

Xpert[®] *C. difficile*

REF GXCDIFFICILE-CE-10

Istruzioni per l'uso

IVD CE

Dichiarazioni relative a marchi di fabbrica, brevetti e copyright

Trademark, Patents and Copyright Statements

Cepheid[®], the Cepheid logo, GeneXpert[®], and Xpert[®] are trademarks of Cepheid, registered in the U.S. and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners.

THE PURCHASE OF THIS PRODUCT CONVEYS TO THE BUYER THE NON-TRANSFERABLE RIGHT TO USE IT IN ACCORDANCE WITH THESE INSTRUCTIONS FOR USE. NO OTHER RIGHTS ARE CONVEYED EXPRESSLY, BY IMPLICATION OR BY ESTOPPEL. FURTHERMORE, NO RIGHTS FOR RESALE ARE CONFERRED WITH THE PURCHASE OF THIS PRODUCT.

© 2011–2023 Cepheid.

See Section 27, Revision History for a description of changes.

Cepheid[®], il logo Cepheid, GeneXpert[®] e Xpert[®] sono marchi di Cepheid, registrati negli USA e in altri Paesi. Tutti gli altri marchi di fabbrica sono di proprietà dei rispettivi titolari.

L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO CONCEDE ALL'ACQUIRENTE IL DIRITTO NON TRASFERIBILE DI UTILIZZARLO IN ACCORDO ALLE PRESENTI ISTRUZIONI PER L'USO. NESSUN ALTRO DIRITTO VIENE CONCESSO ESPRESSAMENTE, IMPLICITAMENTE O PER PRECLUSIONE. INOLTRE, CON L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO NON VIENE CONCESSO NESSUN DIRITTO ALLA RIVENDITA.

© 2011–2023 Cepheid.

Per una descrizione delle modifiche apportate, vedere Sezione 27 (Cronologia delle revisioni).

Xpert[®] C. difficile

Per uso diagnostico *in vitro*

1 Nome registrato

Xpert[®] C. difficile

2 Nome comune o usuale

Test Xpert C. difficile

3 Destinazione d'uso

Il test Xpert C. difficile, eseguito sui GeneXpert[®] Instrument Systems di Cepheid, è un test diagnostico qualitativo *in-vitro* previsto per l'identificazione e la differenziazione rapide della tossina B e della tossina binaria in adeguati campioni fecali raccolti da pazienti con sospetta infezione da *Clostridium difficile* (CDI). Il test utilizza la reazione a catena della polimerasi (PCR) automatizzata real time per il rilevamento del C. difficile tossigenico associato alla CDI. Il test Xpert C. difficile è previsto come ausilio nella diagnosi della CDI. Un test concomitante è necessario solo laddove sia richiesta un'ulteriore tipizzazione.

4 Riepilogo e spiegazione

Il *Clostridium difficile* (C. difficile) è un bacillo anaerobico Gram-positivo, in grado di produrre spore che è stato associato per la prima volta nel 1978 a una condizione patogena.¹ Le manifestazioni dell'infezione da *Clostridium-difficile* (CDI) vanno da diarrea a colite pseudomembranosa grave potenzialmente letale.² La flora batterica colonica matura negli adulti sani è generalmente resistente alla colonizzazione del C. difficile.³ Tuttavia, se la normale flora batterica colica subisce alterazioni, perde la resistenza alla colonizzazione. Il fattore di rischio più comune è l'esposizione agli antibiotici.⁴ I fattori di virulenza primari di C. difficile sono l'enterotossina A e la citotossina B.⁵ I geni che codificano per la tossina A (*tcdA*) e la tossina B (*tcdB*) fanno parte del locus di patogenicità (PaLoc).^{6,7} Per la maggior parte, i ceppi patogeni sono ceppi positivi per la tossina A, positivi per la tossina B (A+B+); sono state tuttavia riconosciute come patogene anche varianti isolate negative per la tossina A, positive per la tossina B (A-B+).⁸ Alcuni ceppi di C. difficile producono inoltre una ADP-ribosil transferasi actina-specifica denominata CDT o tossina binaria. Il locus della tossina binaria contiene due geni (*cdtA* e *cdtB*) ed è situato esternamente al PaLoc.⁹⁻¹¹ Negli ultimi anni, si sono verificate epidemie di CDI causate da diversi ceppi "ipervirulenti" e resistenti ai fluorochinoloni appartenenti al PCR-ribotipo 027, PFGE tipo NAP1 e REA tipo B1.^{8,12} Questi ceppi presentano un aumento della produzione di tossina, imputabile a delezioni nel gene regolatore *tcdC*.^{13,14}

