

alethia®

C. difficile

DNA Amplification Assay

DNA Amplification Assay for the Detection of
Cytotoxigenic *C. difficile* in Stool Specimens

REF 480050

IVD

Rx Only

INTENDED USE

The Alethia *C. difficile* DNA amplification assay, performed on the Alethia reader, is a qualitative in vitro diagnostic test for the direct detection of toxigenic *C. difficile* in human stool specimens from pediatric and adult patients suspected of having *Clostridium difficile*-associated disease (CDAD).

The Alethia *C. difficile* assay utilizes loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP)^{1,2} technology to detect the pathogenicity locus (PaLoc)³ of toxigenic *Clostridium difficile*. The *Clostridium difficile* PaLoc is a gene segment present in all known toxigenic *C. difficile* strains. The *C. difficile* PaLoc codes for both the Toxin A gene (*tcdA*) and the Toxin B gene (*tcdB*), has conserved border regions, and is found at the same site on the *C. difficile* genome for all toxigenic strains.³ The Alethia *C. difficile* assay detects the PaLoc by targeting a partial DNA fragment on the Toxin A gene. The *tcdA* target region was selected as an intact region remaining in all known A+B+ and A-B+ toxinotypes.

Alethia *C. difficile* is intended for use in hospital, reference or state laboratory settings. The device is not intended for nonlaboratory point-of-care use.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The Alethia *C. difficile* DNA molecular assay is based on loop-mediated amplification technology, which uses specifically designed primers to the PaLoc pathogenicity locus to provide for specific and continuous isothermal DNA amplification. A by-product of this amplification is the formation of magnesium pyrophosphate, which forms a white precipitate leading to a turbid reaction solution. This presence of turbidity signifies a positive reaction while the absence of turbidity represents a negative reaction. The Alethia *C. difficile* assay contains primers that specifically amplify a 204 bp region of the conserved 5' sequence of the *tcdA* gene within the PaLoc of toxigenic *C. difficile* in diarrheal stool samples from patients suspected of having *C. difficile*-associated disease (CDAD). The results of the assay are determined using the Meridian Alethia Incubator / Reader.

The Alethia *C. difficile* DNA molecular assay kit includes a Sample Preparation Apparatus and a Test Device. The Sample Preparation Apparatus, used for specimen dilution and preparation, is filled with Phosphate Buffered Saline with formalin-treated *Staphylococcus aureus*. The Alethia *C. difficile* Test Device contains one dry reagent lysosphere in each of two chambers; a TEST Chamber with *C. difficile* specific primers and a CONTROL Chamber with *S. aureus* specific primers. Together, the formalin-treated *Staphylococcus aureus* in the Sample Preparation Apparatus and the *S. aureus* specific primers in the CONTROL Chamber lysosphere function as the Internal Control for the Alethia *C. difficile* assay. Each patient specimen is added to the Sample Preparation Apparatus via a Sample Collection Brush. The patient specimen is diluted in Phosphate Buffered Saline with formalin-treated *Staphylococcus aureus*, combining any *C. difficile* present in the patient specimen with *S. aureus*. The patient specimen and the *S. aureus* Control Target are processed in parallel through the remaining Specimen Preparation steps and through the Test Procedure. The Internal Control monitors amplification inhibition, assay reagent performance and sample processing effectiveness. The Control *S. aureus* DNA target must be amplified and detected in the final reaction or the test is considered invalid and patient results are not reported.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

Toxigenic *Clostridium difficile* is a major cause of antibiotic associated diarrhea and colitis and is the causative agent for virtually all cases of pseudomembranous colitis. Although about 2% of normal healthy adults are colonized with *C. difficile*, many patients acquire this organism through nosocomial infection. Exposure to most antibiotics is thought to allow proliferation of toxigenic *C. difficile* by disrupting the normal intestinal flora. Two large toxin proteins (TcdA [or toxin A] and TcdB [toxin B]) are thought to be the primary virulence factors of *C. difficile*. These toxins are encoded by two separate genes, named *tcdA* and *tcdB*, respectively. Together, with three additional genes, they form a 19.6 kb pathogenicity locus called PaLoc.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

The maximum number of tests obtained from this test kit is listed on the outer box.

1. **Alethia *C. difficile* Sample Preparation Apparatus:** Sampling unit consisting of sample preparation chamber, dropper tip, cap and Sample Dilution Buffer (Phosphate Buffered Saline and formalin treated *Staphylococcus aureus*, with sodium azide (0.09%) as a preservative)
2. **Alethia Reaction Buffer:** Tris-buffered solution containing sodium azide (0.09%) as a preservative
3. **Alethia *C. difficile* Test Device:** Two separate chambers containing dry reagent lysospheres comprised of DNA polymerase, Deoxyribonucleotide Triphosphate (dNTPs), and either *C. difficile* specific primers (TEST Chamber) or *S. aureus* primers (CONTROL Chamber)
4. **Sample Collection Brushes**
5. **Alethia Heat Treatment Tubes**

MATERIALS PROVIDED SEPARATELY

Alethia External Control Kit, Catalog Number: 479920

MATERIALS NOT PROVIDED

1. Disposable latex gloves, powder free
2. DNase/RNase free, aerosol resistant pipette tips

EQUIPMENT NOT PROVIDED

1. Dry-bath with 12 mm heat block capable of 95 C
2. Digital Thermometer with Max/Min Temperature Memory (e.g. Traceable® Lollipop™ Waterproof/Shockproof Thermometer)
3. Vortex mixer
4. Interval timer
5. Micropipette capable of dispensing 50 µL
6. Micropipette capable of dispensing 200 µL
7. Alethia reader

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Follow Biosafety Level 2 and Good Laboratory practices during testing.⁴ Treat all specimens and used Test Devices as capable of transmitting infectious agents. Do not eat, drink or smoke in areas where specimens or kit reagents are handled.
3. Wear disposable gloves while handling specimens and thoroughly wash hands afterwards.
4. Quality Control Programs for Molecular Testing Laboratories should be employed.⁵
5. Alethia Sample Dilution Buffer contains formalin inactivated-organisms and should be treated as potentially infectious.
6. The Alethia *C. difficile* Test Device contains lyophilized reagents. The protective pouch should not be open until ready to perform the assay.
7. The Alethia *C. difficile* Test Device includes a latch feature that is designed to prevent contamination of the test area with amplification product. Do NOT use Test Devices with broken latches.
8. Dispose of used Alethia Test Devices immediately after processing, leaving the device latch securely in place. Opening the device after amplification may result in contamination of the test area with amplification product.

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

There are no known hazards associated with this product.

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date is indicated on the kit label. Store the kit at 2-27 C.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Sample type: Unformed samples indicative of CDAD.

Human stool samples, unpreserved: Samples should be transported and stored at 2-8 C prior to testing. Samples should be tested as soon as possible, but may be held up to 24 hours at 21-27 C or 5 days at 2-8 C.

Human stool samples, preserved in Cary-Blair-based media: Samples should be transported and stored at 2-8 C prior to testing. Samples should be tested as soon as possible, but may be held up to 5 days at 2-8 C.

REAGENT PREPARATION

Ensure kit reagents are at room temperature (21-27 C) before use. Incorrect results may be obtained if reagents are not brought to room temperature prior to use.

SPECIMEN PREPARATION

NOTE: Ensure that the Alethia instrument is powered on and required performance verifications have been completed prior to initiation of SPECIMEN PREPARATION. Refer to the Alethia reader Operator's Manual for further information regarding instrument set-up and operation.

1. Mix stool sample thoroughly.
2. Collect mixed sample specimen using Sample Collection Brush.
 - a. Liquid Stool: Immerse Sample Collection Brush completely into specimen.
 - b. Semi-solid Stool: Rotate Sample Collection Brush over specimen surface, lightly coating the surfaces of the brush bristles. Approximately one-half of the brush should be coated; over-collection of stool may lead to clogging of the sample collection device.
3. Add the Sample Collection Brush to the Alethia C. *difficile* Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent. Break-off the Sample Collection Brush at the 'Break' mark on the handle. Replace and secure the Sample Preparation Apparatus cap. For stool in Cary-Blair-based media, transfer 200 µL of specimen to the Alethia C. *difficile* Sample Preparation Apparatus and secure the cap. Vortex the Sample Preparation Apparatus for a minimum of 10 seconds. Specimen in Alethia C. *difficile* Sample Preparation Apparatus prior to heat-treatment may be held at 2-27 C for up to 24 hours prior to testing.
4. Remove the tip cap from the Sample Preparation Apparatus and squeeze five to ten drops of sample into a clean Alethia Heat Treatment Tube.
5. Repeat Sample Preparation Steps for all samples to be processed.
6. Heat the Alethia Heat Treatment Tubes containing mixed sample in a dry-bath/heat block at 95 +/- 5 C for 10 +/- 2 minutes. Use the digital thermometer and the interval timer to monitor temperature and time.
7. Remove the tubes from the dry-bath/heat block and vortex for approximately 10 seconds. Heat-treated samples may be held at 2-8 C for 4 hours OR may be frozen and stored at ≤ -20 C for 1 day prior to addition to Reaction Buffer. Heat-treated samples may be frozen and thawed once.

TEST PROCEDURE

NOTE: A maximum of 10 samples can be processed in a single Alethia reader run.

1. Transfer 50 µL of heat-treated sample to an appropriately labeled Alethia Reaction Buffer tube.
2. Vortex the Reaction Buffer Tube containing heat-treated sample for approximately 10 seconds.
3. Repeat steps 1 and 2 for all the samples to be analyzed before proceeding.
4. Remove 1 Alethia C. *difficile* Test Device from its protective pouch per sample. Carefully open the device by lifting the latch, holding the tubes such that the lyophilized reagent will not fall out upon opening. Place device on a flat surface or in a rack that can accommodate the device.
5. Using a micropipette, first transfer 50 µL from the Reaction Buffer tube containing the heat treated sample to the TEST chamber (left/White Bead), and then transfer 50 µL from the Reaction Buffer tube containing the heat treated sample to the CONTROL chamber (right/Yellow Bead) of the Alethia Test Device. Take care not to introduce air to the reaction mixture. Do not mix reactions with pipette. Close the Alethia Test Device and fasten the latch securely.
6. Gently mix the device by tapping or flicking, being careful to not introduce air bubbles or get the reaction mixture into the device lid. Carefully examine the reaction tubes for air bubbles or liquid in the lid. If air bubbles or liquid is noted, tap the device on the bench top and repeat the visual inspection.
7. Insert the Alethia Test Device into the Alethia reader and initiate amplification reaction and detection. Results will be displayed at the conclusion of the run.

INTERPRETATION OF RESULTS

Sample ID	Reported Result	Interpretation
Patient Specimen	POSITIVE	Sample contains toxigenic <i>C. difficile</i> strain with the pathogen locus (PaLoc).
	NEGATIVE	No toxigenic <i>C. difficile</i> detected.
	INVALID	No reportable result. Repeat the test using the original stool sample. Inhibitory patient specimen, improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
Positive Control	POSITIVE	Valid positive control result. Reagents active at time of use, Alethia reader performing correctly.
	NEGATIVE	Incorrect control result. Repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
	INVALID	No reportable result. Repeat entire assay run using original stool samples. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
Negative Control	POSITIVE	Incorrect control result. Repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
	NEGATIVE	Valid negative control result. Reagents active at time of use, Alethia reader performing correctly.
	INVALID	No reportable result. Repeat entire assay run using original stool samples. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
EMPTY WELL	NONE	No Alethia Test Device in the Alethia reader Well. OR The Alethia Test Device present is compromised due to sample preparation failure, dirty device or improperly seated device. Repeat the test using original sample.

QUALITY CONTROL

This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.

1. Each device contains an internal control well that controls for amplification inhibition, assay reagents and sample processing effectiveness.
2. The heat treatment step is monitored with an external thermometer and interval timer. Use the Max/Min temperature memory of the thermometer to ensure that a temperature of 95 +/- 5 C is maintained. Use the interval timer to ensure that heat-treatment duration is 10 +/- 2 minutes.
3. Good laboratory practice recommends the use of control materials. Users should follow the appropriate federal, state and local guidelines concerning the running of external quality controls.
4. Alethia C. *difficile* External Control Reagents are supplied separately (Catalog 479920). It is recommended that the reactivity of each new lot and each new shipment of Alethia C. *difficile* be verified on receipt or before use. External control tests should be performed thereafter in accordance with appropriate federal, state and local guidelines. The Alethia C. *difficile* test kit should not be used in patient testing if the external controls do not produce the correct results.
5. A separate device must be used for each external control reagent.
6. DO NOT heat-treat the Positive or Negative Control samples.

EXPECTED VALUES

The frequency of antibiotic-associated diarrhea caused by *C. difficile* is dependent on several factors, including patient population, type of institution and epidemiology. The incidence of CDAD in patients suspected of having antibiotic-associated disease is 15-20% although different facilities may find positive rates above or below this range.⁶ The incidence of toxinogenic *C. difficile* during the 2010 period of this study was 15.5% and 16.1%.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. Assay does not distinguish between viable and non-viable organisms.
2. Test results are to be used in conjunction with information available from the patient clinical evaluation and other diagnostic procedures.
3. This test is for use with unfrozen stool samples, preserved or unpreserved, only. Performance characteristic of other clinical specimens types have not been established.
4. Two distinct groups have been identified that can harbor *C. difficile* asymptomatically at very high rates. Colonization at rates up to 50% and higher have been reported in infants and rates up to 32% in cystic fibrosis patients.^{7, 8}
5. This assay does not identify antimicrobial susceptibility.
6. This test detects but does not differentiate the NAP1 (Ribotype 027) strain from other toxigenic strains of *C. difficile*.
7. The detection of bacterial nucleic acid is dependent on proper specimen collection, handling (including transportation and storage) and preparation (dilution and heat-treatment). Failure to follow instructions for collection, handling and preparation may cause incorrect results.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Alethia *C. difficile* was evaluated in 2010 by four independent clinical test sites located in the Midwestern and Southern regions of the United States and the manufacturer. Two individual studies were performed to establish performance characteristics for the assay. Clinical study information is described below.

(1) Patients 2 Years of Age and Above

A total of 697 qualified samples from patients 2 years of age and above were evaluated. Samples were collected from 274 (39.3%) males and 419 (60.1%) females. In the case of 4 (0.6%) of the patients, gender was not known. The age groups of patients range from 2 years of age to 96 years of age. No differences in test performance were observed based on patient age or gender. The overall positivity rate for the study was 15.5%. Table 1 shows overall performance data for the study. Table 2 shows assay performance by clinical site.

Table 1. Performance data (Patients 2 years of age and above)

Cytotoxic bacterial culture	Alethia <i>C. difficile</i>			
	Positive	Negative	Invalid***	Total
Positive	99	5**	4	108
Negative	27*	546	16	589
Total	126	551	20	697
			95% CI	
Sensitivity	99/104	95.2%	89.2 - 97.9%	
Specificity	546/573	95.3%	93.2 - 96.7%	
Correlation	645/677	95.3%	93.4 - 96.6%	
Invalid Rate	20/697	2.9%	N/A	

* 15/27 false positive results were positive by another FDA cleared molecular assay. Of the remaining 12 false positive results, 8 were positive by a FDA cleared assay for the detection of GDH.

** 2/5 false negative results were negative by another FDA cleared molecular assay.

*** Invalid results were obtained for 20/697 (2.9%) samples tested. Eleven (1.6%) of the invalids observed were categorized as Assay Invalids, indicative of improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure. One of the 11 specimens remained invalid after repeat testing from the original sample.

Table 2. Performance characteristics by site (Patients 2 years of age and above)

Site	Positive Samples			Negative Samples		
	Alethia / Cytotoxic bacterial culture	Sensitivity %	95% CI	Alethia / Cytotoxic bacterial culture	Specificity %	95% CI
Total	99/104**	95.2%	89.2 – 97.9%	546/573*	95.3%	93.2 – 96.7%
Site 1	4/5	80.0%	37.6 – 96.4%	58/60	97.6%	88.6 – 99.1%
Site 2	12/12	100%	75.7 – 100%	62/67	92.5%	83.7 – 96.8%
Site 3	20/20	100%	83.9 – 100%	87/92	94.6%	87.9 – 97.7%
Site 4	8/8	100%	67.6 – 100%	36/39	92.3%	79.7 – 97.3%
Site 5	55/59	93.2%	83.8 – 97.3%	303/315	96.2%	93.5 – 97.8%

(2) Patients Less than 2 Years of Age

A total of 193 qualified samples from patients 0 months to 24 months were evaluated. Samples were collected from 103 (53.4%) males and 90 (46.6%) females. No differences in test performance were observed based on age or gender. The overall positivity rate for the study was 16.2%. Table 3 shows overall performance data for the study. Table 4 shows assay performance by clinical site.

Table 3. Performance data (Patients less than 2 years of age)

Cytotoxic bacterial culture	Alethia <i>C. difficile</i>			
	Positive	Negative	Invalid***	Total
Positive	28	2**	1	31
Negative	6*	156	0	162
Total	34	158	1	193
			95% CI	
Sensitivity	28/30	93.3%	78.7 - 98.2%	
Specificity	156/162	96.3%	92.2 - 98.3%	
Correlation	184/192	95.8%	91.3 - 97.5%	
Invalid Rate	1/193	0.5%	N/A	

* 3/6 false positive results were positive by another FDA cleared molecular assay. Of the remaining 3 false positive results, all were positive by a FDA cleared assay for the detection of GDH.

** 1/2 false negative results were negative by another FDA cleared molecular assay.

*** Invalid results were obtained for 1/193 (0.5%) samples tested. The invalid observed was categorized as an Assay Invalid, indicative of improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure. The specimen remained invalid after repeat testing from the original sample.

