)	95% (19/20)	95% (19/20)	96.7% (58/60)
Toxigenic <i>C. difficile</i> Ribotype 027 Moderate Positive	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
% Total Agreement by Site	100% (140/140)	97.1% (136/140)	97.1% (136/140)	98.1% (412/420)

^a U negativních a vysoce negativních vzorků platí: % shody = (# negativní výsledky/ celkové množství vzorků); u nízkých a středně pozitivních vzorků, % shody = (# pozitivní výsledky/celkové množství vzorků).

Tabulka 12: Shrnutí výsledků hodnot Ct podle úrovně vzorku a sondy

SPC			
Level	Ave	StdDev	CV
Toxigenic <i>C. diff</i> high neg	32.17	0.59	1.83%
Toxigenic <i>C. diff</i> low pos	32.14	0.53	1.66%
Toxigenic <i>C. diff</i> mod pos	31.98	0.47	1.47%
027 high neg	32.11	0.65	2.03%
027 low pos	31.93	0.72	2.26%
027 mod pos	31.96	0.61	1.90%
Neg	32.26	0.72	2.22%
tcdB (Toxin B)			
Level	Ave	StdDev	CV
Toxigenic <i>C. diff</i> high neg	39.59	0.70	1.77%
Toxigenic <i>C. diff</i> low pos	35.88	0.81	2.24%
Toxigenic <i>C. diff</i> mod pos	32.17	0.45	1.39%
027 high neg	39.11	0.98	2.50%
027 low pos	35.49	0.58	1.65%
027 mod pos	32.10	0.63	1.97%

Přídavný panel ze 6 vzorků, tři negativní a tři toxigenní *C. difficile* s vysoce negativním výsledkem byl testován ve dvou různých dnech dvěma různými operátory na každém ze tří míst (6 vzorků × 2 operátoři/den × 5 dní × 3 místa). Vysoce negativní vzorky byly připraveny v koncentraci pod LoD tak, aby daly očekávaný negativní výsledek 20 až 80% času. Jedna šarže testu Xpert *C. difficile* BT byla použita na každém ze tří testovacích míst. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 13.

Tabulka 13: Shrnutí dodatečných výsledků reproducibility

Specimen ID	% Agreement^a			% Total Agreement by Sample
	Site 1	Site 2	Site 3	
Negative	100% (30/30)	100% (30/30)	100% (30/30)	100% (90/90)
Toxigenic <i>C. difficile</i> High Negative ^b	60% (18/30)	60% (18/30)	53.3% (16/30)	57.8% (52/90)

^a (# negativní výsledek /celkový počet negativních vzorků)















^b Pro vysoce negativní vzorek se očekává 20-80% shoda.

20 Odkazy

1. Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis, Lancet 1978; 1:1063-1066.
2. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. N Engl J Med 2002; 31:334-339
3. Borriello SP. The influence of the normal flora on *Clostridium difficile* colonization of the gut. Ann Med 1990; 22:61-67
4. Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect 1998; 40:1-15.
5. Kelly CP, Pothoulakis C, Lamont JT. *Clostridium difficile* colitis. N Engl J Med 1994; 330:257-262.
6. Braun V, Hundsberger T, Leukel P, et al. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. 1996; Gene 181:29-38.
7. Hammond GA, Johnson JL. The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. Microb Pathog. 1995;19:203- 213.
8. Sambol SP, Merrigan MM, Lysterly D, et al. Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease. Infect. Immun 2000;68:5480-5487.
9. Goncalves C, Decre D, Barbut F, et al. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2004;42:1933-1939
10. Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, et al. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiol Lett 2000;186:307-12.
11. Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P. Action-specific ADP-ribotransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. Infect Immun 1998;56:2299-2306.
12. MacCannell DR, Louie TJ, Gregson DB, et al. Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada, J Clin Microbiol. 2006 Jun;44(6):2147-2152.
13. Wilkins TD, Lysterly DM. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. Clin Microbiol. 2003 Feb;41:531-534.
14. Delmee M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. Clin Microbiol Infect. 2001;7:411-416.
15. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet. 2011;377:63-73.
16. Walker AS, Eyre DW, Wyllie DH, et al. Relationship between bacterial strain type, host biomarkers, and mortality in *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis. 2013; 56:1589-1600.
17. See I, Mu Y, Cohen J, Beldavs ZG, et al. NAP1 strain type predicts outcomes from *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 2014;58:1394-1400.
18. Kuijper EJ, Coignard B, Tull P. ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*; EU Member States; European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect. 2006; 12 Suppl 6:2-18.
19. Curry SR, Marsh JW, Muto CA, et al. *tcdC* genotypes associated with severe *TcdC* truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*, J Clin Microbiol. 2007 Jan;45:215-221. Erratum in: J Clin Microbiol. 2007 Jun;45(6):2103.
20. Weiss K, Boisvert A, Chagnon M, et al. Multipronged Intervention Strategy to Control an Outbreak of *Clostridium difficile* Infection (CDI) and Its Impact on the Rates of CDI from 2002 to 2007. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009;30(2):156-162.
21. Eckert C, Emirian A, Le Monnier A, et al. Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B. New Microbes New Infect. 2014;8;3:12-7.
22. Androga GO, McGovern AM, Elliott B, et al. Evaluation of the Cepheid Xpert C. difficile/Epi and meridian bioscience illumigene C. difficile assays for detecting *Clostridium difficile* ribotype 033 strains. J Clin Microbiol. 2015;53:973-5
23. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
25. REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on the classification labeling and packaging of substances and mixtures amending and repealing, List of Precautionary Statements, Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC (amending Regulation (EC) No 1907/2007).
26. Occupational Safety and Health Standards, Hazard Communication, Toxic and Hazard Substances (March 26, 2012) (29 C.F.R., pt. 1910, subpt. Z).
27. Killgore G, Thompson A, Johnson S, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-

ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol* 2008;46:431–437

21 Tabulka symbolů

Symbol	Význam
	Katalogové číslo
	Lékařské zařízení pro diagnostiku <i>In vitro</i>
	Nepoužívat opakovaně
	Šarže
	Varování
	Nahlédněte do průvodních dokumentů
	Výrobce
	Obsah postačuje na <n> testů
	Použitelné do
	Kontrola
	Značka shody
	Autorizovaný prodejce pro Evropu
	Teplotní omezení
	Biologické riziko



Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Sweden



Cepheid 904 Caribbean Drive Sunnyvale, CA 94089 USA	Cepheid Europe SAS Vira Solelh 81470 Maurens-Scopont France
Telephone: +1 408.541.4191	Telephone: +33 563 825 300
Fax: +1 408.541.4192	Fax: +33 563 825 301
www.cepheid.com	www.cepheidinternational.com