L'European Centre for Disease Prevention and Control (Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie, ECDC) ha identificato l'urgente necessità di test diagnostici rapidi con prestazioni migliori rispetto ai saggi attualmente disponibili per C. difficile.¹² La diagnosi di C. difficile si basa in genere sull'identificazione della tossina A o B. Il test di citotossicità cellulare è un metodo impegnativo ma è ancora considerato come metodo di riferimento grazie alla sua elevata specificità.^{15,16} Sono stati sviluppati diversi test immunoenzimatici rapidi per l'identificazione delle tossine A e B. Tuttavia, questi test dimostrano, rispetto al saggio di citotossicità cellulare, una sensibilità e una specificità ridotte. Recentemente, sono stati sviluppati metodi PCR per l'identificazione della tossina A e/o della tossina B caratterizzati da una specificità e sensibilità elevate rispetto ai test di citotossicità cellulare e agli immunodosaggi. Tuttavia, non sono attualmente disponibili in commercio saggi PCR standardizzati per l'identificazione della tossina A e B.¹⁷

5 Principio della procedura

I GeneXpert Instrument Systems automatizzano e integrano la preparazione dei campioni, l'estrazione e l'amplificazione degli acidi nucleici e il rilevamento delle sequenze bersaglio in campioni semplici o complessi, utilizzando i saggi di PCR e RT-PCR real time. I sistemi sono composti da uno strumento, un computer e un software precaricato per l'esecuzione dei test sui campioni raccolti e per la visualizzazione dei risultati. I sistemi richiedono l'uso di cartucce GeneXpert monouso contenenti i reagenti per la PCR e all'interno delle quali hanno luogo i processi di estrazione del DNA e la PCR. Grazie alle cartucce isolate ermeticamente nel contenuto, il rischio di contaminazione crociata tra i campioni è ridotto al minimo. Per una descrizione completa dei sistemi, consultare la documentazione appropriata: *GeneXpert Dx System Operator Manual* e/o *GeneXpert Infinity System Operator Manual*.

Il test Xpert C. difficile include i reagenti per l'identificazione rispettivamente del C. difficile in grado di produrre tossine e il C. difficile in grado di produrre tossine, presuntivo del ceppo 027/NAP1/BI come anche il controllo per il trattamento dei campioni (SPC). L'SPC viene usato ai fini del riscontro dell'adeguatezza del processo di amplificazione e per il monitoraggio della presenza di inibitori nella reazione della PCR. Il controllo per la verifica della sonda (PCC) verifica la reidratazione dei reagenti, il riempimento della provetta PCR nella cartuccia e che tutti i componenti della reazione, comprese le sonde e i coloranti, siano presenti e funzionali nella cartuccia.

I primer e le sonde del test Xpert C. difficile rilevano sequenze geniche per la tossina B (*tcdB*), la tossina binaria (*cdt*) e per la delezione *tcdC* al nucleotide 117 (*tcdCΔ117*).

6 Materiali in dotazione

Il kit Xpert C. difficile contiene reagenti sufficienti per il trattamento di 10 campioni di analisi o campioni di controllo qualità.