Table 4. Performance characteristics by site (Patients less than 2 years of age)

Site	Positive Samples			Negative Samples		
	Alethia / Cytotoxic bacterial culture	Sensitivity %	95% CI	Alethia / Cytotoxic bacterial culture	Specificity %	95% CI
Total	28/30**	93.3%	78.7 - 98.2%	156/162	96.3%	92.2 - 98.3%
Site 1	8/8	100%	67.6 - 100%	48/49	98.0%	89.3 - 99.6%
Site 2	20/22	90.9%	72.2 - 97.5%	105/109	96.3%	90.9 - 98.6%
Site 4	0/0	N/A	N/A	2/3	66.7%	20.8 - 93.9%
Site 5	0/0	N/A	N/A	1/1	100%	20.7 - 100%

Table 5. Overall results by patient age

Patient age	Positive Samples			Negative Samples		
	Alethia / Toxigenic culture	Sensitivity %	95% CI	Alethia / Toxigenic culture	Specificity %	95% CI
< 2 years	28/30	93.3%	78.7 - 98.2%	156/162	96.3%	92.2 - 98.3%
≥ 2 - 12 years	10/11	90.9%	62.3 - 98.4%	75/79	94.9%	87.7 - 98.0%
> 12 to 21 years	5/5	100%	56.6 - 100%	53/56	94.6%	85.4 - 98.2%
> 21 years	83/87	95.4%	88.8 - 98.2%	417/437	95.4%	93.0 - 97.0%
Age Unknown	1/1	100%	20.7 - 100%	1/1	100%	20.7 - 100%

ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity of this assay for *C. difficile* was based on 20 replicates for each measurand and with a stated probability (eg, 95% where 19/20 replicates are positive) of obtaining positive responses at the following levels of the measurands:

Strain ID	Toxinotype	Phenotype	LoD/Test
VPI 10463	0	A+/B+	4 CFU/test
2007431	III (NAP1)	A+/B+	32 CFU/test
CFI	VIII	A-/B+	64 CFU/test
2006240	V (NAP7)	A+/B+	32 CFU/test
BI8	III	A+/B+	64 CFU/test
2007858	IX/XXIII	A+/B+	32 CFU/test
8864	X	A-/B+	64 CFU/test

ASSAY REACTIVITY

The following *C. difficile* stock cultures from different sources were tested and produced positive reactions at 64 CFU/test with Alethia *C. difficile*:

Type 0: Strains 10463, 2004111, 2004205, 2005070, 2005257, 2008029, 2008162, 2008341, 2008351, 2009066, 2009099, B1, G1, J7, K12, Y1; Type III: 2004052, 2004118, 2007431, BI17, BI8; Type V: 2005325, 2006240, 2008188, 2009018, 2009065, BK6; Type VIII: 43598, 2008016, CFI; Type X 8864; Type XII 2007435; Type IX/XXIII 2007858; Unknown Type 2009132, 2009155, 2009277.

REPRODUCIBILITY

Blind coded panels of 10 samples were supplied to three independent laboratories for precision studies. Samples were randomly sorted within each panel to mask sample identities. The panels included contrived samples manufactured at the assay limit of detection (n = 3) and just below the limit of blank (ie, high negative sample, n = 3). The panels also included uncharacterized positive (n = 2) and negative (n = 2) samples. Testing was performed by different operators at each site on the same day (intra-assay variability) for five days (inter-assay variability). Three lots of Alethia *C. difficile* were used in this study. The results are given in the table below:

Sample Type	Site 1		Site 2		Site 3		Total	
	Percent agreement		Percent agreement		Percent agreement		Percent agreement	
Negative	20/20	100%	20/20	100%	19/19****	100%	59/59	100%
High Negative	25/30	83%	29/30	97%	28/30	93%	82/90	91%
Low Positive	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%
Positive	20/20	100%	20/20	100%	20/20	100%	60/60	100%

**** 1 specimen generated an instrument invalid test result.

CROSSREACTIVITY STUDIES

Crossreactivity studies were performed with positive and negative stool specimens inoculated with bacterial or fungal organisms to a final concentration of 1.2×10^8 or virus at a minimum of $1 \times 10^{5.06}$ TCID₅₀/mL. None of the following organisms in stool reacted with Alethia *C. difficile*:

Aeromonas hydrophila, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Groups B-E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus Types 40 and 41, Coxsackievirus, Echovirus, Rotavirus.

TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES

The following substances, at the specified saturated solvent/diluents concentrations, do not interfere with test results in the final concentrations listed: Barium sulfate (5 mg/mL), fecal fat (equivalent to 2.65 mg stearic plus 1.3 mg palmitic acids per mL), hemoglobin (as methemoglobin) (3.2 mg/mL), IgA (5 mg/mL), Imodium AD® (0.00667 mg/mL), Kaopectate® (0.87 mg/mL), Metronidazole (12.5 mg/mL), mucin (3.33 mg/mL) Mylanta® (4.2 mg/mL), Pepto-Bismol® (0.87 mg/mL), Prilosec® (0.5 mg/mL), Tagamet® (0.5 mg/mL), TUMS® (0.5 mg/mL), Vancomycin (12.5 mg/mL), white blood cells (5% V/V), whole blood (5% V/V).

alethia®

C. difficile

DNA Amplification Assay

Test di Amplificazione del DNA per il rilevamento di
C. difficile citotossigenico in campioni fecali

REF 480050

IVD

Rx Only

FINALITÀ D'USO

Il test di amplificazione del DNA Alethia *C. difficile*, eseguito sul lettore Alethia, è un test qualitativo diagnostico in vitro per il rilevamento diretto di *C. difficile* tossigenico in campioni di feci umane provenienti da pazienti pediatrici ed adulti con sospetta diarrea associata a *Clostridium difficile* (CDAD).

Il test Alethia *C. difficile* utilizza la tecnologia LAMP (loop-mediated isothermal DNA amplification, amplificazione isoterma di DNA loop-mediata)^{1,2} per rilevare il locus di patogenicità (PaLoc)³ di *Clostridium difficile* tossigenico. Il PaLoc di *Clostridium difficile* è un segmento di gene presente in tutti i ceppi tossigenici noti di *C. difficile*. Il PaLoc di *C. difficile* codifica entrambi i geni della Tossina A (tcdA) e della Tossina B (tcdB), ha regioni terminali conservate e si trova nello stessa posizione sul genoma di *C. difficile* in tutti i ceppi tossigenici.³ Il test Alethia *C. difficile* rileva il PaLoc identificando un frammento parziale di DNA sul gene della Tossina A. La regione target tcdA è stata selezionata come regione conservata presente in tutti i tossinotipi conosciuti A+B+ e A-B+.

Alethia *C. difficile* è da utilizzarsi in laboratori ospedalieri, di riferimento o statali. Il dispositivo non è destinato all'uso ambulatoriale (point of care) al di fuori del laboratorio.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il test per l'analisi molecolare del DNA Alethia *C. difficile* è basato sulla tecnica di amplificazione isoterma loop-mediata, o tecnica LAMP, che utilizza primer specificamente designati per il locus di patogenicità PaLoc allo scopo di fornire un'amplificazione isoterma continua e specifica del DNA. Un sotto-prodotto di questa amplificazione è la formazione di magnesio pirofosfato, che forma un precipitato bianco, rendendo torbida la soluzione di reazione. Questa presenza di torbidità indica una reazione positiva, mentre l'assenza di torbidità indica una reazione negativa. Il test Alethia *C. difficile* contiene primer che amplificano specificatamente una regione di 204 bp della sequenza conservata in 5' del gene tcdA all'interno del PaLoc di *C. difficile* tossigenico in campioni fecali di pazienti con sospetta diarrea associata a *C. difficile* (CDAD). I risultati dell'analisi sono determinati mediante l'utilizzo dell'incubatore/Lettore Meridian Alethia.

Il kit per l'analisi molecolare del DNA Alethia *C. difficile* è costituito da un Apparato per la Preparazione del Campione e un Dispositivo Test. L'Apparato per la Preparazione del Campione, usato per la diluizione e la preparazione del campione, viene riempito di tampone fosfato salino con *Staphylococcus aureus* trattato con formalina. Il Dispositivo Test Alethia *C. difficile* contiene una microsfera liofilizzata in ciascuna delle due camere; la camera del TEST con primer specifici per *C. difficile* e una camera del CONTROLLO con primer specifici per *S. aureus*. Insieme, il DNA di *Staphylococcus aureus* trattato con formalina presente nell'Apparato di Preparazione del Campione e i primer specifici per *S. aureus* presenti nella microsfera liofilizzata della camera del CONTROLLO funzionano da controllo interno per l'analisi Alethia *C. difficile*. Ogni campione viene inserito nell'Apparato di Preparazione del Campione mediante uno spazzolino di prelievo del campione. Il campione prelevato viene diluito in tampone fosfato salino con *Staphylococcus aureus* trattato con formalina, unendo così insieme l'eventuale *C. difficile* presente nel campione con lo *S. aureus*. Il campione prelevato al paziente e il DNA di controllo per lo *S. aureus* vengono esaminati in parallelo nei passaggi di preparazione del campione e la procedura di analisi. Il controllo interno monitora l'inibizione dell'amplificazione, la performance del reagente analitico e l'efficacia del processamento elaborazione del campione. La sequenza target del DNA del Controllo di *S. aureus* deve essere amplificata e rilevata nella reazione finale, altrimenti il test è considerato invalido e i risultati non vengono refertati.

PRINCIPI BIOLOGICI

Il *Clostridium difficile* tossigenico è una delle cause principali di malattie diarroiche e coliti associate agli antibiotici ed è l'agente scatenante di quasi tutti i casi di colite pseudomembranosa. Sebbene circa il 2% degli adulti sani sia colonizzato da *C. difficile*, molti pazienti acquisiscono questo organismo a seguito di infezione nosocomiale. Si ritiene che l'esposizione alla maggior parte degli antibiotici favorisca la proliferazione di *C. difficile* tossigenico distruggendo l'equilibrio della normale flora intestinale. Si ritiene che due grandi tossine proteiche (TcdA [o tossina A] e TcdB [tossina B]) siano i fattori primari della virulenza del *C. difficile*. Queste tossine sono codificate da due geni differenti, chiamati rispettivamente tcdA e tcdB. Insieme con altri tre geni formano il locus di patogenicità di 19,6 kb chiamato PaLoc.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

- Apparato per la Preparazione del Campione Alethia *C. difficile*:** unità per la raccolta del campione costituita da camera per la preparazione del campione, contagocce, tappo e Tampone di Diluizione del campione (tampone fosfato salino e *Staphylococcus aureus* fissato in formalina, con sodio azide (0,09%) come conservante)
- Tampone di reazione Alethia:** soluzione tampone Tris contenente sodio azide (0,09%) come conservante
- Dispositivo Test Alethia *C. difficile*:** due camere separate contenenti microsfere liofilizzate di reagente composto da DNA polimerasi, deossiribonucleotide trifosfato (dNTP) e primer specifici per *C. difficile* (camera del TEST) o primer per *S. aureus* (camera del CONTROLLO)
- Spazzolini per la Raccolta dei Campioni**
- Provette Alethia per il trattamento termico**

MATERIALI FORNITI SEPARATAMENTE

Kit di controllo esterno Alethia, Numero di catalogo: 479920

MATERIALI NON FORNITI

- Guanti di lattice monouso senza talco
- Puntali con filtro per pipette privi di DNase/RNase e resistenti alla contaminazione da aerosol

DISPOSITIVI NON FORNITI

- Blocco termostatico a secco con pozzetti da 12 mm, temperatura massima di 95 °C
- Termometro digitale con registrazione della temperatura massima/minima (e.s. Traceable® Lollipop™ Waterproof/Shockproof Thermometer)
- Vortex
- Timer
- Micropipetta in grado di dispensare 50 µL
- Micropipetta in grado di dispensare 200 µL
- Lettore Alethia

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. Seguire le buone pratiche di laboratorio e il livello 2 di biosicurezza durante l'analisi.⁴ Trattare tutti i campioni ed i Dispositivi Test come in grado di trasmettere agenti infettivi. Non mangiare, bere o fumare nelle aree dove si maneggiano i campioni o i reagenti del kit.
3. Indossare guanti monouso quando si maneggiano i campioni e in seguito lavarsi le mani con cura.
4. Applicare i requisiti indicati nei Programmi di controllo di qualità per i laboratori di diagnostica molecolare.⁵
5. Il Tampone di Diluizione del Campione Alethia contiene organismi inattivati in formalina e deve essere trattato come potenzialmente infettivo.
6. Il Dispositivo Test Alethia C. *difficile* contiene reagenti liofilizzati. Non aprire la busta di protezione finché non si è pronti ad eseguire l'analisi.
7. Il Dispositivo Test Alethia C. *difficile* comprende un sistema di chiusura progettato per prevenire la contaminazione dell'area di lavoro con il prodotto di amplificazione. NON usare Dispositivo Test con linguette di chiusura danneggiate.
8. Eliminare i Dispositivi Test Alethia subito dopo l'uso, lasciando chiuse le linguette. L'apertura del dispositivo dopo l'amplificazione può causare la contaminazione dell'area di lavoro con il prodotto di amplificazione.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

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

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza è indicata sull'etichetta del kit. Conservare il kit ad una temperatura compresa fra 2 e 27 C.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Tipo di campione: campioni non formati indicativi di CDAD.

Campioni di feci umane, senza conservanti: i campioni devono essere trasportati e conservati a 2-8 C prima dell'analisi. I campioni devono essere analizzati il prima possibile, ma possono essere conservati fino a 24 ore a 21-27 C o a 5 giorni a 2-8 C.

Campioni di feci umane, conservati in terreno in base Cary-Blair: i campioni devono essere trasportati e conservati a 2-8 C prima dell'analisi. I campioni devono essere analizzati il prima possibile, ma possono essere conservati fino a un massimo di 5 giorni ad una temperatura compresa fra 2 e 8 C.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Prima dell'uso, accertarsi che i reagenti del kit raggiungano temperatura ambiente (21-27 C). Possono verificarsi risultati incorretti se i reagenti di controllo non sono stati portati a temperatura ambiente prima dell'uso.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

NOTA: accertarsi che lo strumento Alethia sia acceso e le verifiche di funzionamento siano state eseguite prima di avviare la procedura di PREPARAZIONE DEI CAMPIONI. Consultare il Manuale dell'Operatore del lettore Alethia per ulteriori informazioni sulla preparazione e il funzionamento dell'apparecchio.

1. Miscelare bene il campione fecale.
2. Raccogliere il campione miscelato utilizzando lo Spazzolino per la Raccolta dei Campioni.
 - a. Feci liquide: immergere completamente lo spazzolino nel campione.
 - b. Feci semi-solide: ruotare lo Spazzolino per la Raccolta del Campione sulla superficie del campione, in modo che il campione copra leggermente le setole dello spazzolino. Ricoprire approssimativamente metà dello spazzolino; una quantità eccessiva di campione può intasare il dispositivo di raccolta del campione.
3. Inserire lo Spazzolino per la Raccolta del Campione nell'Apparato per la Preparazione del Campione Alethia C. *difficile* contenente il diluente del campione. Spezzare lo Spazzolino per la Raccolta del Campione nel punto contrassegnato con 'Break' ('Rottura') sul manico. Rimettere e fissare il tappo dell'Apparato per la Preparazione del Campione. Per feci in terreno in base Cary-Blair, trasferire 200 µL di campione nell'Apparato per la Preparazione del Campione Alethia C. *difficile* e chiudere bene il tappo. Agitare l'Apparato per la Preparazione del Campione con il vortex per almeno 10 secondi. Prima del trattamento termico il campione nell'Apparato per la Preparazione del Campione Alethia C. *difficile* può essere conservato a 2-27 C fino a 24 ore prima dell'analisi.
4. Rimuovere il tappo dalla punta dell'Apparato per la Preparazione del Campione e premere sui lati per dispensare da cinque a dieci gocce di campione in una Provetta Alethia per il trattamento termico pulita.
5. Ripetere le fasi di preparazione del campione per tutti i campioni da analizzare.
6. Riscaldare le Provette Alethia per il trattamento termico contenenti il campione miscelato inserendole in un bagno a secco/termostatico a 95 +/- 5 C per 10 +/- 2 minuti. Utilizzare il termometro digitale e il timer per monitorare temperatura e tempo.
7. Togliere le Provette dal bagno a secco/termostatico e agitarle con il vortex per almeno 10 secondi. I campioni trattati termicamente possono essere conservati a 2-8 C per 4 ore o possono essere congelati e conservati a ≤ -20 C per 1 giorno prima dell'aggiunta al buffer di reazione. I campioni trattati termicamente possono essere congelati e scongelati una volta.

PROCEDURA DEL TEST

NOTA: è possibile analizzare un massimo di 10 campioni in un singolo ciclo Alethia

1. Trasferire 50 µL di campione trattato termicamente in una provetta con il tampone di reazione Alethia adeguatamente etichettata.
2. Agitare con il vortex la provetta con il tampone di reazione contenente il campione trattato termicamente per circa 10 secondi.
3. Prima di continuare, ripetere i punti 1 e 2 per tutti i campioni da analizzare.
4. Rimuovere dalla relativa busta protettiva un Dispositivo Test Alethia C. *difficile* per ciascun campione da analizzare. Aprire con attenzione il dispositivo sollevando il fermo, tenendo le provette in maniera tale che il reagente liofilizzato non furoriesca al momento dell'apertura. Porre il dispositivo su una superficie piana o inserirlo in un portaprovette di misura adeguata.
5. Usando una micropipetta, trasferire prima 50 µL dalla provetta del Tampone di Reazione contenente il campione trattato termicamente nella camera del TEST (Sinistra/microsfera bianca), poi trasferire 50 µL provetta del Tampone di Reazione contenente il campione trattato termicamente nella camera del CONTROLLO (Destra/microsfera gialla) del Dispositivo Test Alethia. Fare attenzione a non introdurre aria nella miscela di reazione. Non miscelare la soluzione di reazione con la pipetta. Chiudere il Dispositivo Test Alethia assicurando bene la linguetta di chiusura.
6. Picchiettare il Dispositivo Test sul bancone o miscelarlo per rimuovere le bolle d'aria. Esaminare attentamente il Dispositivo Test per verificare la dissoluzione della microsfera di controllo/test e per escludere la presenza di bolle d'aria residue nella provetta e di liquido nella parte superiore del dispositivo. Se si nota la presenza di microsfere non dissolte, bolle d'aria o liquido nei tappi, battere con delicatezza il dispositivo sul ripiano e ripetere l'ispezione visiva. L'amplificazione e il rilevamento devono iniziare entro 15 minuti.
7. Inserire il Dispositivo Test Alethia nel lettore Alethia e dare inizio alla reazione di amplificazione e rilevamento. I risultati saranno visualizzati alla conclusione della seduta.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Identificativo del campione	Risultato Riportato	Interpretazione
Campione del Paziente	POSITIVO	Il campione contiene il ceppo <i>C. difficile</i> tossigenico con il locus patogeno (PaLoc).
	NEGATIVO	Nessun <i>C. difficile</i> tossigenico rilevato.
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere l'analisi utilizzando il campione fecale originale. Campione del paziente con effetto inibitorio, preparazione del campione errata, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
Controllo Positivo	POSITIVO	Risultato del controllo positivo valido. I reagenti sono reattivi al momento dell'utilizzo, l'lettore Alethia funziona correttamente.
	NEGATIVO	Risultato del controllo non corretto. Come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale (in Italia +390331433636).
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere l'analisi dall'inizio utilizzando i campioni fecali originali. Preparazione del campione errata, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
Controllo Negativo	POSITIVO	Risultato del controllo non corretto. Come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale (in Italia +390331433636).
	NEGATIVO	Risultato del controllo negativo valido. I reagenti sono reattivi al momento dell'utilizzo, il lettore Alethia funziona correttamente.
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere l'analisi dall'inizio utilizzando i campioni fecali originali. Preparazione del campione errata, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
POZZETTO VUOTO	NESSUNO	Nessun Dispositivo Test Alethia nel pozzetto del lettore Alethia. O Il Dispositivo Test Alethia presente è compromesso a causa dell' errata preparazione del campione, dispositivo sporco o impropriamente alloggiato. Ripetere il test utilizzando il campione originale.