Il contenuto del kit è il seguente:

Cartucce per il test Xpert C. difficile con provette di reazione integrate	10
<ul style="list-style-type: none"> • Microsfera 1, microsfera 2 e microsfera 3 (liofilizzate) • Reagente 1 • Reagente 2 (idrossido di sodio) 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 di ciascuna per cartuccia • 3,0 ml per cartuccia • 3,0 ml per cartuccia
Sacche di reagente Xpert C. difficile	10
<ul style="list-style-type: none"> • Reagente per il campione (guanidina tiocianato) 	<ul style="list-style-type: none"> • 10 x 2,0 ml per sacchetto
CD	1 per kit
<ul style="list-style-type: none"> • File di definizione del saggio (ADF) • Istruzioni per l'importazione degli ADF nel software GeneXpert • Istruzioni per l'uso (package insert) 	

Nota Le schede dati di sicurezza (SDS) sono disponibili nel sito www.cepheid.com o www.cepheidinternational.com sotto la scheda **SUPPORTO** (SUPPORT).

Nota L'albumina di siero bovino (BSA) presente nelle microsfere di questo prodotto è stata prodotta esclusivamente da plasma bovino di origine statunitense. Gli animali non sono stati nutriti con proteine di ruminanti o altre proteine animali; gli animali hanno superato i test ante e post mortem. Durante la lavorazione, il materiale non è stato miscelato con altro materiale animale.

7 Conservazione e manipolazione

- Conservare il kit Xpert C. difficile a 2–28 °C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta.
- Non utilizzare il reagente per il campione o le cartucce dopo la data di scadenza.

- Aprire il coperchio della cartuccia solo immediatamente prima di eseguire il test.
- Non utilizzare cartucce bagnate o che presentano perdite.
- Il reagente per il campione è un liquido trasparente incolore. Non usare il reagente per il campione se appare torbido o scolorito.

8 Materiali necessari ma non forniti

- GeneXpert Dx System o GeneXpert Infinity System (il numero di catalogo varia a seconda della configurazione): Strumento GeneXpert, computer con software proprietario GeneXpert, penna ottica per codici a barre e manuale dell'operatore.
- Per GeneXpert Dx System: Software versione 4.3 o successiva.

Stampante: se fosse necessaria una stampante, contattare il supporto tecnico di Cepheid per predisporre l'acquisto di una stampante consigliata.

- Miscelatore vortex
- Pipette di trasferimento sterili monouso
- Tampone secco per il trasferimento del campione fecale, Cepheid Sample Collection Device numero di catalogo 900-0370 (Copan Venturi Transystem® Culture, 139CFA) o Cepheid Single-Use Disposable Swab numero di catalogo SDPS-120 (Copan 138CS01.PH).

9 Avvertenze e precauzioni

- Tutti i campioni biologici di analisi, comprese le cartucce usate e i reagenti, devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi. Poiché, nella maggior parte dei casi, è impossibile distinguere i potenziali veicoli di infezione, tutti i campioni biologici di analisi devono essere trattati attenendosi alle precauzioni standard. Le linee guida per il trattamento dei campioni di analisi sono disponibili presso l'ente statunitense per la prevenzione e il controllo delle malattie (U.S. Centers for Disease Control and Prevention) e l'istituto per gli standard clinici e di laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute ^{18,19}).
- Attenersi alle procedure di sicurezza del proprio istituto per l'utilizzo e la manipolazione di sostanze chimiche e campioni biologici.
- L'esecuzione del test Xpert C. difficile fuori dagli intervalli di tempo e temperatura di conservazione consigliati può generare risultati erranei o non validi.
- Non agitare la cartuccia. Se la cartuccia cade o viene agitata dopo l'apertura del coperchio, si potrebbero ottenere risultati non validi.
- Non applicare l'etichetta con l'ID campione (Sample ID) sul coperchio o sull'etichetta del codice a barre della cartuccia. Non utilizzare una cartuccia che presenta l'etichetta del codice a barre danneggiata.
- Il test Xpert C. difficile non fornisce risultati sulla sensibilità. Colture e test di sensibilità richiedono infatti tempi di esecuzione più lunghi.
- Non sostituire i reagenti del test Xpert C. difficile con altri reagenti.
- Non aprire il coperchio della cartuccia Xpert C. difficile se non per l'aggiunta di campioni e reagenti o per la ripetizione del test.
- Non utilizzare una cartuccia che sia caduta dopo essere stata estratta dalla confezione.
- Non utilizzare una cartuccia la cui provetta di reazione è danneggiata.
- Ciascuna cartuccia Xpert C. difficile monouso serve per l'esecuzione di un singolo test. Non riutilizzare le cartucce usate.
- Indossare camice da laboratorio e guanti puliti. Cambiare i guanti tra una manipolazione e l'altra di ciascun campione di analisi.
- Nel caso in cui l'area di lavoro o le apparecchiature vengano contaminate dai campioni o dai controlli, pulire a fondo le superfici interessate con una soluzione in rapporto 1:10 di candeggina per uso domestico; ripetere quindi la pulizia con una soluzione di etanolo denaturato al 70%. Pulire le superfici di lavoro e lasciarle asciugare completamente prima di continuare.
- I campioni biologici di analisi, i dispositivi di trasferimento e le cartucce usate devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi adottando le precauzioni standard. Attenersi alle procedure di smaltimento dei rifiuti ambientali del proprio istituto per il corretto smaltimento delle cartucce usate e dei reagenti non utilizzati. Questi materiali potrebbero essere considerati rifiuti chimici pericolosi per il cui smaltimento sarà necessario attenersi a specifiche procedure nazionali o regionali. Se i regolamenti nazionali o regionali non forniscono istruzioni chiare sul corretto

smaltimento, i campioni biologici di analisi e le cartucce usate devono essere smaltiti in base alle linee guida dell'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) sulla manipolazione e lo smaltimento dei rifiuti medici.

- Aprire il coperchio della cartuccia solo immediatamente prima di eseguire il test.

10 Pericoli chimici^{20,21}

- Pittogramma di pericolo UN GHS: 
- Parola: ATTENZIONE
- **Indicazioni di pericolo UN GHS**
 - Nocivo se ingerito
 - Provoca irritazione cutanea.
 - Provoca grave irritazione oculare.
- **Frase di prudenza UN GHS**
 - **Prevenzione**
 - Lavare accuratamente dopo l'uso.
 - Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso.
 - Non disperdere nell'ambiente.
 - Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
 - **Risposta**
 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.
 - Togliere di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.
 - Trattamento specifico (vedere le informazioni supplementari di pronto soccorso).
 - In caso di irritazione della pelle: consultare un medico
 - IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
 - Se l'irritazione degli occhi persiste: consultare un medico
 - IN CASO DI INGESTIONE: Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico in caso di malessere.
 - Sciacquare la bocca.
 - **Stoccaggio/Smaltimento**
 - Smaltire prodotto e/o recipiente in conformità con normative locali, regionali, nazionali e/o normative internazionali.

11 Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni di analisi

1. Raccogliere il campione di feci informi in un contenitore pulito. Attenersi alle linee guida del proprio presidio per la raccolta dei campioni per il test del *C. difficile*.
2. Etichettare il contenitore con l'ID paziente (Patient ID) e inviarlo al laboratorio per l'analisi.
3. I campioni di analisi possono essere conservati alla temperatura di 2–8 °C. Quando conservati a questa temperatura, i campioni di analisi rimangono stabili per un massimo di 5 giorni. In alternativa, i campioni di analisi possono essere conservati a temperatura ambiente (20–30 °C) per un massimo di 24 ore.

12 Procedura

12.1 Preparazione della cartuccia

Importante Iniziare il test entro 30 minuti dall'introduzione del campione nella cartuccia.

Per inserire il campione nella cartuccia, procedere nel modo seguente:

1. Estrarre la cartuccia e il reagente per il campione dalla confezione.
2. Immergere per qualche istante un tampone nel campione di materia fecale informe. Non è necessario che il tampone sia completamente saturo.
3. Inserire il tampone nella provetta contenente il reagente per il campione.

Nota Usare una garza sterile per ridurre al minimo il rischio di contaminazione.