CONTROLLO QUALITÀ

Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, regionali, nazionali o dagli enti di accreditamento.

- Ciascun dispositivo contiene una camera di controllo interna che controlla l'inibizione dell'amplificazione, i reagenti dell'analisi e l'efficacia nella manipolazione del campione.
- Il passaggio del trattamento termico è monitorato con un termometro esterno ed un timer ad intervalli. Utilizzare un termometro con registrazione della temperatura massima/minima per assicurarsi che sia mantenuta una temperatura di 95 +/- 5 C. Utilizzare il timer ad intervalli per garantire che la durata del trattamento termico sia 10 +/- 2 minuti.
- Una buona pratica di laboratorio richiede l'uso dei reagenti di controllo. Gli utilizzatori devono attenersi alle linee guida vigenti locali, statali e nazionali per l'esecuzione dell'analisi dei controlli di qualità esterni.
- I reagenti del controllo esterno Alethia *C. difficile* sono forniti separatamente (numero di catalogo 479920). La reattività di ciascun nuovo lotto e ciascuna nuova spedizione di Alethia *C. difficile* deve essere verificata alla consegna o prima dell'uso. Le analisi del controllo esterno devono essere eseguite quindi in accordo con le linee guida vigenti locali, statali e nazionali. Il test Alethia *C. difficile* non deve essere usato per l'analisi del paziente se i controlli esterni non producono i risultati corretti.
- È necessario utilizzare un dispositivo differente per ciascun reagente di controllo esterno.
- NON trattare termicamente il Controllo Positivo o Negativo.

VALORI ATTESI

La frequenza d'insorgenza di diarrea associata agli antibiotici causata da *C. difficile* dipende da differenti fattori tra cui la popolazione dei pazienti, il tipo di istituto e l'epidemiologia. L'incidenza di infezioni associate a *C. difficile* (CDAD) in pazienti sospetti di avere patologie associate a terapia antibiotica è del 15-20% sebbene in differenti strutture si possano rilevare percentuali al di sotto o al di sopra di tale intervallo.⁶ L'incidenza di *C. difficile* tossigenico riscontrata in questo studio durante l'anno 2010 è stata pari al 15,5% e 16,1%.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Il test non fa distinzione fra organismi vitali e non vitali.
- I risultati del test devono essere utilizzati insieme alle informazioni ricavate dall'esame clinico del paziente e da altre procedure diagnostiche.
- Questo test è per uso esclusivo con campioni fecali non formati, con conservante o senza conservante. Le prestazioni del test non sono state stabilite con altri tipi di campioni clinici.
- Due distinti gruppi sono stati identificati come portatori asintomatici a elevate percentuali. Colonizzazioni a percentuali fino al 50% e oltre sono state osservate nei bambini e percentuali fino al 32% nei pazienti con fibrosi cistica.^{7,8}
- Questo test non identifica la suscettibilità antimicrobica.
- Questo test rileva ma non distingue il ceppo NAP1 (Ribotipo 027) da altri ceppi tossigenici di *C. difficile*.
- Il rilevamento di acido nucleico batterico è dipendente dalla raccolta idonea del campione, dalla manipolazione (inclusi il trasporto e la conservazione) e la preparazione (diluizione e trattamento termico). Risultati non corretti possono essere osservati nel caso non si seguano le istruzioni per la raccolta, la manipolazione e la preparazione.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Alethia *C. difficile* è stato valutato nel 2010 da quattro laboratori clinici indipendenti situati nel Midwest e nel sud degli Stati Uniti e dal produttore. Due studi indipendenti sono stati condotti per stabilire le prestazioni specifiche per il test. Lo studio clinico è descritto di seguito.

(1) Pazienti di età pari o superiore a 2 anni

Sono stati analizzati 697 campioni qualificati da pazienti di età pari o superiore a 2 anni. I campioni sono stati raccolti da 274 maschi (39,3%) e 419 (60,1%) femmine. Nel caso di 4 pazienti (0,6%), il genere era sconosciuto. L'età del gruppo dei pazienti va dai 2 a 96 anni di età. Nessuna differenza nelle prestazioni del test è stata osservata in relazione all'età o al sesso dei pazienti. Il tasso complessivo di positività per lo studio è stato del 15,5%. La tabella 1 mostra i risultati complessivi per lo studio. La tabella 2 mostra le prestazioni del test distinte per sito clinico.

Tabella 1. Risultati delle prestazioni (pazienti di età pari e superiore a 2 anni)

Coltura batterica citotossica	Alethia <i>C. difficile</i>			
	Positivo	Negativo	Invalido***	Totale
Positivo	99	5**	4	108
Negativo	27*	546	16	589
Totale	126	551	20	697
			95% CI	
Sensibilità	99/104	95,2%	89,2 – 97,9%	
Specificità	546/573	95,3%	93,2 – 96,7%	
Correlazione	645/677	95,3%	93,4 – 96,6%	
Percentuale di Invalidi	20/697	2,9%	N/A	

* 15/27 risultati falsi positivi erano positivi ad un altro test molecolare approvato FDA (Food and Drug Administration). Dei rimanenti 12 risultati falsi positivi, 8 erano positivi ad un test approvato FDA per il rilevamento di GDH.

** 2/5 risultati falsi negativi erano negativi ad un altro test molecolare approvato FDA

*** Sono stati ottenuti risultati invalidi per 20/697 (2,9%) campioni analizzati. Undici (1,6%) tra gli invalidi osservati sono stati classificati come Non Validi al test, indicativi di impropria preparazione del campione, deterioramento del reagente, fallimento dello strumento o fallimento del controllo interno. Uno degli 11 campioni è rimasto invalido dopo la ripetizione del test dal campione originale.

Tabella 2. Caratteristiche delle prestazioni per sito clinico (pazienti di età pari e superiore a 2 anni)

Sito	Campioni Positivi			Campioni Negativi		
	Alethia / coltura batterica citotossica	Sensibilità %	95% CI	Alethia / coltura batterica citotossica	Specificità %	95% CI
Totale	99/104**	95,2%	89,2 – 97,9%	546/573*	95,3%	93,2 – 96,7%
Sito 1	4/5	80,0%	37,6 – 96,4%	58/60	97,6%	88,6 – 99,1%
Sito 2	12/12	100%	75,7 – 100%	62/67	92,5%	83,7 – 96,8%
Sito 3	20/20	100%	83,9 – 100%	87/92	94,6%	87,9 – 97,7%
Sito 4	8/8	100%	67,6 – 100%	36/39	92,3%	79,7 – 97,3%
Sito 5	55/59	93,2%	83,8 – 97,3%	303/315	96,2%	93,5 – 97,8%

(2) Pazienti di età inferiore a 2 anni

Sono stati analizzati 193 campioni qualificati da pazienti di età compresa tra 0 e 24 mesi. I campioni sono stati raccolti da 103 (53,4%) maschi e 90 (46,6%) femmine. Nessuna differenza nelle prestazioni del test è stata osservata in relazione all'età o al sesso. Il tasso complessivo di positività per lo studio è stato del 16,2%. La tabella 3 mostra i risultati complessivi per lo studio. La tabella 4 mostra le prestazioni del test distinte per sito clinico.

Tabella 3. Risultati delle prestazioni (pazienti di età inferiore a 2 anni)

Coltura batterica citotossica	Alethia C. difficile			
	Positivo	Negativo	Invalido ***	Totale
Positiva	28	2**	1	31
Negativa	6*	156	0	162
Totale	34	158	1	193
			95% CI	
Sensibilità	28/30	93,3%	78,7 – 98,2%	
Specificità	156/162	96,3%	92,2 – 98,3%	
Correlazione	184/192	95,8%	91,3 – 97,5%	
Percentuale di Invalidi	1/193	0,5%	N/A	

* 3/6 risultati falsi positivi erano positivi ad un altro test molecolare approvato FDA. Dei rimanenti 3 risultati falsi positivi, tutti erano positivi ad un test approvato FDA per il rilevamento di GDH.

** 1/2 risultati falsi negativi era negativo ad un altro test molecolare approvato FDA.

*** Sono stati ottenuti risultati invalidi per 1/193 (0,5%) campioni analizzati. L'invalido osservato è stato classificato come Non Valido al test, indicativo di impropria preparazione del campione, deterioramento del reagente, fallimento dello strumento o fallimento del controllo interno. Il campione è rimasto invalido dopo la ripetizione del test dal campione originale.

Tabella 4. Caratteristiche delle prestazioni per sito clinico (pazienti di età inferiore a 2 anni)

Sito	Campioni Positivi			Campioni Negativi		
	Alethia / Coltura batterica citotossica	Sensibilità%	95% CI	Alethia / Coltura batterica citotossica	Specificità %	95% CI
Totale	28/30**	93,3%	78,7 – 98,2%	156/162	96,3%	92,2 – 98,3%
Sito 1	8/8	100%	67,6 – 100%	48/49	98,0%	89,3 – 99,6%
Sito 2	20/22	90,9%	72,2 – 97,5%	105/109	96,3%	90,9 – 98,6%
Sito 4	0/0	N/A	N/A	2/3	66,7%	20,8 – 93,9%
Sito 5	0/0	N/A	N/A	1/1	100%	20,7 – 100%

Tabella 5. Risultati per età del paziente

Età del paziente	Campioni Positivi			Campioni Negativi		
	Alethia / coltura tossigenica	Sensibilità %	95% CI	Alethia / coltura tossigenica	Specificità %	95% CI
< 2 anni	28/30	93,3%	78,7 – 98,2%	156/162	96,3%	92,2 – 98,3%
≥ 2 - 12 anni	10/11	90,9%	62,3 – 98,4%	75/79	94,9%	87,7 – 98,0%
> 12 a 21 anni	5/5	100%	56,6 – 100%	53/56	94,6%	85,4 – 98,2%
> 21 anni	83/87	95,4%	88,8 – 98,2%	417/437	95,4%	93,0 – 97,0%
Età non nota	1/1	100%	20,7 – 100%	1/1	100%	20,7 – 100%

SENSIBILITA' ANALITICA

La sensibilità analitica di questo test per C. difficile è stata determinata con 20 replicati per ciascun analita, e con una probabilità fissa di ottenere risultati positivi (ad es. 95% dove 19/20 replicati erano positivi) ai seguenti livelli di analiti:

Ceppo ID	Tossinotipo	Fenotipo	LoD/Test
VPI 10463	0	A+/B+	4 CFU/test
2007431	III (NAP1)	A+/B+	32 CFU/test
CFI	VIII	A-/B+	64 CFU/test
2006240	V (NAP7)	A+/B+	32 CFU/test
BI8	III	A+/B+	64 CFU/test
2007858	IX/XXIII	A+/B+	32 CFU/test
8864	X	A-/B+	64 CFU/test

REATTIVITÀ DEL TEST

Le seguenti colture di C. difficile provenienti da fonti diverse sono state analizzate e hanno prodotto risultati positivi 64 CFU/test con Alethia C. difficile:

Tipo 0: Ceppi 10463, 2004111, 2004205, 2005070, 2005257, 2008029, 2008162, 2008341, 2008351, 2009066, 2009099, B1, G1, J7, K12, Y1; Tipo III: 2004052, 2004118, 2007431, BI17, BI8; Tipo V: 2005325, 2006240, 2008188, 2009018, 2009065, BK6; Tipo VIII: 43598, 2008016, CF1; Tipo X 8864; Tipo XII 2007435; Tipo IX/XXIII 2007858; Tipo Non noto 2009132, 2009155, 2009277.

RIPRODUCIBILITÀ

Pannelli di 10 campioni codificati in cieco sono stati forniti a tre laboratori indipendenti per studi di precisione. I campioni sono stati suddivisi a caso entro ciascun pannello per mascherare l'identità dei campioni. I pannelli includevano campioni artificiali prodotti al limite di rilevazione del test (n = 3) e appena sotto il limite del bianco (cioè, campione alto negativo, n = 3). I pannelli inoltre includevano campioni non caratterizzati positivi (n = 2) e negativi (n = 2). L'analisi è stata eseguita da differenti operatori in ciascun sito lo stesso giorno (variabilità intra-saggio) per cinque giorni (variabilità inter-saggio). Tre lotti di *Alethia C difficile* sono stati utilizzati in questo studio. I risultati sono presentati nella tabella seguente:

Tipo di Campione	Sito 1		Sito 2		Sito 3		Totale	
	Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza	
Negativo	20/20	100%	20/20	100%	19/19****	100%	59/59	100%
Alto Negativo	25/30	83%	29/30	97%	28/30	93%	82/90	91%
Basso Positivo	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%
Positivo	20/20	100%	20/20	100%	20/20	100%	60/60	100%

**** 1 campione ha generato un risultato del test non valido per errore dello strumento

STUDI SULLA CROSS-REATTIVITÀ

Studi sulla cross-reattività sono stati eseguiti utilizzando campioni fecali positivi e negativi inoculati con batteri o funghi con una concentrazione finale di $1,2 \times 10^8$ o virus a un minimo di $1 \times 10^{5,06}$ TCID₅₀/mL. Nessuno dei seguenti organismi inoculati nei campioni fecali ha interferito con *Alethia C. difficile*:

Aeromonas hydrophila, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Groups B-E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus Types 40 e 41, Coxsackievirus, Echovirus, Rotavirus.

ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI

È stato osservato che le seguenti sostanze, se presenti nelle concentrazioni solvente/diluente saturato indicate, non interferiscono con i risultati del test alle concentrazioni finali indicate: Solfato di bario (5 mg/mL), grasso fecale (equivalente a 2,65 mg di acido stearico più 1,3 mg di acido palmitico per mL), emoglobina (come metaemoglobina) (3,2 mg/mL), IgA (5 mg/mL), Imodium AD® (0,00667 mg/mL), Kaopectate® (0,87 mg/mL), Metronidazole (12,5 mg/mL), mucina (3,33 mg/mL) Mylanta® (4,2 mg/mL), Pepto-Bismol® (0,87 mg/mL), Prilosec® (0,5 mg/mL), Tagamet® (0,5 mg/mL), TUMS® (0,5 mg/mL), Vancomycin (12,5 mg/mL), globuli bianchi (5% V/V), sangue intero (5% V/V).

alethia®

C. difficile

DNA Amplification Assay

Test d'amplification de l'ADN pour la détection de
C. difficile toxigène dans les échantillons de selles

REF 480050

IVD

Rx Only

BUT DE LA METHODE

Le test d'amplification ADN Alethia *C. difficile*, obtenu à l'aide de l'instrument Alethia, est un test de diagnostic in vitro qualitatif pour la détection en direct de *Clostridium difficile* toxigène dans les selles humaines de patients (population pédiatrique et adulte) pour lesquels une maladie associée au *Clostridium difficile* est suspectée.

Le test Alethia *C. difficile* utilise la technique dite LAMP (loop-mediated isothermal DNA amplification ou amplification isotherme de l'ADN facilitée par boucle)^{1,2} pour détecter le locus contrôlant la pathogénicité (PaLoc)³ de *Clostridium difficile* toxigène. Le locus PaLoc de *Clostridium difficile* est un segment de gène présent dans toutes les souches toxigènes connues de *C. difficile*. Le locus PaLoc de *C. difficile* comprend à la fois le gène de la toxine A (tcdA) et celui de la toxine B (tcdB). Il contient des régions conservées aux extrémités, et se trouve sur le même site du génome de *C. difficile* dans toutes les souches toxigènes.³ Le test Alethia *C. difficile* détecte le locus PaLoc en ciblant un fragment d'ADN faisant partie du gène de la toxine A. La région cible de tcdA choisie est une région restant intacte pour tous les toxinotypes A+B+ ou A-B+ connus.

Le test Alethia *C. difficile* est conçu pour être utilisé dans les hôpitaux, les centres de référence ou les laboratoires médicaux. Le dispositif n'est pas destiné à être utilisé dans les points-santé dépourvus de laboratoire.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Le test d'amplification de l'ADN Alethia *C. difficile* est fondé sur la technique dite LAMP, qui utilise des amorces spécifiques du locus de pathogénicité PaLoc pour permettre l'amplification isotherme spécifique et continue de l'ADN. Un produit secondaire formé lors de cette amplification, le pyrophosphate de magnésium, forme un précipité blanc entraînant la turbidité de la solution de réaction. La présence de turbidité indique une réaction positive, alors que son absence représente une réaction négative. Le test Alethia *C. difficile* inclut des amorces qui amplifient spécifiquement une région de 204 pb (pb pour paire de bases) parmi la séquence conservée en 5' du gène tcdA dans le locus PaLoc de *C. difficile* toxigène, à partir d'échantillons de selle de patients que l'on soupçonne atteints de diarrhée associée à la présence de cet organisme. Les résultats de ce test sont mesurés à l'aide de l'incubateur / lecteur Alethia de Meridian.

Le test moléculaire ADN Alethia *C. difficile* contient un système de préparation de l'échantillon et un dispositif de test. Le système de préparation de l'échantillon, qui permet la dilution et la préparation des échantillons, est rempli de tampon de phosphate salin et de *Staphylococcus aureus* traité à la formaline. Le dispositif de test Alethia *C. difficile* est formé de deux compartiments séparés contenant chacun une bille de réactif lyophilisé, un puits TEST contenant des amorces spécifiques de *C. difficile* et un puits CONTRÔLE contenant des amorces spécifiques pour *S. aureus*. Le *Staphylococcus aureus* traité à la formaline du système de préparation de l'échantillon et les réactifs lyophilisés des amorces spécifiques pour *S. aureus* du puits CONTRÔLE permettent le contrôle interne pendant le test de l'Alethia *C. difficile*. Chaque échantillon du patient est ajouté au système de préparation de l'échantillon à l'aide d'une brosse d'échantillonnage. L'échantillon du patient est dilué dans un tampon de phosphate salin et *Staphylococcus aureus* traité à la formaline, combinant ainsi tous les gènes *C. difficile* présents dans l'échantillon du patient au *S. aureus*. L'échantillon du patient et la cible de contrôle de *S. aureus* sont traités en parallèle durant les étapes restantes de préparation de l'échantillon et de procédure de test. Le contrôle interne permet de détecter un problème d'inhibition de l'amplification, d'efficacité des réactifs du test ou du traitement des échantillons. Vous devez amplifier et détecter la cible de contrôle de l'ADN du *S. aureus* dans la réaction finale. Dans le cas contraire, le test est considéré comme étant non valide et les résultats du patient ne sont pas reportés.