4. Tenere il tampone dallo stelo vicino al bordo della provetta, sollevare il tampone di alcuni millimetri dal fondo della provetta, quindi spezzare lo stelo spingendolo contro il bordo della provetta. Accertarsi che il tampone sia sufficientemente corto da consentire di chiudere bene il tappo.
5. Chiudere il coperchio e miscelare in vortex ad alta velocità per 10 secondi.
6. Aprire il coperchio della cartuccia. Usando una pipetta di trasferimento pulita, trasferire l'intero contenuto del reagente per il campione nella camera del campione della cartuccia.
7. Chiudere il coperchio della cartuccia.

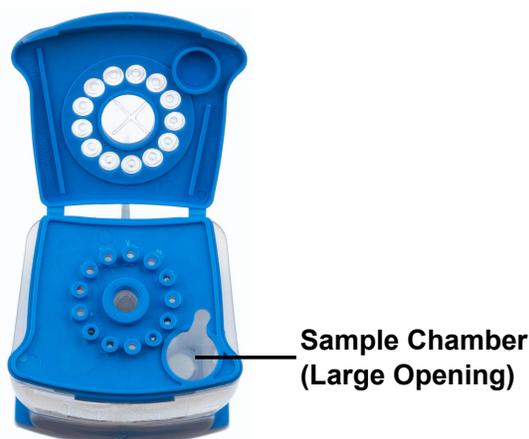


Figura 1. Cartuccia (vista dall'alto)

12.2 Avvio del test

Importante Se si sta utilizzando un sistema *GeneXpert Dx*, prima di iniziare il test verificare che il sistema stia eseguendo il software *GeneXpert Dx* versione 4.7b o superiore e che nel software sia stato importato il file di definizione del saggio corretto.

Importante Se si sta utilizzando un sistema *GeneXpert Infinity*, prima di iniziare il test verificare che il sistema stia eseguendo il software *Xpertise* versione 6.4b o superiore e che nel software sia stato importato il file di definizione del saggio corretto.

In questa sezione sono elencati i passaggi principali di esecuzione del test. Per istruzioni dettagliate, consultare il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx* o il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Infinity*, a seconda del modello utilizzato.

Nota I passaggi da seguire possono variare se l'amministratore del sistema modifica il flusso di lavoro predefinito del sistema.

1. Accendere lo strumento *GeneXpert*.
 - Se si utilizza lo strumento *GeneXpert Dx*, accendere prima lo strumento e poi il computer. Il software *GeneXpert* si avvia automaticamente. Se ciò non dovesse accadere, fare doppio clic sull'icona del collegamento del software *GeneXpert Dx* sul desktop di Windows®.
 - oppure
 - Se si utilizza lo strumento *GeneXpert Infinity*, accenderlo. Il software *Xpertise* si avvia automaticamente. Se non si avvia, fare doppio clic sull'icona del collegamento del software *Xpertise* sul desktop di Windows®.
2. Connettersi al software del sistema di strumentazione *GeneXpert* usando il proprio nome utente e la password.

3. Nella finestra del sistema GeneXpert, fare clic su **Crea analisi (Create Test)** (GeneXpert Dx) o **Ordini (Orders)** e **Ordina analisi (Order Test)** (Infinity). Viene visualizzata la finestra **Crea analisi (Create Test)**. Si aprirà la finestra di dialogo **Esegui scansione del codice a barre dell'ID paziente (Scan Patient ID Barcode)**.
4. Eseguire la scansione dell'ID paziente (Patient ID) o digitarlo. Se l'ID paziente (Patient ID) viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente. L'ID paziente (Patient ID) è associato ai risultati del test e viene visualizzato nella finestra **Visualizza risultati (View Results)** e in tutti i rapporti. Verrà visualizzata la finestra di dialogo **Esegui scansione del codice a barre dell'ID campione (Scan Sample ID Barcode)**.
5. Inserire l'ID campione (Sample ID) tramite scansione o manualmente. Se l'ID campione (Sample ID) viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente. L'ID del campione sarà associato ai risultati del test e riportato nella finestra **Visualizza risultati (View Results)** e su tutti i rapporti. Si aprirà la finestra di dialogo **Esegui scansione del codice a barre della cartuccia (Scan Cartridge Barcode)**.
6. Eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia. Utilizzando le informazioni contenute nel codice a barre, il software compila automaticamente le caselle relative ai seguenti campi: Selezione saggio (Select Assay), ID lotto reagente (Reagent Lot ID), N/S cartuccia (Cartridge S/N) e Data di scadenza (Expiration Date).