PRINCIPE DU TEST

Le *Clostridium difficile* toxigène est une des causes principales de diarrhée et de colite; il constitue l'agent causal de virtuellement tous les cas de colite pseudomembraneuse. Bien qu'environ 2 % des adultes sains soient colonisés par *C. difficile*, la plupart des patients acquièrent cet organisme en tant qu'infection nosocomiale. Il est généralement admis que l'exposition à la plupart des antibiotiques permet la prolifération de *C. difficile* toxigène en perturbant la flore intestinale normale. Les facteurs de virulence principaux de *C. difficile* sont vraisemblablement deux toxines de grande taille, TcdA (ou toxine A) et TcdB (ou toxine B). Ces toxines sont codées par deux gènes différents, appelés tcdA et tcdB. En association avec trois autres gènes, elles forment un locus de pathogénicité de 19,6 kb appelé PaLoc.

MATERIEL FOURNI

Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boîte.

- Système de Préparation de l'Echantillon Alethia C. difficile** : unité d'échantillonnage consistant en un compartiment de préparation de l'échantillon, un embout compte-gouttes, un capuchon et du tampon de dilution de l'échantillon (tampon phosphate salin et *Staphylococcus aureus* traité à la formaline, avec azoture de sodium (0,09 %) comme conservateur)
- Tampon de réaction Alethia** : tampon Tris contenant de l'azoture de sodium (0,09 %) comme conservateur
- Dispositif de test Alethia C. difficile** : deux compartiments séparés contenant des billes de réactifs lyophilisés comportant l'ADN polymérase, des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs), et soit des amorces spécifiques de *C. difficile* (puits TEST), soit des amorces pour *S. aureus* (puits CONTRÔLE)
- Brosses d'échantillonnage**
- Tubes pour le traitement thermique Alethia**

MATERIEL FOURNI SEPARÉMENT

Trousse de Réactifs de contrôle externe Alethia, référence: 479920

MATERIEL NON FOURNI

- Gants en latex jetables, non poudrés
- Embouts de pipettes sans désoxyribonucléase/ribonucléase, résistant aux aérosols

EQUIPEMENT NON FOURNI

- Bloc chauffant pour microtubes de 12 mm pouvant atteindre 95 C
- Thermomètre digital avec fonction mémoire des températures Max/Min (p. ex.: Traceable® Lollipop™, Thermomètre Etanche / Résistant aux chocs)
- Mélangeur vortex
- Minuteur
- Micropipette pouvant distribuer 50 µL
- Micropipette pouvant distribuer 200 µL
- Lecteur Alethia

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
2. Suivre les règles de biosécurité de niveau 2 et les bonnes pratiques de laboratoire lors des tests.⁴ Traiter tous les échantillons et dispositifs de test usagés comme infectieux. Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones où les échantillons ou les réactifs sont manipulés.
3. Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons et se laver les mains soigneusement après la procédure.
4. Des programmes de contrôle de la qualité à l'usage des laboratoires de diagnostic moléculaire doivent être utilisés.⁵
5. La solution de dilution de l'échantillon Alethia contient des organismes inactivés à la formaline, et qui doivent toutefois être manipulés comme étant potentiellement infectieux.
6. Le dispositif de test Alethia *C. difficile* contient des réactifs lyophilisés. La pochette de protection ne doit être ouverte que juste avant d'effectuer le test.
7. Le dispositif de test Alethia *C. difficile* comprend un mécanisme de verrouillage conçu pour empêcher la contamination de la zone de test avec le produit de l'amplification. NE PAS utiliser le dispositif dont le loquet est endommagé.
8. Eliminer les dispositifs de test Alethia immédiatement après leur utilisation, en s'assurant de bien laisser le loquet en place. Si le dispositif était ouvert après la procédure, la zone de test pourrait être contaminée avec le produit de l'amplification.

DANGER ET MISES EN GARDE

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

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date de péremption de la trousse est indiquée sur l'étiquette de celle-ci. Conserver la trousse entre 2 et 27 C.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Type d'échantillon: selle non formée (= qui prend la forme du récipient) de patient suspecté de maladie associée au *C. difficile* (CDAD).

Echantillons de selle humaine, sans conservateur: les échantillons de selle doivent être transportés et conservés à 2-8 C avant de procéder au test. Les échantillons doivent être testés dès que possible, mais peuvent être conservés jusqu'à 24H à 21-27 C ou 5 jours à 2-8 C.

Echantillons de selles humaines, conservés dans un milieu de Cary-Blair: les échantillons doivent être transportés et conservés entre 2 et 8 C avant d'effectuer le test. Les échantillons doivent être testés dès que possible, mais peuvent être conservés jusqu'à 5 jours entre 2 et 8 C.

PREPARATION DES REACTIFS

S'assurer que les réactifs de la trousse sont bien à température ambiante (21 à 27 C) avant de les utiliser. En cas de non respect, des résultats incorrects peuvent être observés.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

REMARQUE : s'assurer que l'appareil Alethia est allumé et que les vérifications de performance requises sont terminées avant d'initier la PREPARATION DES ECHANTILLONS. Se reporter au manuel d'utilisation de l'Alethia pour plus d'informations au sujet de la mise en place et l'utilisation de l'appareil.

1. Bien mélanger l'échantillon de selle.
2. Utiliser la brosse d'échantillonnage pour prélever le spécimen mélangé.
 - a. Selle liquide : immerger complètement la brosse d'échantillonnage dans le spécimen.
 - b. Selle semi-solide : imprimer un mouvement de rotation à la brosse d'échantillonnage sur la surface du spécimen afin de couvrir légèrement la surface des poils de brosse. Environ la moitié de la brosse doit être recouverte; une quantité excessive de selle peut entraîner le colmatage du dispositif de collecte de l'échantillon.
3. Insérer la brosse d'échantillonnage dans le Système de préparation de l'Echantillon Alethia *C. difficile* contenant le diluant. Couper la brosse d'échantillonnage au niveau de la marque « Couper » indiquée sur le manche. Replacer et fermer le capuchon du système de préparation de l'échantillon. Pour les selles conservées dans un milieu de type Cary-Blair, transférer 200 µL d'échantillon dans le Système de préparation de l'Echantillon Alethia *C. difficile* et fermer le capuchon. Mélanger le Système de Préparation de l'Echantillon au vortex pendant au moins 10 secondes. Le spécimen dans le Système de Préparation de l'Echantillon peut être conservé avant traitement thermique jusqu'à 24H à 2-27 C avant de procéder au test.
4. Retirer le capuchon de l'embout du Système de Préparation de l'Echantillon et presser celui-ci pour dispenser entre cinq et dix gouttes d'échantillon dans un tube pour le traitement thermique Alethia.
5. Répétez la procédure de préparation des échantillons pour tous les échantillons à traiter.
6. Chauffer les tubes pour le traitement thermique Alethia (contenant les échantillons mélangés) dans un bloc chauffant à 95 +/- 5 C pendant 10 +/- 2 minutes. Utiliser le thermomètre digital et le minuteur pour surveiller la température et le temps.
7. Retirer les tubes du bloc chauffant et mélanger au vortex pendant au moins 10 secondes. Les échantillons traités thermiquement peuvent être conservés pendant 4H à 2-8 C OU peuvent être congelés et conservés à ≤ -20 C pendant 1 jour avant de l'ajouter au tampon de réaction. Les échantillons traités thermiquement peuvent être congelés et décongelés une seule fois.

PROCEDURE DE TEST

REMARQUE : L'Incubateur/Lecteur Alethia peut traiter un maximum de 10 dispositifs de test par série.

1. Transférer 50 µL de l'échantillon traité thermiquement dans un tube de tampon de réaction Alethia marqué de façon appropriée.
2. Chauffer le tube de tampon de réaction contenant l'échantillon traité thermiquement au vortex pendant 10 secondes environ.
3. Répéter les étapes 1 et 2 pour tous les échantillons à analyser avant de continuer.
4. Retirer un dispositif de test Alethia *C. difficile* de sa pochette de protection pour chaque échantillon. Ouvrir le dispositif avec précaution, en soulevant le loquet et en tenant les tubes de sorte que le réactif lyophilisé ne tombe pas au moment de l'ouverture. Placer le dispositif sur une surface plane ou un portoir approprié.
5. À l'aide d'une micropipette, transférer 50 µL du tube de tampon réactionnel contenant l'échantillon traité thermiquement dans le puits TEST (gauche / bille blanche), puis transférer 50 µL du tube de tampon réactionnel contenant l'échantillon traité thermiquement dans le puits CONTRÔLE (droite / bille jaune) du dispositif de test Alethia. Veiller à ne pas introduire d'air dans le mélange réactionnel. Ne pas mélanger les mélanges réactionnels à la pipette. Fermer le dispositif de test Alethia et verrouiller en rabattant le loquet.
6. Agiter, en tapant délicatement par ricochets, le dispositif tout en faisant attention à ne pas introduire des bulles d'air ou à ne pas obtenir du mélange réactionnel dans les bouchons du dispositif. Bien vérifier qu'aucune bulle n'est présente ou qu'aucun liquide réactionnel ne stagne dans les bouchons. Si c'est le cas, taper délicatement le dispositif sur la paillasse et répéter l'inspection visuelle.
7. Insérer le dispositif de test Alethia dans l'Alethia et commencer la réaction d'amplification et de détection. Les résultats s'afficheront à la fin du test.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Identification de l'échantillon	Résultat reporté	Interprétation
Echantillon de Patient	POSITIF	L'échantillon contient une souche <i>C. difficile</i> toxigène présentant le locus de pathogénicité (PaLoc)
	NEGATIF	Aucun <i>C. difficile</i> toxigène détecté.
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat. Répéter le test à partir de l'échantillon de selle original. Echantillon inhibiteur, préparation de l'échantillon incorrecte, erreur de l'incubateur/lecteur, échec du contrôle interne.
Contrôle Positif	POSITIF	Résultat de Contrôle Positif valide. Les réactifs sont actifs au moment de leur utilisation, l'Alethia fonctionne correctement.
	NEGATIF	Résultat de contrôle incorrect. La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat. Répéter l'entièreté du test en utilisant les selles originales. Préparation de l'échantillon incorrecte, réactif non opérant, erreur de l'incubateur/lecteur ou échec du contrôle interne.
Contrôle Négatif	POSITIF	Résultat de contrôle incorrect. La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.
	NEGATIF	Résultat de Contrôle Négatif valide. Les réactifs sont actifs au moment de leur utilisation, l'Alethia fonctionne correctement.
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat. Répéter l'entièreté du test en utilisant les selles originales. Préparation de l'échantillon incorrecte, réactif non opérant, erreur de l'incubateur/lecteur ou échec du contrôle interne.
PUITS VIDE	AUCUN	Aucun dispositif de test dans le puits de l'instrument Alethia. OU Il n'y a pas de résultat pour le dispositif de test Alethia présent à cause d'une erreur de préparation de l'échantillon, d'un dispositif sale ou mal installé. Répéter le test en utilisant les selles originales.

CONTROLE DE QUALITE

Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.

- Chaque dispositif contient un puits de contrôle interne qui permet de déceler un problème d'inhibition de l'amplification, d'efficacité des réactifs du test ou de traitement des échantillons.
- L'étape de traitement thermique est contrôlée à l'aide d'un thermomètre externe et un minuteur. Utiliser la fonction de mémoire des températures Max/Min atteintes pour s'assurer que la température est maintenue à 95 +/- 5 C. Utiliser un minuteur pour le contrôle des 10 minutes +/- 2 minutes de traitement thermique.
- Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'utilisation de réactifs de contrôle. Les utilisateurs doivent suivre les directives locales, régionales et/ou nationales relatives à l'utilisation de contrôles externes de qualité.
- Les réactifs de contrôle externe Alethia *C. difficile* peuvent être obtenus séparément (Référence du catalogue 479920). Il est recommandé que la réactivité de chaque nouveau lot et chaque nouvelle livraison de trousse Alethia *C. difficile* soient vérifiées à la réception ou avant usage. Les tests de contrôle externe doivent être effectués en fonction des exigences locales, fédérales et/ou nationales. La trousse Alethia *C. difficile* ne devrait pas être utilisée pour les tests d'échantillons de patient lorsque les contrôles ne produisent les résultats escomptés.
- Un dispositif différent doit être utilisé pour chaque contrôle externe testé.
- NE PAS traiter thermiquement les contrôles positif ou négatif.

VALEURS ATTENDUES

La fréquence des diarrhées associées aux antibiotiques et provoquées par *C. difficile* dépend de différents facteurs, comme la population de patients, le type d'institution, et l'épidémiologie. L'incidence reportée des infections associées à *C. difficile* chez les patients chez qui on soupçonne une infection associée aux antibiotiques est de 15-20 % bien que des laboratoires différents puissent obtenir des taux de positivité supérieurs ou inférieurs.⁶ Pendant la période de cette étude en 2010, une incidence de 15,5 % et de 16,1 % ont été observées.

LIMITES DU TEST

- Le test ne fait pas la distinction entre les organismes viables et non viables.
- Les résultats du test doivent être utilisés en association avec les informations disponibles d'évaluation clinique du patient et des autres procédures de diagnostic.
- Ce test est uniquement destiné à être utilisé sur des selles non formées (qui prennent la forme du récipient) conservées ou sans conservateur. Les performances du test sur d'autres types d'échantillons n'ont pas été établies.
- Deux groupes distincts, porteurs asymptomatiques de *C. difficile* à taux élevés, ont pu être identifiés. Des colonisations à des taux de 50 % ou plus ont été observés chez les enfants ainsi que des taux jusqu'à 32 % chez des patients atteints de mucoviscidose.^{7,8}
- Ce test ne précise pas la susceptibilité aux antibiotiques.
- Ce test détecte mais ne distingue pas la souche NAP1 (Ribotype 027) des autres souches *C. difficile* toxigènes.
- La détection des acides nucléiques de la bactérie dépend du prélèvement, de la manipulation (y compris le transport et la conservation) et de la préparation (dilution et traitement thermique). Des résultats incorrects peuvent être observés en cas de non respect des instructions de prélèvement, de manipulation et/ou de préparation.

PERFORMANCES DU TEST

La trousse Alethia *C. difficile* a été évaluée en 2010 par quatre laboratoires cliniques indépendants situés dans les régions du Midwest et du Sud des Etats-Unis ainsi que chez le producteur. Deux études séparées ont été effectuées pour l'établissement des performances du test. Les informations sur les études cliniques sont décrites ci-dessous.

(1) Patients âgés de 2 ans et plus

697 échantillons qualifiés de patients âgés de 2 ans et plus ont été évalués. Parmi ceux-ci, 274 (39,3 %) provenaient d'hommes et 419 (60,1 %) de femmes. Dans 4 (0,6 %) des patients, le sexe n'était pas connu. L'âge des patients varie de 2 ans à 96 ans. Aucune différence dans les performances du test n'a été observée en fonction de l'âge ou du sexe du patient. Le taux global de positivité pour cette étude était de 15,5 %. Le tableau 1 montre les données de performance globale de cette étude. Le tableau 2 montre les performances du test par site.

Tableau 1. Données de performances (patients âgés de 2 ans et plus)

Culture toxigénique	Alethia <i>C. difficile</i>			
	Positif	Négatif	Non valide***	Total
Positif	99	5**	4	108
Négatif	27*	546	16	589
Total	126	551	20	697
			95 % IC	
Sensibilité	99/104	95,2 %	89,2 – 97,9 %	
Spécificité	546/573	95,3 %	93,2 – 96,7 %	
Corrélation	645/677	95,3 %	93,4 – 96,6 %	
Taux de non valides	20/697	2,9 %	N/A	

* 15/27 des résultats faussement positifs ont été observés positifs avec un autre test moléculaire approuvé par la FDA (Food and Drug Administration). Des 12 résultats faussement positifs restants, 8 ont été observés positifs avec un test GDH approuvé par la FDA.

** 2/5 résultats faussement négatifs ont été observés négatifs avec un autre test moléculaire approuvé par la FDA.

*** Les résultats non valides ont été obtenus pour 20/697 (2,9 %) des échantillons testés. Onze (1,6 %) des non valides observés ont été classés comme TEST non valide, indicatif d'un manquement au niveau de la préparation de l'échantillon ou d'un des réactifs ou de l'instrument ou de l'échec du contrôle interne. Seul 1 des 11 échantillons est resté non valide après répétition du test sur l'échantillon original.

Tableau 2. Performances par site (patients âgés de 2 ans et plus)

Site	Echantillons Positifs			Echantillons Négatifs		
	Alethia / Culture toxigénique	Sensibilité %	95 % IC	Alethia / Culture toxigénique	Spécificité %	95 % IC
Total	99/104**	95,2 %	89,2 – 97,9 %	546/573*	95,3 %	93,2 – 96,7 %
Site 1	4/5	80,0 %	37,6 – 96,4 %	58/60	97,6 %	88,6 – 99,1 %
Site 2	12/12	100 %	75,7 – 100 %	62/67	92,5 %	83,7 – 96,8 %
Site 3	20/20	100 %	83,9 – 100 %	87/92	94,6 %	87,9 – 97,7 %
Site 4	8/8	100 %	67,6 – 100 %	36/39	92,3 %	79,7 – 97,3 %
Site 5	55/59	93,2 %	83,8 – 97,3 %	303/315	96,2 %	93,5 – 97,8 %

(2) Patients âgés de moins de 2 ans

193 échantillons qualifiés de patients âgés de 0 à 24 mois ont été évalués. Parmi ceux-ci, 103 (53,4 %) provenaient de garçons et 90 (46,6 %) de filles. Aucune différence dans les performances du test n'a été observée en fonction de l'âge ou du sexe du patient. Le taux global de positivité pour cette étude était de 16,2 %. Le tableau 3 montre les données de performance globale de cette étude. Le tableau 4 montre les performances du test par site.

Tableau 3. Données de performances (patients âgés de moins de 2 ans)

Culture toxigénique	Alethia C. difficile			
	Positif	Négatif	Non valide***	Total
Positif	28	2**	1	31
Négatif	6*	156	0	162
Total	34	158	1	193
			95 % IC	
Sensibilité	28/30	93,3 %	78,7 – 98,2 %	
Spécificité	156/162	96,3 %	92,2 – 98,3 %	
Corrélation	184/192	95,8 %	91,3 – 97,5 %	
Taux de non valides	1/193	0,5 %	N/A	

* 3/6 des résultats faussement positifs ont été observés positifs avec un autre test moléculaire approuvé par la FDA. Des 3 résultats positifs restants, tous ont été observés positifs avec un test GDH approuvé par la FDA.

** 1/2 résultat faussement négatif a été observés négatif avec un autre test moléculaire approuvé par la FDA.

*** Les résultats non valides ont été observés pour 1/193 (0,5 %) des échantillons testés. Le résultat non valide a été classé comme TEST non valide, indicatif d'un manquement au niveau de la préparation de l'échantillon ou d'un des réactifs ou de l'instrument ou de l'échec du contrôle interne. L'échantillon est resté avec un résultat non valide après répétition du test sur l'échantillon original.

Tableau 4. Performances par site (patients âgés de moins de 2 ans)

Site	Echantillons Positifs			Echantillons Négatifs		
	Alethia / Culture toxigénique	Sensibilité %	95 % IC	Alethia / Culture toxigénique	Sensibilité %	95 % IC
Total	28/30**	93,3 %	78,7 – 98,2 %	156/162	96,3 %	92,2 – 98,3 %
Site 1	8/8	100 %	67,6 – 100 %	48/49	98,0 %	89,3 – 99,6 %
Site 2	20/22	90,9 %	72,2 – 97,5 %	105/109	96,3 %	90,9 – 98,6 %
Site 4	0/0	N/A	N/A	2/3	66,7 %	20,8 – 93,9 %
Site 5	0/0	N/A	N/A	1/1	100 %	20,7 – 100 %

Tableau 5. Résultats globaux par tranche d'âge

Age du patient	Echantillons Positifs			Echantillons Négatifs		
	Alethia / Culture toxigénique	Sensibilité %	95 % IC	Alethia / Culture toxigénique	Spécificité %	95 % IC
< 2 ans	28/30	93,3 %	78,7 – 98,2 %	156/162	96,3 %	92,2 – 98,3 %
≥ 2 - 12 ans	10/11	90,9 %	62,3 – 98,4 %	75/79	94,9 %	87,7 – 98,0 %
> 12 - 21 ans	5/5	100,0 %	56,6 – 100 %	53/56	94,6 %	85,4 – 98,2 %
> 21 ans	83/87	95,4 %	88,8 – 98,2 %	417/437	95,4 %	93,0 – 97,0 %
Age inconnu	1/1	100 %	20,7 – 100 %	1/1	100 %	20,7 – 100 %

SENSIBILITE ANALYTIQUE

La sensibilité analytique de ce test pour le *C. difficile* est basée sur 20 réplicats pour chaque mesurande avec une probabilité fixe (p. ex. 95 % où 19/20 réplicats sont positifs) d'obtenir des réponses positives aux niveaux suivants de mesurande:

Identification de la souche	Toxinotype	Phénotype	LdD/Test
VPI 10463	0	A+/B+	4 CFU/test
2007431	III (NAP1)	A+/B+	32 CFU/test
CFI	VIII	A-/B+	64 CFU/test
2006240	V (NAP7)	A+/B+	32 CFU/test
BI8	III	A+/B+	64 CFU/test
2007858	IX/XXIII	A+/B+	32 CFU/test
8864	X	A-/B+	64 CFU/test

REACTIVITE DU DOSAGE

Les cultures de *C. difficile* suivantes provenant de différentes sources ont été testées et ont donné des réactions positives à 64 CFU/test avec le test Alethia C. difficile :

Type 0: Souches 10463, 2004111, 2004205, 2005070, 2005257, 2008029, 2008162, 2008341, 2008351, 2009066, 2009099, B1, G1, J7, K12, Y1; Type III: 2004052, 2004118, 2007431, BI17, BI8; Type V: 2005325, 2006240, 2008188, 2009018, 2009065, BK6; Type VIII: 43598, 2008016, CF1; Type X 8864; Type XII 2007435; Type IX/XXIII 2007858; Type Inconnu 2009132, 2009155, 2009277.

REPRODUCTIBILITE DU TEST

Des panels de 10 échantillons, codés à l'aveugle, ont été fournis à trois laboratoires indépendants pour des études de précision. Les échantillons ont été triés de façon aléatoire pour chaque panel afin de masquer l'identité de l'échantillon. Les panels comprenaient des échantillons artificiels à la limite de détection du test (n = 3) et des échantillons justes en dessous de la limite de positivité (à savoir, échantillon négatif élevé, n = 3). Les panels comprenaient également des positifs (n = 2) et négatifs (n = 2) non caractérisés. Les tests ont été effectués par des opérateurs différents sur chaque site le même jour (variabilité intra-dosage), pendant cinq jours (variabilité inter-test). Trois lots de Alethia *C difficile* ont été utilisés dans cette étude. Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous:

	Site 1		Site 2		Site 3		Total	
Type d'échantillon	Pourcentage de concordance		Pourcentage de concordance		Pourcentage de concordance		Pourcentage de concordance	
Négatif	20/20	100 %	20/20	100 %	19/19****	100 %	59/59	100 %
Négatif élevé	25/30	83 %	29/30	97 %	28/30	93 %	82/90	91 %
Positif faible	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	90/90	100 %
Positif	20/20	100 %	20/20	100 %	20/20	100 %	60/60	100 %

**** 1 seul échantillon a donné un résultat non valide avec l'instrument.

REACTIONS CROISEES

Les études de réaction croisée ont été effectuées avec des échantillons de selles positifs et négatifs inoculés avec des organismes bactériens ou fongiques à une concentration finale de $1,2 \times 10^8$ ou virale allant de $1 \times 10^{5,06}$ TCID₅₀/mL. Aucun des organismes suivants, présents dans les selles, n'a réagi avec le test Alethia *C. difficile*:

Aeromonas hydrophila, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Groupes B-E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus Types 40 et 41, Coxsackievirus, Echovirus, Rotavirus.

TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

Les substances suivantes, présentes dans les selles humaines aux concentrations indiquées, n'ont provoqué aucune interférence sur les résultats du test: sulfate de baryum (5 mg/mL), graisses fécales (équivalentes à 2,65 mg d'acide stéarique plus 1,3 mg d'acide palmitique par mL), hémoglobine (en tant que méthémoglobine) (3,2 mg/mL), IgA (5 mg/mL), Imodium AD® (0,00667 mg/mL), Kaopectate® (0,87 mg/mL), Metronidazole (12,5 mg/mL), mucine (3,33 mg/mL) Mylanta® (4,2 mg/mL), Pepto-Bismol® (0,87 mg/mL), Prilosec® (0,5 mg/mL), Tagamet® (0,5 mg/mL), TUMS® (0,5 mg/mL), Vancomycin (12,5 mg/mL), globules blancs (5 % V/V), sang total (5 % V/V).

alethia®

C. difficile

DNA Amplification Assay

Prueba de amplificación de DNA para la detección de
C. difficile citotoxigénico en muestras de materia fecal

REF 480050

IVD

Rx Only

USO INDICADO

La prueba de amplificación de DNA Alethia *C. difficile*, se lleva a cabo en el Alethia, y es una prueba in vitro diagnóstica cualitativa para la detección directa de *Clostridium difficile* toxigénico en muestras de heces humanas de pediátrico y adulto pacientes que se sospechan tener diarrea asociada con *C. difficile* (CDAD en inglés).

La prueba Alethia *C. difficile* utiliza la tecnología de amplificación de DNA isotérmica de lazo-mediado (LAMP)^{1,2} para detectar el locus de patogenicidad (PaLoc)³ de *Clostridium difficile* toxigénico. El PaLoc de *Clostridium difficile* es un segmento del gene que está presente en todas las cepas toxigénicas de *C. difficile*. El PaLoc de *C. difficile* codifica tanto el gen de la toxina A (*tcdA*) como el gen de la toxina B (*tcdB*), tiene regiones conservadas en sus extremos y se encuentra en el mismo sitio del genoma de *C. difficile* de todas las cepas toxigénicas.³ La prueba Alethia *C. difficile* detecta el PaLoc mediante el reconocimiento específico de un fragmento de DNA en el gen de la toxina A. La región blanco de *tcdA* que se seleccionó es una región que se conserva intacta en todas las cepas conocidas de toxinotipos A+B+ y A-B+.

El uso de la prueba Alethia *C. difficile* es para hospitales, y laboratorios de tipo de referencia o estatales. El dispositivo no es para uso en punto-de-cuido sin laboratorio.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

La prueba de amplificación de DNA Alethia *C. difficile* se basa en la tecnología de amplificación isotérmica de lazo-mediado que utiliza cebadores diseñados específicamente para el locus de patogenicidad PaLoc, con el objeto de proporcionar una amplificación isotérmica de DNA continua y específica. Un producto intermediario de esta amplificación es la formación de pirofosfato de magnesio, que forma un precipitado blanco que confiere turbidez a la solución de reacción. La presencia de turbidez significa que la reacción es positiva, mientras que la ausencia de turbidez significa que la reacción es negativa. La prueba Alethia *C. difficile* contiene cebadores que amplifican específicamente una región de 204 pb en la secuencia conservada 5' del gen *tcdA*, dentro del PaLoc, en el *C. difficile* toxigénico, en muestras de materia fecal diarreica de pacientes que se sospecha que tienen diarrea asociada con *C. difficile* (CDAD en inglés). Los resultados de la prueba se determinan mediante el Incubador / Lector Alethia de Meridian.

El kit de ensayo molecular de ADN del Alethia *C. difficile* incluye un Ensamble para preparar las muestras y un Dispositivo para la Prueba. El Ensamble para preparar las muestras, utilizado para la dilución y preparación de la muestra, se llena con solución salina tamponada con fosfato y *Staphylococcus aureus* tratado con formol. El dispositivo de prueba del Alethia *C. difficile* contiene una liosfera de reactivo seco en cada una de las dos cámaras; una cámara de TEST con cebadores específicos para *C. difficile* y una cámara de CONTROL con cebadores específicos para *S. aureus*. Juntos, el *Staphylococcus aureus* tratado con formol en el Ensamble para preparar las muestras y los cebadores específicos para el *S. aureus* en la liosfera de la cámara de CONTROL, funcionan como control interno para el ensayo del Alethia *C. difficile*. Cada una de las muestras del paciente se añade al Ensamble para preparar las muestras mediante una Escobilla para la recolección de muestras. La muestra del paciente se diluye en solución salina tamponada con fosfato y *Staphylococcus aureus* tratado con formol, combinando el *C. difficile* presente en la muestra del paciente con *S. aureus*. La muestra del paciente y el blanco de control *S. aureus* se procesan en paralelo mediante los pasos restantes de la preparación de la muestra y mediante el procedimiento de la prueba. El control interno monitoriza la inhibición de la amplificación, el rendimiento de los reactivos del ensayo y la eficacia del procesamiento de la muestra. El blanco de ADN del *S. aureus* del control debe amplificarse y detectarse en la reacción final, o la prueba se considerará no válida, y no se darán a conocer los resultados del paciente.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

El *Clostridium difficile* toxigénico es una de las principales causas de diarrea y colitis asociadas con el uso de antibióticos, y es el agente etiológico de casi todos los casos de colitis pseudomembranosa. A pesar de que aproximadamente un 2 % de los adultos sanos están colonizados con *C. difficile*, muchos pacientes contraen este microorganismo a través de una infección hospitalaria. Se cree que el tratamiento con la mayoría de los antibióticos permite la proliferación del *C. difficile* toxigénico porque alteran la flora intestinal normal. Se cree que dos proteínas grandes, TcdA (o toxina A) y TcdB (o toxina B), son los factores de virulencia principales producidos por *C. difficile*. Estas toxinas están codificadas en dos genes distintos que se denominan *tcdA* y *tcdB* respectivamente. Junto con tres genes más constituyen un locus de patogenicidad de 19,6 Kb llamado PaLoc.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

El número máximo de pruebas que se puede obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.

- Ensamble para preparar las muestras de Alethia *C. difficile*:** La unidad de muestreo consiste en una cámara para preparación de muestra, una punta con gotero, una tapa y el Tampón de Dilución de muestra (solución tamponada con fosfato y *Staphylococcus aureus* tratado con formol y azida de sodio (0,09%) como conservante)
- Tampón de Reacción de Alethia:** Solución tamponada con Tris que contiene azida de sodio (0,09%) como conservante
- Dispositivo para la Prueba Alethia *C. difficile*:** Dos cámaras separadas que contienen liosferas de reactivo seco compuestas por DNA-polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y ya sea cebadores específicos para *C. difficile* (cámara de TEST) o cebadores para *S. aureus* (cámara de CONTROL)
- Escobillas para recolección de muestras**
- Tubos para Tratamiento de Calor Alethia**

MATERIALES PROPORCIONADOS POR SEPARADO

Equipo de Control Externo Alethia, número de catálogo: 479920

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

- Guantes de látex desechables sin talco
- Puntas para micropipetas con protección contra aerosoles libres de DNAasa y RNAasa

EQUIPOS NO PROPORCIONADOS

- Baño seco con bloque calefactor de 12 mm capaz de alcanzar los 95 C
- Termómetro digital con memoria max/min de temperatura (e.j. Traceable® Lollipop™ Waterproof/Shockproof Thermometer)
- Agitador vorticial (Vórtex)
- Cronómetro de intervalos.
- Micropipeta capaz de dispensar 50 µL
- Micropipeta capaz de dispensar 200 µL
- Alethia lector

PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
2. Siga las prácticas de Bioseguridad de Nivel 2 durante la ejecución de la prueba.⁴ Trate todas las muestras y los Dispositivos de Prueba como agentes capaces de transmitir infección. No coma ni beba ni fume en las áreas en las que se estén manejando muestras o reactivos del equipo.
3. Use guantes desechables mientras maneje las muestras y lávese las manos cuidadosamente al terminar.
4. Deben emplearse los Programas de Control de Calidad para laboratorios que hacen pruebas moleculares.⁵
5. El Tampón de Dilución de Muestra Alethia contiene organismos inactivados con formalina y debe tratarse como si fuera potencialmente infeccioso.
6. El Dispositivo para la Prueba Alethia *C. difficile* contiene reactivos liofilizados. La bolsa protectora no debe abrirse hasta que no esté todo listo para realizar la prueba.
7. El Dispositivo para la Prueba Alethia *C. difficile* contiene un sistema de cierre diseñado para prevenir la contaminación del área de la prueba con el producto de amplificación. NO use Dispositivos para la Prueba con cierres dañados.
8. Inmediatamente después del procedimiento, deseche los Dispositivos para la Prueba Alethia, y asegúrese de que la pestaña de cierre del dispositivo está en su sitio. La apertura del dispositivo después de la amplificación puede causar contaminación del área de prueba con producto de amplificación.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

No se conoce ningún riesgo asociado con este producto.

VIDA ÚTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad está indicada en la etiqueta de la caja. Almacene entre 2-27 C.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Tipo de Muestra: Heces no-formadas indicativas de CDAD.

Muestras de materia fecal humana sin conservar: Las muestras deben ser transportadas y almacenarse a una temperatura de 2-8 C antes de analizarse. Las muestras deben analizarse tan pronto como sea posible, pero pueden mantenerse hasta 24 horas a 21-27 C o 5 días a 2-8 C.

Muestras de materia fecal humana conservadas en medio de transporte Cary-Blair: Las muestras deben ser transportadas y almacenadas a 2-8 C antes de analizarlas. Las muestras deben analizarse tan pronto como sea posible, pero pueden mantenerse hasta 5 días a 2-8 C.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Asegúrese de que los reactivos hayan alcanzado la temperatura ambiente (21-27 C) antes de usarlos. Resultados incorrectos pueden resultar si los reactivos no alcanzan temperatura ambiente antes de ser usados.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

NOTA: Asegúrese de que el instrumento Alethia esté encendido y de que las verificaciones de funcionamiento requeridas para el mismo se hayan completado antes de iniciar la PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. Consulte el Manual del operador de Alethia para obtener información adicional sobre cómo configurar y operar el instrumento.

1. Mezcle la muestra de materia fecal cuidadosamente.
2. Recoja la muestra mezclada mediante la Escobilla para recolección de muestra.
 - a. Materia fecal líquida: Sumerja completamente en la muestra la Escobilla para recolección de muestra.
 - b. Materia fecal sólida o semisólida: Rote la Escobilla para recolección de muestra sobre la superficie de la muestra, recubriendo ligeramente la superficie de las cerdas de la Escobilla. Debe cubrirse aproximadamente la mitad de la Escobilla; la recolección excesiva de materia fecal puede hacer que se obstruya el dispositivo para recolectar la muestra.
3. Coloque la Escobilla para Recolección de Muestra dentro del Ensamble para preparar la muestra que contiene el Tampón de Dilución de Muestra Alethia *C. difficile*. Rompa la Escobilla para recolección de muestras por la marca "Break" (romper) del mango. Vuelva a poner la tapa en el Ensamble para preparar las muestras y ciérrelo bien. Si la muestra está en medio de Cary-Blair, añada con una micropipeta 200 µL de muestra al Ensamble para preparar la muestra que contiene el Tampón de Dilución de Muestra Alethia *C. difficile* y cierre la tapa. Agite la mezcla en un agitador vorticial (vórtex) por lo menos 10 segundos. Muestras en el Ensamble para preparar muestras Alethia *C. difficile* pueden ser retenidas a 2-27 C hasta 24 horas antes del paso de tratamiento de calor.
4. Remueva la tapa de la punta con gotero del Ensamble y oprímalo para obtener entre cinco y diez gotas de muestra que se deben recoger en un Tubos para Tratamiento de Calor Alethia.
5. Repita los pasos de preparación de la muestra con todas las muestras que van a ser procesadas.
6. Incube los tubos de Tratamiento de Calor que contienen la muestra mezclada en un baño seco con el bloque calefactor a 95 +/- 5 C durante 10 +/- 2 minutos. Use el termómetro digital y el cronómetro para monitorear la temperatura y el tiempo.
7. Retire los tubos del baño seco y mézclelos en un agitador vorticial por 10 segundos. Una vez tratadas con calor las muestras pueden ser retenidas a 2-8 C por 4 horas O pueden ser congeladas y almacenadas a ≤ -20 C por 1 día antes de ser añadidas al Tampón de Reacción. Muestras tratadas con calor pueden ser congeladas y descongeladas una vez.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

NOTA: Se pueden procesar un máximo de 10 muestras por cada Alethia.

1. Transfiera 50 µL de la muestra tratada con calor a un tubo con Tampón de Reacción de Alethia adecuadamente marcado.
2. Mezcle en un agitador vorticial por 10 segundos el tubo con Tampón de Reacción que contiene la muestra tratada con calor.
3. Repita los pasos 1 y 2 con todas las muestras que van a ser analizadas antes de proseguir.
4. Por cada muestra, saque un Dispositivo para la Prueba Alethia *C. difficile* de la bolsa protectora en la que vienen. Abra el dispositivo con cuidado, levantando el cierre y sujetando los tubos de modo que el reactivo liofilizado no se caiga al abrirlo. Coloque el dispositivo en una superficie plana o en una gradilla que pueda acomodarlo.
5. Usando una micropipeta, primero transfiera 50 µL del Tampón de Reacción tratado con calor a la cámara de TEST (lado izquierdo/Perla Blanca), y luego transfiera 50 µL del Tampón de Reacción tratada con calor a la cámara de CONTROL (lado derecho/Perla Amarilla) en el Dispositivo de Prueba Alethia. Tenga cuidado de no introducir aire a la mezcla de reacción. No mezcle las reacciones con pipeta. Cierre el Dispositivo de Prueba Alethia y asegure que el cierre queda seguro.
6. Gentilmente mezcle el Dispositivo golpeando ligeramente, con cuidado de no introducir burbujas de aire o de llevar la mezcla de reacción a la tapa. Cuidadosamente examine el tubo de reacción para burbujas de aire o líquido en la tapa. Si hay burbujas de aire o líquido en la tapa, golpee el dispositivo en el tope del banco y repita la inspección visual.
7. Introduzca cada Dispositivo para la Prueba Alethia dentro del Alethia e inicie la reacción de amplificación y detección. Los resultados se mostrarán al concluir la prueba.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

ID de Muestra	Reporte de Resultados	Interpretación
Muestra de Paciente	POSITIVO	Muestra contiene <i>C. difficile</i> toxigénico el cual contiene el locus de patogenicidad (PaLoc).
	NEGATIVO	No se detecta <i>C. difficile</i> toxigénico .
	INVÁLIDO	Resultado no reportable. Repita la prueba usando la muestra original. Muestra inhibitoria, preparación inadecuada de la muestra, falla de los reactivos, falla del instrumento o falla de los controles internos.
Control Positivo	POSITIVO	Resultado de Control Positivo Valido. Reactivos activos al momento de uso, Alethia funcionó correctamente.
	NEGATIVO	Resultado de control Incorrecto. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.
	INVÁLIDO	Resultado no reportable. Repita el procedimiento completo usando la muestra original. Preparación inadecuada de la muestra, falla de los reactivos, falla del instrumento o falla de los controles internos.
Control Negativo	POSITIVO	Resultado de control incorrecto. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.
	NEGATIVO	Resultado de Control Negativo Valido. Reactivos activos al momento de uso, Alethia funcionó correctamente.
	INVÁLIDO	Resultado no reportable. Repita el procedimiento completo usando la muestra original. Muestra inhibitoria, preparación inadecuada de la muestra, falla de los reactivos, falla del instrumento o falla de los controles internos.
POCILLO VACÍO	NINGUNO	No Dispositivo de Prueba Alethia en el pocillo del Alethia. O El Dispositivo de Prueba Alethia presente es dudoso dado una falla en la preparación de la muestra, dispositivo sucio o introducido inapropiadamente. Repita la prueba usando la muestra original.

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.

- Cada dispositivo contiene un pocillo de control interno que controla la inhibición de la amplificación, los reactivos de la prueba y la eficacia del procesamiento de la muestra.
- El paso de tratamiento de calor es monitoreado con un termómetro externo y cronómetro. Use la memoria Max/Min del termómetro para asegurar que la temperatura se mantuvo a 95 +/- 5 C. Use el cronómetro para asegurarse que el tratamiento de calor dura 10 +/- 2 minutos.
- Una buena práctica de laboratorio recomienda el uso de sustancias de control. Los usuarios deben ceñirse a las pautas federales, estatales y locales apropiadas con respecto a cómo realizar controles de calidad externos.
- Los Reactivos de Control Externo Alethia *C. difficile* se suplen por separado (Cat. # 479920). Se recomienda que la reactividad de cada lote nuevo y cada embarque nuevo de Alethia *C. difficile* sea verificado al recibirse o antes de usar. Los Controles Externos deben ser realizados periódicamente de ahí en adelante. La prueba Alethia *C. difficile* no debe ser usada para pruebas de pacientes si los controles externos no producen los resultados correctos.
- Se debe usar un dispositivo separado por cada control externo.
- NO trate con calor las muestras de Control Positivo o Negativo.

VALORES ESPERADOS

La frecuencia de la diarrea asociada a antibióticos causada por *C. difficile* depende de varios factores incluyendo la población de pacientes, el tipo de institución y la epidemiología. La incidencia que se reporta de enfermedad causada por *C. difficile* en pacientes con enfermedad asociada a antibióticos es de 15-20%, aunque diferentes facilidades pueden encontrar niveles de positividad fuera de esta gama.⁶ La incidencia de *C. difficile* toxigénico durante éste estudio en el 2010 fue de 15,5% y 16,1%.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La prueba no distingue entre organismos viables y organismos no viables.
- Los resultados de la prueba deben usarse simultáneamente con la información disponible a partir de la evaluación clínica del paciente y de otros procedimientos diagnósticos.
- Esta prueba es para uso de muestras de heces no-formadas, preservadas o sin preservar solamente. Características de ejecución de otro tipo de muestra clínica no han sido establecidas.
- Dos grupos distintos han sido identificados el cual pueden albergar *C. difficile* asintóticamente en índices altos. Colonización a índices de 50% o más han sido reportado en infantes y en índices hasta 32% en pacientes de fibrosis quística.^{7,8}
- Este ensayo no identifica susceptibilidad antimicrobiana.
- Este prueba detecta pero no diferencia la cepa NAP1 (Ribotipo 027) de otras cepas toxigénicas de *C. difficile*.
- La detección del ácido nucleico bacteriano depende de la recolección apropiada de la muestra, el manejo (incluyendo transporte y almacenaje) y la preparación (dilución y tratamiento de calor). El no seguir instrucciones para la recolección de muestra, manejo y preparación puede causar resultados incorrectos.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Alethia *C. difficile* fue evaluado en el 2010 en cuatro instituciones indendientes localizadas en las regions del Medio-Oeste y Sur de los Estados Unidos. La información a cerca de la ejecución se encuentra en la Tabla 1. Se llevaron a cabo dos estudios individuales para establecer las características de ejecución de ensayo. La información de los estudios clínicos está descrita abajo.

(1) Pacientes mayores de 2 años de edad

Un total de 697 muestras calificadas de pacientes mayores de 2 años de edad fueron evaluadas. Muestras fueron obtenidas de 274 (39,3%) hombres y 419 (60,1%) mujeres. El género fue desconocido en 4 (0,6%) muestras. El grupo de edades de los pacientes fue de 2 años a 96 años. No se observó diferencia en la ejecución de la prueba basado en género o edad. El índice de positividad del estudio fue 15,5%. Tabla 1 demuestra la data de ejecución del estudio en general. Tabla 2 demuestra la ejecución de la prueba por lugar de estudio.

Tabla 1. Data de ejecución (Pacientes mayores de 2 años de edad)

Cultivo bacteriano Citotoxigénico	Alethia <i>C. difficile</i>			
	Positivo	Negativo	Invalido***	Total
Positivo	99	5**	4	108
Negativo	27*	546	16	589
Total	126	551	20	397
			95% CI	
Sensitividad	99/104	95,2%	89,2 – 97,9%	
Especificidad	546/573	95,3%	93,2 – 96,7%	
Correlación	645/677	95,3%	93,4 – 96,6%	
Indice de Invalidos	20/697	2,9%	N/A	

* 15/27 muestras falsas-positivas dieron resultados positivos por un ensayo molecular que ha sido autorizado por la FDA. De los 12 falsos-positivos restantes, 8 dieron resultados positivos por un ensayo para GDH (Antígeno Común) de *C. difficile* que ha sido autorizado por la FDA.

** 2/5 muestras falsas-negativas dieron resultados negativos por un ensayo molecular que ha sido autorizado por la FDA

*** Resultados invalidos fueron obtenidos en 20/697 (2,9%) de las muestras. Once (1,6%) de los resultados invalidos fueron categorizados como “Ensayo Invalido”, indicando que la muestra fue impropriamente preparada, fayo del reactivo o faya del control interno. Una de las 11 muestras permaneció invalida luego de repetir la prueba con la muestra original.

Tabla 2. Características de Ejecución por Localidad (Pacientes de mayores de 2 años de edad)

Lugar	Muestras Positivas			Muestras Negativas		
	Alethia / Cultivo bacteriano Citotoxigénico	Sensitividad %	95% CI	Alethia / Cultivo bacteriano Citotoxigénico	Especificidad %	95% CI
Total	99/104**	95,2%	89,2 – 97,9%	546/573*	95,3%	93,2 – 96,7%
Lugar 1	4/5	80,0%	37,6 – 96,4%	58/60	97,6%	88,6 – 99,1%
Lugar 2	12/12	100%	75,7 – 100%	62/67	92,5%	83,7 – 96,8%
Lugar 3	20/20	100%	83,9 – 100%	87/92	94,6%	87,9 – 97,7%
Lugar 4	8/8	100%	67,6 – 100%	36/39	92,3%	79,7 – 97,3%
Lugar 5	55/59	93,2%	83,8 – 97,3%	303/315	96,2%	93,5 – 97,8%

(2) Pacientes de menos de 2 años de edad

Un total de 193 muestras cualificadas de pacientes de 0 meses a 24 meses fueron evaluadas. Muestras fueron obtenidas de 103 (53,4%) varones y 90 (46,6%) niñas. No se observó diferencia en la ejecución de la prueba basado en género o edad. El índice de positividad del estudio fue 16,2%. Tabla 3 demuestra la data de ejecución del estudio en general. Tabla 4 demuestra la ejecución de la prueba por lugar de estudio.

Tabla 3. Data de ejecución (Pacientes de menos de 2 años de edad)

Cultivo bacteriano Citotoxigénico	Alethia C. difficile			
	Positivo	Negativo	Invalido***	Total
Positivo	28	2**	1	31
Negativo	6*	156	0	162
Total	34	158	1	193
95% CI				
Sensitividad	28/30	93,3%	78,7 – 98,2%	
Especificidad	156/162	96,3%	92,2 – 98,3%	
Correlación	184/192	95,8%	91,3 – 97,5%	
Índice de Invalidos	1/193	0,5%	N/A	

* 3/6 resultados falsos positivos dieron positivos por otro ensayo molecular aprobado por la FDA. Los restantes 3 falsos positivos dieron positivo por un ensayo aprobado por la FDA para la detección de GDH.

**1/2 resultados falsos negativos dieron negativo por otra prueba molecular aprobada por la FDA.

***Resultados invalidos fueron obtenidos en 1/193 (0,5%) de las muestras. El resultado invalido fue categorizado como "Ensayo Invalido", indicando que la muestra fue impropriadamente preparada, fayo del reactivo o faya del control interno. La muestra permaneció invalida luego de repetir la prueba con la muestra original.

Tabla 4. Características de ejecución por localidad (Paciented de menos de 2 años de edad)

Lugar	Muestras Positivas			Muestras Negativas		
	Alethia / Cultivo bacteriano Citotoxigénico	Sensitividad %	95% CI	Alethia / Cultivo bacteriano Citotoxigénico	Especificidad %	95% CI
Total	28/30**	93,3%	78,7 – 98,2%	156/162	96,3%	92,2 – 98,3%
Lugar 1	8/8	100%	67,6 – 100%	48/49	98,0%	89,3 – 99,6%
Lugar 2	20/22	90,9%	72,2 – 97,5%	105/109	96,3%	90,9 – 98,6%
Lugar 4	0/0	N/A	N/A	2/3	66,7%	20,8 – 93,9%
Lugar 5	0/0	N/A	N/A	1/1	100%	20,7 – 100%

Tabla 5. Resultados generales por edad

Edad del Paciente	Muestras Positivas			Muestras Negativas		
	Alethia / Cultivo bacteriano Toxigénico	Sensitividad %	95% CI	Alethia / Cultivo bacteriano Toxigénico	Especificidad %	95% CI
< 2 años	28/30	93,3%	78,7 – 98,2%	156/162	96,3%	92,2 – 98,3%
≥ 2 - 12 años	10/11	90,9%	62,3 – 98,4%	75/79	94,9%	87,7 – 98,0%
> 12 a 21 años	5/5	100%	56,6 – 100%	53/56	94,6%	85,4 – 98,2%
> 21 años	83/87	95,4%	88,8 – 98,2%	417/437	95,4%	93,0 – 97,0%
Edad desconocida	1/1	100%	20,7 – 100%	1/1	100%	20,7 – 100%

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica de este ensayo para C. difficile fue basado en 20 pruebas por cada mensurado y con una probabilidad declarada (ej. 95% donde 19/20 replicas son positivas) de obtener un resultado positivo en los siguientes niveles de mensurados:

ID de Cepa	Toxinotipo	Fenotipo	LoD/Prueba
VPI 10463	0	A+/B+	4 CFU/prueba
2007431	III (NAP1)	A+/B+	32 CFU/prueba
CFI	VIII	A-/B+	64 CFU/prueba
2006240	V (NAP7)	A+/B+	32 CFU/prueba
BI8	III	A+/B+	64 CFU/prueba
2007858	IX/XXIII	A+/B+	32 CFU/prueba
8864	X	A-/B+	64 CFU/prueba

REACTIVIDAD DE LA PRUEBA

Los siguientes cultivos de reserva obtenidos de diferentes fuentes fueron analizados y produjeron reacciones positivas a una concentración de 64 CFU/prueba con la Prueba Alethia C. difficile:

Tipo 0: Cepas 10463, 2004111, 2004205, 2005070, 2005257, 2008029, 2008162, 2008341, 2008351, 2009066, 2009099, B1, G1, J7, K12, Y1; Tipo III: 2004052, 2004118, 2007431, BI17, BI8; Tipo V: 2005325, 2006240, 2008188, 2009018, 2009065, BK6; Tipo VIII: 43598, 2008016, CF1; Tipo X 8864; Tipo XII 2007435; Tipo IX/XXIII 2007858; Tipo desconocido 2009132, 2009155, 2009277.

REPRODUCIBILIDAD

Paneles de 10 muestras codificados a ciegas fueron suplidos a tres laboratorios independientes para estudios de precisión. Las muestras estaban mezcladas en diferente orden para poder ocultar su identidad. El panel incluía muestras artificiales manufacturadas al límite de detección de la prueba (n = 3) y justo debajo del límite del blanco (ej. Muestras negativas-altas, n = 3). El panel también incluía muestras sin caracterizar positivas (n = 2) y negativas (n = 2). El análisis fue ejecutado por diferentes operadores en cada localidad el mismo día (variabilidad intra-ensayo) por 5 días (variabilidad inter-ensayo). Tres lotes de Alethia C. difficile fueron usado en este estudio. Los resultados se encuentran en la tabla siguiente:

Tipo de Muestra	Lugar 1		Lugar 2		Lugar 3		Total	
	Porcentaje de acuerdo		Porcentaje de acuerdo		Porcentaje de acuerdo		Porcentaje de acuerdo	
Negativo	20/20	100%	20/20	100%	19/19****	100%	59/59	100%
Negativo- Alto	25/30	83%	29/30	97%	28/30	93%	82/90	91%
Positivo-Bajo	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%
Positivo	20/20	100%	20/20	100%	20/20	100%	60/60	100%

**** 1 muestra generó un resultado inválido por instrumento

ESTUDIOS DE REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizaron estudios de reactividad cruzada con muestras positivas y negativas de materia fecal inoculada con organismos bacterianos o con hongos a una concentración final de 1,2 x 10⁸ o con virus a una concentración desde a un mínimo de 1 x 10^{5,06} TCID₅₀/mL. Ninguno de los siguientes organismos presents en la materia fecal reaccionó con la prueba Alethia C. difficile:

Aeromonas hydrophila, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Citrobacter freundii, Clostridium sordellii, Clostridium perfringens, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Escherichia coli O157:H7, Escherichia fergusonii, Escherichia hermannii, Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Lactococcus lactis, Listeria monocytogenes, Peptostreptococcus anaerobius, Plesiomonas shigelloides, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Salmonella Groups B-E, Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Shigella boydii, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica, Adenovirus Types 40 y 41, Coxsackievirus, Echovirus, Rotavirus.

PRUEBAS PARA SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las siguientes sustancias, a las concentraciones especificadas de solvente/diluyente saturado no interfirieron con los resultados de la prueba a las concentraciones finales anotadas: Sulfato de bario (5 mg/mL), grasa fecal (equivalente a 2,65 mg de ácido esteárico más 1,3 mg de ácido palmítico por mL), hemoglobina como metahemoglobina (3,2 mg/mL), IgA (5 mg/mL), Imodium AD® (0,00667 mg/mL), Kaopectate® (0,87 mg/mL), Metronidazole (12,5 mg/mL), mucina (3,33 mg/mL) Mylanta® (4,2 mg/mL), Pepto-Bismol® (0,87 mg/mL), Prilosec® (0,5 mg/mL), Tagamet® (0,5 mg/mL), TUMS® (0,5 mg/mL), Vancomycin (12,5 mg/mL), glóbulos blancos (5% V/V), sangre total (5% V/V).

alethia®

C. difficile

DNA Amplification Assay

DNA-Amplifikationsassay zum Nachweis von toxischen
C. difficile Stämmen in Stuhlproben

REF 480050

IVD

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Der am Alethia Instrument durchgeführte DNA-Amplifikationsassay Alethia C. difficile ist ein qualitativer In-vitro-Diagnostiktest für den direkten Nachweis von toxischen C. difficile in Human-Stuhlproben von pädiatrischen und erwachsenen Patienten, die vermutlich an einer mit Clostridium difficile assoziierten Erkrankung (Clostridium difficile-associated disease, kurz CDAD) leiden.

Der Alethia C. difficile-Assay verwendet eine DNA-LAMP-Technik (Loop-mediated Isothermal Amplification)^{1, 2} um den Pathogenitätslokus (PaLoc)³ der toxischen Clostridium difficile Stämme nachzuweisen. Beim Clostridium difficile-PaLoc handelt es sich um ein Gensegment, das alle bekannte toxische C. difficile-Stämme aufweisen. Der C. difficile-PaLoc kodiert für das Toxin A-Gen (tcdA), sowie auch für das Toxin B-Gen (tcdB), umfasst konservierte Grenzregionen und tritt bei allen toxischen Stämmen an derselben Stelle des C. difficile-Genoms auf.³ Der Alethia C. difficile-Assay weist den PaLoc nach, indem er auf ein partielles DNA-Fragment des Toxin A-Gens abzielt. Es wurde tcdA als Zielregion gewählt, die eine konservierte Region ist und sich in allen bekannten toxischen Clostridium difficile Stämmen A+B+ und A-B+ befindet.

Der Alethia C. difficile Assay ist für den Einsatz in Krankenhauslabors, Referenzlabors oder staatlichen Labors vorgesehen. Das Verfahren ist nicht für eine Point-of-Care-Testing außerhalb des Labors vorgesehen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Der Alethia C. difficile DNA-Amplifikationsassay beruht auf der LAMP-Technik (Loop-mediated Isothermal Amplification), die speziell für den PaLoc-Pathogenitätslokus entwickelte Primer einsetzt, um für eine spezifische und kontinuierliche isotherme DNA-Amplifikation zu sorgen. Ein Nebenprodukt dieser Amplifikation ist Magnesiumpyrophosphat, dessen Bildung sich in Form einer weißen Ausfällung äußert und dadurch zu einer trüben Reaktionslösung führt. Das Vorliegen einer Trübung bedeutet eine positive Reaktion, während das Fehlen einer Trübung eine negative Reaktion bedeutet. Der Alethia C. difficile-Assay enthält spezifische Primer für die Amplifikation einer 204-bp-Region der konservierten 5'-Sequenz des tcdA-Gens innerhalb des PaLoc des toxischen C. difficile in diarrhöartigen Stuhlproben von Patienten, bei denen CDAD vermutet wird. Die Ergebnisse des Assays werden mit dem Alethia-Inkubator/Lesegerät von Meridian bestimmt.

Das Alethia C. difficile DNA-Amplifikationsassaykit umfasst einen Probenvorbereitungsapparat und ein Analysegefäß. Der zur Verdünnung und Vorbereitung von Proben verwendete Probenvorbereitungsapparat ist mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung und Formalin-behandeltem Staphylococcus aureus gefüllt. Das Alethia C. difficile Analysegefäß enthält zwei Kammern mit je einer Trockenreagenz-Lyosphäre; eine TEST-Kammer mit C. difficile-spezifischen Primern und eine KONTROLL-Kammer mit S. aureus-spezifischen Primern. Zusammen funktionieren der Formalin-behandelte Staphylococcus aureus im Probenvorbereitungsapparat und die S. aureus-spezifischen Primer in der KONTROLL-Kammerlyosphäre als interne Kontrolle für den Alethia C. difficile Assay. Jede Patientenprobe wird mithilfe eines Probenahmebürstchens in den Probenvorbereitungsapparat eingegeben. Die Patientenprobe wird in phosphatgepufferter Kochsalzlösung und Formalin-behandeltem Staphylococcus aureus verdünnt, so dass in der Patientenprobe vorhandenes C. difficile mit S. aureus kombiniert wird. Die Patientenprobe und das S. aureus Kontrollziel werden parallel durch die übrigen Probenvorbereitungsschritte und das Testverfahren verarbeitet. Die Amplifikationsinhibition, Assayreagenzleistung und Effizienz der Probenverarbeitung werden von der internen Kontrolle überwacht. Das Kontroll-S. aureus-DNA-Ziel muss amplifiziert und in der endgültigen Reaktion erkannt werden oder der Test wird als ungültig erachtet und die Patientenergebnisse werden nicht berichtet.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Toxische Clostridium difficile Stämme sind hauptsächlich Erreger von Antibiotika-assoziiierter Diarrhö und Kolitis, und Erreger nahezu sämtlicher Fälle von pseudomembranöser Kolitis. Obwohl etwa 2 % der gesunden Erwachsenen mit C. difficile kolonisiert sind, erwerben viele Patienten diesen Organismus durch eine nosokomiale Infektion. Es wird davon ausgegangen, dass die Wirkung der meisten Antibiotika eine Proliferation des toxischen C. difficile durch Störung der normalen Darmflora ermöglicht. Von zwei großen Toxinproteinen (TcdA [oder Toxin A] und TcdB [Toxin B]) wird angenommen, dass sie die primären Virulenzfaktoren von C. difficile sind. Diese Toxine werden von zwei unterschiedlichen Genen codiert: tcdA bzw. tcdB. Zusammen mit drei weiteren Genen bilden sie einen 19,6-kb-Pathogenitätslokus mit dem Namen PaLoc.

REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Außenseite der Packung angegeben.

- Alethia C. difficile-Probenvorbereitungsapparat:** Probennahmeeinheit, bestehend aus Probenvorbereitungskammer, Tropferspitze, Verschlusskappe und Probenverdünnungspuffer (mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung und Formalin behandelte Staphylococcus aureus, mit Natriumazid (0,09 %) als Konservierungsmittel)
- Alethia-Reaktionspuffer:** Tris-gepufferte Lösung mit Natriumazid (0,09 %) als Konservierungsmittel
- Alethia C. difficile-Analysegefäß:** Zwei separate Kammern, die Trockenreagenz-Lyosphären aus DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTPs) und entweder für C. difficile spezifischem Primer (TEST-Kammer) oder S. aureus-Primer (KONTROLL-Kammer) enthalten
- Probennahmebürstchen**
- Alethia-Hitzebehandlungsröhrchen**

SEPARAT BESTELLBARE MATERIALIEN

Alethia Externe Kontrollen-Kit, Bestell-Nr: 479920

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

- Einmal-Handschuhe aus Latex, puderfrei
- DNase/RNase-freie, aerosolresistente Pipettenspitzen

NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE GERÄTSCHAFTEN

- Trockenbad mit 12-mm-Heizblock (95 C-Kapazität)
- Digitalthermometer mit Max/Min-Temperaturspeicher (z.B. Traceable® Lollipop™ Thermometer, wasserdicht/schlagfest)
- Vortexmischer
- Intervallzeitgeber
- Mikropipette mit Abgabekapazität von 50 µL
- Mikropipette mit Abgabekapazität von 200 µL
- Alethia Inkubator/Lesegerät

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
2. Befolgen Sie empfohlene Gesichtspunkten (Bio-Sicherheit Stufe 2) und gute Laborpraktiken (GLP) während des Tests.⁴ Alle Proben und verbrauchte Testgeräte als POTENZIELLE BIOHAZARD-STOFFE behandeln. In Bereichen, in denen Proben oder Kit-Reagenzien gehandhabt werden, darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
3. Bei der Handhabung von Proben stets Einmal-Handschuhe tragen und danach die Hände gründlich waschen.
4. Es sollten Qualitätssicherungsprogramme für Labors eingesetzt werden, die Molekulartests durchführen.⁵
5. Der Alethia-Probenverdünnungspuffer enthält mit Formalin inaktivierte Organismen, und sollte wie potentiell biogefährliches Material entsorgt werden.
6. Das Alethia *C. difficile*-Analysegefäß enthält lyophilisierte Reagenzien. Der Schutzbeutel sollte erst unmittelbar vor der Durchführung des Assays geöffnet werden.
7. Das Alethia *C. difficile*-Analysegefäß besitzt eine Verschlusslasche, die vor Kontaminierung des Testbereichs durch das Amplifikationsprodukt schützen soll. KEINE Analysegefäße mit defekten Verschlusslaschen verwenden.
8. Gebrauchte Alethia-Analysegefäße unmittelbar nach der Verarbeitung entsorgen und die Verschlusslasche dabei fest geschlossen belassen. Falls das Analysegefäß nach der Amplifikation geöffnet wird, könnte der Testbereich durch das Amplifikationsprodukt kontaminiert werden.

GEFAHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

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

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum ist auf dem Kit-Etikett angegeben. Das Kit bei 2–27 °C lagern.

PROBENNAHME UND –VORBEREITUNG

Probentyp: ungeformte Proben die auf "Clostridium difficile assoziierte Diarrhoe" (CDAD) hindeuten

Humane Stuhlproben, ohne Konservierungsmittel: Die Proben müssen in luftdicht verschlossene Transportbehälter eingegeben werden und bis zum Testen bei 2-8 °C gelagert werden. Die Proben sind so bald wie möglich zu testen, können jedoch bei 21-27 °C bis zu 24 Stunden oder bei 2-8 °C bis zu 5 Tagen aufbewahrt werden.

Humane Stuhlproben, in Cary-Blair-Medium konserviert: Die Proben müssen in luftdicht verschlossene Transportbehälter eingegeben werden und bis zum Testen bei 2-8 °C gelagert werden. Die Proben sind so bald wie möglich zu testen, können jedoch bei 2-8 °C bis zu 5 Tagen aufbewahrt werden.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Sicherstellen, dass die Kit-Reagenzien vor der Verwendung Zimmertemperatur (21-27 °C) erreicht haben. Werden die Reagenzien vor dem Einsatz nicht auf Zimmertemperatur gebracht, kann dies zu inkorrekten Ergebnissen führen.

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

HINWEIS: Sicherstellen, dass das Alethia-Lesegerät eingeschaltet ist und die erforderlichen Leistungsüberprüfungen vor dem Einleiten der PROBENVORBEREITUNG abgeschlossen wurden. Bezüglich weiterer Angaben zur Einrichtung und Bedienung des Geräts bitte das Alethia-Benutzerhandbuch einsehen.

1. Stuhlprobe gründlich mischen.
2. Mit Hilfe des Probennahmestrichs eine gemischte Probe entnehmen.
 - a. Flüssiger Stuhl: Das Probennahmestrich vollständig in die Probe eintauchen.
 - b. Halbfester Stuhl: Das Probennahmestrich über die Probenoberfläche drehen, sodass die Borsten leicht beschichtet werden. Etwa die halbe Bürste sollte beschichtet sein; eine zu große Probenmenge könnte das Probennahmegerät verstopfen.
3. Das Probennahmestrich in den Alethia *C. difficile* Probenvorbereitungsapparat mit dem Probenverdünnungspuffer einbringen. Das Probennahmestrich an der „Bruch“-Stelle am Griff abbrechen. Die Kappe des Probenvorbereitungsapparats wieder aufsetzen und sichern. Für Stuhlproben im Cary-Blair-Medium, 200 µL der Probe in den Alethia *C. difficile* Probenvorbereitungsapparat einbringen und die Verschlusskappe anbringen. Den Probenvorbereitungsapparat mindestens 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer mischen. Proben im Alethia *C. difficile* Probenvorbereitungsapparat können vor der Wärmebehandlung bei 2-27 °C bis zu 24 Stunden aufbewahrt werden.
4. Die Spitzenkappe des Probenvorbereitungsapparats entfernen und fünf bis zehn Tropfen der Probe in ein sauberes Alethia- Hitzebehandlungsröhrchen auspressen.
5. Die Probenvorbereitungsschritte für alle zu verarbeitenden Proben wiederholen.
6. Die Alethia- Hitzebehandlungsröhrchen mit dem Probengemisch 10 +/- 2 Minuten lang in einem Trockenbad/Heizblock bei 95 +/- 5 °C erhitzen. Temperatur und Zeit mithilfe des Digitalthermometers und des Intervallzeitgebers überwachen.
7. Die Röhrchen aus dem Trockenbad/Heizblock nehmen und etwa 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer mischen. Die wärmebehandelten Proben können jedoch bei 2-8 °C bis zu 4 Stunden ODER bei ≤ -20 °C 1 Tag vor Zugabe in das Reaktionspufferröhrchen aufbewahrt werden. Hitzebehandelte Proben können einmal eingefroren und aufgetaut werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

HINWEIS: Bei einem einzigen Alethia-Lauf können maximal 10 Proben verarbeitet werden.

1. 50 µL der hitzebehandelte Probe in ein entsprechend gekennzeichnetes Alethia-Reaktionspufferröhrchen transferieren.
2. Das Reaktionspufferröhrchen mit der hitzebehandelten Probe ca. 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer mischen.
3. Vor dem weiteren Vorgehen die Schritte 1 und 2 für alle zu analysierenden Proben durchführen.
4. Für jede Probe ein Alethia *C. difficile*-Analysegefäß aus dem Schutzbeutel nehmen. Öffnen Sie vorsichtig das Gerät, indem Sie die Sperrvorrichtung anheben, und halten Sie die Röhrchen so, dass das lyophilisierte Reagenz beim Öffnen nicht herausfällt. Das Analysegefäß auf einer ebenen Fläche oder in einem Gestell platzieren.
5. Überführen Sie Sie mit einer Mikropipette zunächst 50 µL des Reaktionspuffers, der die hitzebehandelte Probe enthält, in die TEST-Kammer (Links, weißes Kügelchen) und anschließend 50 µL des Reaktionspuffers, der die hitzebehandelte Probe enthält, in die KONTROLL-Kammer (Rechts, gelbes Kügelchen) des Alethia-Analysegefäßes. Achten Sie dabei darauf, dass keine Luft in das Reaktionsgemisch kommt. Mischen Sie die Reaktionen nicht mit der Pipette. Schließen Sie das Alethia-Analysegefäß und sichern Sie sorgfältig die Sperrvorrichtung.
6. Mischen Sie jedes Analysegefäß behutsam durch Klopfen oder Schnippen und achten Sie darauf, dass keine Luftblasen entstehen und die Reaktionsmischung nicht in den Deckel des Analysegefäßes gelangt. Untersuchen Sie vorsichtig, ob Luftblasen im Testgerät sind oder ob sich Flüssigkeit im Deckel befindet. Falls Luftblasen oder Flüssigkeit zu erkennen sind, klopfen Sie das Analysegefäß vorsichtig auf die Arbeitsfläche und wiederholen Sie die Sichtkontrolle.
7. Das Alethia-Analysegefäß in das Alethia Lesegerät geben und die Amplifikationsreaktion und den Nachweis starten. Die Ergebnisse werden nach dem Abschluss des Laufs angezeigt.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Proben ID	Angezeigte Ergebnisse	Interpretation
Patientenproben	POSITIV	Proben, die toxische <i>C. difficile</i> Stämme mit dem Pathogenitätslokus (PaLoc) aufweisen.
	NEGATIV	Kein Nachweis von toxischen <i>C. difficile</i> Stämmen.
	UNGÜLTIG	Kein auswertbares Ergebnis. Den Test mit der ursprünglichen Stuhlprobe wiederholen. Inhibitoren in der Patientenprobe, unsachgemäße Probenvorbereitung, Versagen des Reagenzes, Versagen des Instruments oder Versagen der internen Kontrolle
Positive Kontrolle	POSITIV	Gültiges positives Kontrollergebnis. Die Reagenzien waren während der Testdurchführung aktiv, der Alethia Reader ist einwandfrei gelaufen
	NEGATIV	Unkorrektes Kontrollergebnis. Wiederholen Sie als ersten Schritt die Kontrolltests, um die Fehlerquelle zu ermitteln. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Vertriebspartner.
	UNGÜLTIG	Kein auswertbares Ergebnis. Den ganzen Test mit den ursprünglichen Stuhlproben wiederholen. Unsachgemäße Probenvorbereitung, Versagen des Reagenzes, Versagen des Instruments oder Versagen der internen Kontrolle.
Negative Kontrolle	POSITIV	Unkorrektes Kontrollergebnis. Wiederholen Sie als ersten Schritt die Kontrolltests, um die Fehlerquelle zu ermitteln. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Vertriebspartner.
	NEGATIV	Gültiges negatives Kontrollergebnis. Die Reagenzien waren während der Testdurchführung aktiv, Alethia Reader ist einwandfrei gelaufen.
	UNGÜLTIG	Kein auswertbares Ergebnis. Den ganzen Test mit den ursprünglichen Stuhlproben wiederholen. Unsachgemäße Probenvorbereitung, Versagen des Reagenzes, Versagen des Instruments oder Versagen der internen Kontrolle
LEERE VORRICHTUNG	KEINE	Kein Alethia Analysegefäß in der Vertiefung des Alethia Lesegeräts. ODER Das vorhandene Alethia Analysegefäß ist wegen unsachgemäßer Probenvorbereitung, eines schmutzigen Analysegefäßes oder wegen eines falsch platzierten Gefäßes beeinträchtigt. Den Test mit der ursprünglichen Stuhlprobe wiederholen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Führen Sie den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durch.

- Jedes Analysegefäß besitzt eine interne Kontrollvertiefung, die die Amplifikationsinhibition, Assayreagenzien und Effizienz der Probenverarbeitung kontrolliert.
- Der Hitzebehandlungsschritt wird mithilfe eines externen Digitalthermometers und Intervallzeitgebers überwacht. Mit dem Max/Min-Temperaturspeicher des Thermometers sicherstellen, dass eine Temperatur von 95 +/- 5 C beibehalten wird. Mit dem internen Zeitgeber sicherstellen, dass die Dauer der Hitzebehandlung 10 +/- 2 Minuten beträgt.
- Die Regeln der guten Laborpraxis empfehlen den Einsatz von Kontrollmaterialien. Benutzer sollten entsprechende bundesstaatliche, nationale und lokale Richtlinien bezüglich des Einsatzes externer Qualitätskontrollen.
- Die Alethia *C. difficile* externen Kontrollen sind separat erhältlich (Bestellnummer 479920). Die Reaktivität jeder neuen Kit-Chargennummer und- jeder neuen Lieferung eines Alethia *C. difficile* Tests sollte nach Erhalt oder vor Verwendung geprüft werden. Allerdings, ist die Anzahl der zusätzlich durchzuführenden Tests mit externen Kontrollen abhängig von den örtlichen, staatlichen oder bundesstaatlichen Bestimmungen, sowie zulassungsbehördlichen Auflagen. Das Alethia *C. difficile* Test-Kit nicht verwenden, wenn die Kontrolltests keine korrekten Ergebnisse erbringen.
- Für jede Kontrolle muss ein separates Analysegefäß verwendet werden.
- Die externen positiven und negativen Kontrollen KEINER Hitzebehandlung unterziehen.

ERWARTETE WERTE

Die Häufigkeit von antibiotika-assoziiierter Diarrhoe durch *C. difficile* ist abhängig von verschiedenen Faktoren, einschließlich der Patientenpopulation, Art der Institution und Epidemiologie. Die berichtete Inzidenz von *C. difficile*-assoziierten Erkrankungen bei Patienten mit Verdacht einer antibiotika-assoziierten Erkrankung liegt bei 15-20 %, obwohl unterschiedliche Einrichtungen Positivraten finden können, die über oder unter diesem Bereich liegen.⁶ Die Inzidenz von toxischen *C. difficile* Stämmen während der 2010 Zeitstudie war 15,5 % und 16,1 %.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Der Assay unterscheidet nicht zwischen lebensfähigen und nicht lebensfähigen Organismen.
- Die Testergebnisse sind in Verbindung mit den verfügbaren Daten aus der klinischen Untersuchung des Patienten und anderen Diagnostikverfahren heranzuziehen.
- Der Test sollte nur mit ungeformtem Stuhl, konserviert oder nicht, getestet werden. Die Leistung mit anderen Arten von klinischen Proben wurde nicht evaluiert.
- Es wurden zwei deutliche Gruppen identifiziert, die sehr häufig asymptomatische Träger von *C. difficile* sind. Bei Säuglingen wurden Besiedlungsraten bis zu 50 % und mehr festgestellt und bei Patienten mit Mukoviszidose Raten bis zu 32 %.^{7,8}
- Dieser Test identifiziert nicht den Verdacht auf Antibiotika.
- Dieser Test weist den NAP1 (Ribotyp 027) Stamm nach, aber kann ihn nicht von anderen toxischen *C. difficile* Stämmen differenzieren.
- Der Nachweis von bakterieller Nukleinsäure ist abhängig von einwandfreier Probenabnahme, Probengewinnung (inkl. Transport und Lagerung) und Vorbereitung (Verdünnung und Wärmebehandlung). Fehler, die während der Probenabnahme, Probengewinnung und Vorbereitung Anweisungen auftreten, können zu ungültigen Ergebnissen führen.

LEISTUNGSMERKMALE

Der Alethia *C. difficile* Test wurde 2010 bei vier unabhängigen klinischen Labortestorten, die im Mittleren Westen und in südlichen Regionen der Vereinigten Staaten liegen, und beim Hersteller, evaluiert. Zur Ermittlung der Assay-Leistungsmerkmale wurden zwei einzelne Studien durchgeführt. Klinische Studiendaten sind im Folgenden aufgeführt.

(1) Patienten im Alter ab einschließlich 2 Jahren

Es wurden insgesamt 697 qualifizierte Proben von Patienten im Alter ab einschließlich 2 Jahren untersucht. Es wurden Proben von 274 (39,3 %) männlichen und 419 (60,1 %) weiblichen Probanden eingeholt. Das Geschlecht von 4 Patienten (0,6 %) war nicht bekannt. Die Altersgruppen der Patienten lagen im Bereich von 2 Jahren bis 96 Jahren. Es zeigten sich keine durch Alter oder Geschlecht der Patienten bedingten Testleistungsunterschiede. Die allgemeine Positivitätsrate der Studie betrug 15,5 %. Tabelle 1 zeigt die allgemeinen Leistungsdaten der Studie. Tabelle 2 zeigt die Assay-Leistung nach klinischem Standort.

Tabelle 1. Leistungsdaten (Patienten im Alter ab einschließlich 2 Jahren)

"Zytotoxintest" auf Zellkulturen	Alethia C. difficile			
	Positiv	Negativ	Ungültig ***	Gesamt
Positiv	99	5**	4	108
Negativ	27*	546	16	589
Gesamt	126	551	20	697
			95 % VI	
Sensitivität	99/104	95,2 %	89,2 – 97,9 %	
Spezifität	546/573	95,3 %	93,2 – 96,7 %	
Übereinstimmung	645/677	95,3 %	93,4 – 96,6 %	
Ungültigkeitsrate	20/697	2,9 %	N/Z	

* 15 der 27 falsch positiven Ergebnissen waren positiv mit einem anderen FDA "cleared" molecular Test. Von den 12 restlichen falsch positiven Ergebnissen, waren 8 positiv mit einem FDA "cleared" GDH-Test.

** 2 der 5 falsch negativen Ergebnissen waren negativ mit einem anderen FDA "cleared" molecular Test.

*** 20/697 (2,9 %) der getesteten Proben erbrachten ungültige Ergebnisse. Elf (1,6 %) der ungültigen Testwerte wurden als Assay-ungültig eingestuft, was auf eine nicht ordnungsgemäße Probenvorbereitung, Reagenzversagen, Geräteversagen oder Versagen der internen Kontrolle hindeutete. Eine der 11 Proben blieb auch nach wiederholtem Testen der Ausgangsprobe ungültig.

Tabelle 2. Leistungsmerkmale nach klinischem Standort (Patienten im Alter ab einschließlich 2 Jahren)

Ort	Positive Proben			Negative Proben		
	Alethia / "Zytotoxintest" auf Zellkulturen	Sensitivität %	95 % VI	Alethia / "Zytotoxintest" auf Zellkulturen	Spezifität %	95 % VI
Gesamt	99/104**	95,2 %	89,2 – 97,9 %	546/573*	95,3 %	93,2 – 96,7 %
Ort 1	4/5	80,0 %	37,6 – 96,4 %	58/60	97,6 %	88,6 – 99,1 %
Ort 2	12/12	100 %	75,7 – 100 %	62/67	92,5 %	83,7 – 96,8 %
Ort 3	20/20	100 %	83,9 – 100 %	87/92	94,6 %	87,9 – 97,7 %
Ort 4	8/8	100 %	67,6 – 100 %	36/39	92,3 %	79,7 – 97,3 %
Ort 5	55/59	93,2 %	83,8 – 97,3 %	303/315	96,2 %	93,5 – 97,8 %

(2) Patienten unter 2 Jahren

Es wurden insgesamt 193 qualifizierte Proben von Patienten im Alter von 0 bis 24 Monaten untersucht. Es wurden Proben von 103 (53,4 %) männlichen und 90 (46,6 %) weiblichen Probanden eingeholt. Es zeigten sich keine durch Alter oder Geschlecht bedingten Testleistungsunterschiede. Die allgemeine Positivitätsrate der Studie betrug 16,2 %. Tabelle 3 zeigt die allgemeinen Leistungsdaten der Studie. Tabelle 4 zeigt die Assay-Leistung nach klinischem Standort.

Tabelle 3. Leistungsdaten (Patienten unter 2 Jahren)

"Zytotoxintest" auf Zellkulturen	Alethia C. difficile			
	Positiv	Negativ	Ungültig***	Gesamt
Positiv	28	2**	1	31
Negativ	6*	156	0	162
Gesamt	34	158	1	193
			95 % VI	
Sensitivität	28/30	93,3 %	78,7 – 98,2 %	
Spezifität	156/162	96,3 %	92,2 – 98,3 %	
Übereinstimmung	184/192	95,8 %	91,3 – 97,5 %	
Ungültigkeitsrate	1/193	0,5 %	N/Z	

* 3/6 der falsch positiven Ergebnisse fielen mit einem anderen von der FDA freigegebenen Molekular-Assay positiv aus. Die übrigen 3 falsch positiven Ergebnisse fielen mit einem von der FDA freigegebenen Assay für den GDH-Nachweis alle positiv aus.

** 1/2 falsch negativen Ergebnissen fiel mit einem anderen von der FDA freigegebenen Molekular-Assay negativ aus.

*** 1/193 (0,5 %) der getesteten Proben erbrachten ungültige Ergebnisse. Der ungültige Testwert wurde als Assay-ungültig eingestuft, was auf eine nicht ordnungsgemäße Probenvorbereitung, Reagenzversagen, Geräteversagen oder Versagen der internen Kontrolle hindeutete. Die Probe blieb auch nach wiederholtem Testen der Ausgangsprobe ungültig.

Tabelle 4. Leistungsmerkmale nach Standort (Patienten unter 2 Jahren)

Ort	Positive Proben			Negative Proben		
	Alethia / Zytotoxintest auf Bakterienkulturen	Sensitivität %	95 % VI	Alethia / Zytotoxintest auf Bakterienkulturen	Spezifität %	95 % VI
Gesamt	28/30**	93,3 %	78,7 – 98,2 %	156/162	96,3 %	92,2 – 98,3 %
Ort 1	8/8	100 %	67,6 – 100 %	48/49	98,0 %	89,3 – 99,6 %
Ort 2	20/22	90,9 %	72,2 – 97,5 %	105/109	96,3 %	90,9 – 98,6 %
Ort 4	0/0	N/A	N/A	2/3	66,7 %	20,8 – 93,9 %
Ort 5	0/0	N/A	N/A	1/1	100 %	20,7 – 100 %

Tabelle 5. Gesamtergebnis nach Patientenalter

Patientenalter	Positive Proben			Negative Proben		
	Alethia / Toxigene Kultur	Sensitivität %	95 % VI	Alethia / Toxigene Kultur	Spezifität %	95 % VI
< 2 Jahren	28/30	93,3 %	78,7 – 98,2 %	156/162	96,3 %	92,2 – 98,3 %
≥ 2 - 12 Jahren	10/11	90,9 %	62,3 – 98,4 %	75/79	94,9 %	87,7 – 98,0 %
> 12 bis 21 Jahren	5/5	100 %	56,6 – 100 %	53/56	94,6 %	85,4 – 98,2 %
> 21 Jahren	83/87	95,4 %	88,8 – 98,2 %	417/437	95,4 %	93,0 – 97,0 %
Keine Angaben	1/1	100 %	20,7 – 100 %	1/1	100 %	20,7 – 100 %

TESTEMPFFINDLICHKEIT

Die Testempfindlichkeit dieses Assays für *C. difficile* stützt sich auf 20 Wiederholungstests für jedes Mass bei einer Wahrscheinlichkeitsangabe (z. B. 95 % mit 19/20 positiven Wiederholungstests) zur Erzielung positiver Reaktionen bei den folgenden Niveaus der Masseinheiten:

Stamm ID	Toxinotyp	Phänotyp	LoD/Test
VPI 10463	0	A+/B+	4 CFU/test
2007431	III (NAP1)	A+/B+	32 CFU/test
CFI	VIII	A-/B+	64 CFU/test
2006240	V (NAP7)	A+/B+	32 CFU/test
BI8	III	A+/B+	64 CFU/test
2007858	IX/XXIII	A+/B+	32 CFU/test
8864	X	A-/B+	64 CFU/test

ASSAY-REAKTIVITÄT

Die folgenden *C. difficile*-Bestandskulturen verschiedener Quellen ergaben beim Testen mit dem Alethia *C. difficile* Test positive Reaktionen bei 64 CFU/test:
Typ 0: Stämme 10463, 2004111, 2004205, 2005070, 2005257, 2008029, 2008162, 2008341, 2008351, 2009066, 2009099, B1, G1, J7, K12, Y1; Typ III: 2004052, 2004118, 2007431, BI17, BI8; Typ V: 2005325, 2006240, 2008188, 2009018, 2009065, BK6; Typ VIII: 43598, 2008016, CF1; Typ X 8864; Typ XII 2007435; Typ IX/XXIII 2007858; Unbekannte Typs 2009132, 2009155, 2009277.

REPRODUZIERBARKEIT

Für die Durchführung von Präzisionsstudien wurden codierte Profile von 10 Proben an drei unabhängige Labors geliefert. Die Proben waren innerhalb der einzelnen Profile sortiert, um so ihre Identität zu verschleiern. Die Profile umfassten künstlich hergestellte Proben an der Assay-Nachweisgrenze (n = 3), sowie gerade eben unterhalb der Nachweisgrenze (z. B. hoch negative Proben, n = 3). Außerdem umfassten die Profile uncharakterisierte positive (n = 2) und negative (n = 2) Proben. Die Testdurchführung erfolgte an jedem Standort fünf Tage lang (Schwankungen von Assay zu Assay) durch verschiedene Benutzer pro Tag (Schwankungen innerhalb eines Assays). Drei Alethia *C. difficile* Kitchargennummern wurden für die Studie benutzt. Die Testergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Probentyp	Ort 1		Ort 2		Ort 3		Gesamt	
	Prozentige Übereinstimmung		Prozentige Übereinstimmung		Prozentige Übereinstimmung		Prozentige Übereinstimmung	
Negativ	20/20	100 %	20/20	100 %	19/19****	100 %	59/59	100 %
Hoch negativ	25/30	83 %	29/30	97 %	28/30	93 %	82/90	91 %
Schwach positiv	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	90/90	100 %
Positiv	20/20	100 %	20/20	100 %	20/20	100 %	60/60	100 %

**** Eine Probe hat ein ungültiges Instrumentergebnis ergeben

STUDIEN ZUR KREUZREAKTIVITÄT

Es wurden Kreuzreaktivitätsstudien mit positiven und negativen Stuhlproben durchgeführt, die mit Bakterien oder Pilzen in Endkonzentrationen bis zu 1,2 x 10⁸ bzw. mit Virenkonzentrationen bei einem Minimum von 1 x 10^{5,06} TCID₅₀/mL beimpft waren. Keine der folgenden, im Stuhl vorhandenen Organismen reagierte mit dem Alethia *C. difficile* Test:
Aeromonas hydrophila, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Gruppen B-E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus Typen 40 und 41, Coxsackievirus, Echovirus, Rotavirus.

STÖRSUBSTANZEN-TESTS

Die folgenden Substanzen zeigten in den angegebenen gesättigten Lösungen/Verdünnungen und den aufgeführten Endkonzentrationen keine Auswirkungen auf die Testergebnisse: Bariumsulfat (5 mg/mL), Stuhlfette (entsprechend 2,65 mg Stearinsäure plus 1,3 mg Palmitinsäure pro mL), Hämoglobin (in Form von Methämoglobin) (3,2 mg/mL), IgA (5 mg/mL), Imodium AD® (0,00667 mg/mL), Kaopectate® (0,87 mg/mL), Metronidazole (12,5 mg/mL), Mucin (3,33 mg/mL) Mylanta® (4,2 mg/mL), Pepto-Bismol® (0,87 mg/mL), Prilosec® (0,5 mg/mL), Tagamet® (0,5 mg/mL), TUMS® (0,5 mg/mL), Vancomycin (12,5 mg/mL), weiße Blutkörperchen (5 % V/V), Vollblut (5 % V/V).

REFERENCES

1. Nagamine K, Hase T, Notoni T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplifications using loop primers. Mol Cell Probes 2002;16:223-29.
2. Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notoni T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantitating template DNA. J Biochem Biophys 2004;59:145-47.
3. Rupnik M. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of Clostridium difficile toxinotypes. Microbiol Rev 2008;32:541-55.
4. US Department of Health and Human Services PHS/CDC/NIH. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, Washington DC: US Government Printing Office, 2007.
5. CLSI: MM3-A2 Molecular diagnostic methods for infectious disease; approved guideline, 2nd ed. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2006.
6. Wilkins TD, Lysterly DM. Clostridium difficile testing: after 20 years, still challenging. J Clin Microbiol 2003;41:531-4.
7. Johnson S, Gerding DN. Clostridium-difficile-associated diarrhea. Clin Infect Dis 1998;26:1027-34.
8. Lysterly DM, Krivan HC, Wilkins TD. Clostridium difficile: its disease and toxins. Clin Microbiol Rev 1988;1:1-18.



 Manufactured By	Meridian Bioscience, Inc. 3471 River Hills Drive Cincinnati, OHIO - 45244 USA www.meridianbioscience.com <u>Contacts:</u> Main Telephone (+1) 513.271.3700 Customer Service/Orders 800.543.1980 Technical Support Center 800.343.3858 Information Fax: 513.272.5432 Ordering Fax: 513.271.0124 E-mail: info@meridianbioscience.com
EC REP	Meridian Bioscience Europe, SRL Via Dell'Industria 7, 20035 Villa Cortese (Milano) ITALY www.meridianbioscience.com <u>Contacts:</u> Main Telephone (+39) 0331.433636 E-mail: info@meridianbioscience.eu Technical Support: MBE-TechService@meridianbioscience.eu Customer Service/Orders: - For Italian Customers: ordini@meridianbioscience.com - For Distributors / International Customers: Export.CustomerService@meridianbioscience.eu
AUSTRIAN SPONSOR	Emergo Australia Level 20, Tower II Darling Park 201 Sussex Street Sydney, NSW 2000 Australia
CH REP	MedEnvoy Switzerland Gotthardstrasse 28 6302 Zug Switzerland

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

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

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guía de símbolos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	Meridian products carrying the European Conformity (CE) mark fulfill the requirements of Directive 98/79/EC or the Regulation 2017/746 on in-vitro diagnostic medical devices / I prodotti Meridian recanti il marchio di Conformità Europea (CE) soddisfano i requisiti della Direttiva 98/79/CE o del Regolamento 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Les produits Meridian portent la marque de Conformité européenne (CE) sont conformes aux exigences de la Directive 98/79/CE ou du Règlement 2017/746 relatifs aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Los productos de Meridian que llevan la marca de conformidad europea (CE) cumplen los requisitos de la Directiva 98/79/CE o del Reglamento 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Produkte von Meridian mit der CE-Kennzeichnung erfüllen die Anforderungen der EU-Richtlinie 98/79/EG bzw. der Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
		STERILE R	Sterilization by gamma irradiation / Sterilizzazione con raggi gamma / Stérilisation par irradiation aux rayons gamma / Esterilizado por irradiación gamma / Sterilisation durch Gammastrahlen
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	RoHS	Restriction of Hazardous Substances / Restrizione all'uso di sostanze pericolose / Limitation de substances dangereuses / Restricción de Substancias Nocivas / Beschränkung der Verwendung bestimmter gefährlicher Stoffe
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		Cautions, consult accompanying documents / Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso / Attention voir notice d'instructions / Atención, ver instrucciones de uso / Achtung, Begleitdokumente beachten
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	STERILE EO	Sterilization by ethylene oxide / Sterilizzazione con ossido di etilene / Stérilisation par oxyde d'éthylène / Esterilizado por óxido de etileno / Sterilisation durch Ethylenoxid
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi / Contenu suffisant pour <n> tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung		ETL Registered Mark Certified / Marchio di certificazione registrato a livello nazionale / Certifié Conforme ETL / Marca de Certificación Registrada Nacional / ETL Konform beglaubigt
	Female / Femminile / De sexe féminin / Hembra / Frau		Recycle – do not dispose of as general waste / Riciclare – non eliminare come rifiuto generico / Recycler – ne pas jeter dans une poubelle / Recicle – no deseché como basura general / Recycling- dieses Produkt nicht über den Hausmüll entsorgen
	Single Use Only / Prodotto Monouso / A usage unique / Para Un Solo Uso / nur für die einmalige Anwendung	TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	HT TUBE	Heat Treatment Tube / Provetta per il Trattamento termico / Tube pour le traitement thermique / Tubo de tratamiento de calor / Röhrchen zur Hitzebearbeitung
	LASER RADIATION: Avoid Exposure to Beam / RADIAZIONE LASER: Evitare l'esposizione al raggio / RAYONNEMENT LASER: Eviter toute exposition au faisceau / Radiación Laser: Evite Exposición a los Rayos / LASERSTRAHLUNG: Direkten Kontakt mit dem Strahl vermeiden		HOT SURFACE: Keep hands away from Hot Surfaces / Superficie calda: tenere le mani lontane dalle superfici calde / SURFACES CHAUDES: Ne pas toucher les surfaces chaudes / Superficie Caliente: Mantenga las manos alejadas de la superficie caliente / Heiße Oberfläche: Kontakt mit heißen Oberflächen vermeiden
	CAUTION: Laser Radiation / ATTENZIONE: Radiazione Laser / AVERTISSEMENT: Rayonnement laser / Precaución: Radiación Laser / WARNUNG: Laserstrahlung	IPX-0	CAUTION: Protect from water / ATTENZIONE: Proteggere dall'acqua / AVERTISSEMENT: Protéger de l'humidité / Precaución: Proteja del agua / WARNUNG: Vor Feuchtigkeit schützen
	CAUTION: Risk of Danger / ATTENZIONE: Pericolo / AVERTISSEMENT: Risques de danger / Precaución: Peligroso / WARNUNG: Risikogefahr	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
MIN OIL	Mineral Oil / Olio Minerale / Huile Minérale / Aceite Mineral / Mineralöl	MEDIA	Media / Terreno di trasporto / Milieux / Medio / Medium
ST TUBE	Screw Top Tube / Provetta con tappo a vite / Tube à bouchon vissé / Tubo con tapa de rosca / Röhrchen mit Schnappverschluss	COL	Sample Preparation Column / Colonna di preparazione del campione / Colonne pour la préparation de l'échantillon / Columna de preparación de muestra / Säule zur Probenaufarbeitung
BUF SMP	Sample Buffer / Soluzione tampone per il campione / Tampón de l'échantillon / Tampón de muestra / Probenpuffer	PRE REAG	Pretreatment Reagent / Reagente di Pretrattamento / Réactif de prétraitement / Reactivo de pretratamiento / Reagenz für die Vorbehandlung
Rx Only	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig	SMP PREP	Sample Preparation / Preparazione del campione / Préparation de l'échantillon / Preparación de Muestra / Probenvorbereitung
TUBE	Empty Tube / Provetta vuota / Tube vide / Tubo vacío / Leeres Gefäß	CH REP	Swiss Authorized Representative / Mandatario svizzero / Mandataire Suisse / Representante Autorizado Suizo / Schweizer Bevollmächtigter

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