Nota

Se non si riesce a eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia, ripetere il test con una cartuccia nuova. Se è stata eseguita la scansione del codice a barre della cartuccia nel software e il file di definizione del saggio non è disponibile, apparirà una schermata in cui si indica che il file di definizione del saggio non è stato caricato nel sistema. Se compare tale schermata, contattare il Supporto Tecnico di Cepheid.

7. Fare clic su **Avvia analisi (Start Test)** (GeneXpert Dx) o **Inoltra (Submit)** (Infinity). Se richiesto, digitare la propria password nella finestra di dialogo visualizzata.
8. Per il sistema *GeneXpert Infinity*, posizionare la cartuccia sul nastro trasportatore. La cartuccia viene caricata automaticamente, il test viene eseguito e la cartuccia usata viene quindi collocata nel contenitore dei rifiuti.

oppure

Per lo strumento *GeneXpert Dx*:

- a) Aprire lo sportello del modulo dello strumento con la spia verde lampeggiante e caricare la cartuccia.
- b) Chiudere lo sportello. Il test viene avviato e la spia verde smette di lampeggiare. Al termine del test, la spia si spegne.
- c) Attendere che il sistema abbia sbloccato lo sportello del modulo prima di aprirlo. Quindi rimuovere la cartuccia.
- d) Smaltire le cartucce usate negli appositi contenitori dei rifiuti di campioni di analisi attenendosi alla prassi standard del proprio presidio.

13 Visualizzazione e stampa dei risultati

In questa sezione sono elencati i passaggi principali per la visualizzazione e la stampa dei risultati. Per istruzioni più dettagliate su come visualizzare e stampare i risultati, consultare il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx* o il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Infinity*, a seconda del modello utilizzato.

1. Per visualizzare i risultati, fare clic sull'icona **Visualizza risultati (View Results)**.
2. Una volta completato il test, fare clic sul pulsante **Rapporto (Report)** nella finestra **Visualizza risultati (View Results)** per visualizzare e/o generare un file di rapporto in formato PDF.

14 Controllo qualità

Ciascun test comprende un controllo per il trattamento dei campioni (SPC) e un controllo per la verifica della sonda (PCC).

- **Controllo per il trattamento dei campioni (SPC)** — Assicura che il campione sia stato trattato correttamente. Il controllo SPC contiene spore di *Bacillus globigii*, presenti in ogni cartuccia sotto forma di pellet di spore essiccate, per verificare il corretto trattamento dei batteri del campione. Il controllo SPC accerta l'avvenuta lisi dei batteri del *C. difficile* e di una spora, qualora gli organismi siano presenti, e verifica che il trattamento dei campioni di analisi sia adeguato. Questo controllo rileva inoltre l'inibizione del saggio di PCR real time associata ai campioni di analisi. L'SPC deve essere positivo in un campione negativo e può essere negativo o positivo in un campione positivo. L'SPC si considera superato se soddisfa i criteri di accettazione convalidati.
- **Controllo per la verifica della sonda (PCC)** — Prima che inizi la reazione PCR, il sistema GeneXpert misura il segnale di fluorescenza emesso dalle sonde, allo scopo di monitorare la reidratazione delle microsferi, il riempimento delle provette di reazione, l'integrità delle sonde e la stabilità dei coloranti. La verifica della sonda si considera riuscita qualora siano soddisfatti i criteri di accettazione assegnati.

15 Interpretazione dei risultati

I risultati vengono interpolati automaticamente dal sistema di strumentazione GeneXpert, dai segnali fluorescenti misurati e dagli algoritmi di calcolo incorporati e vengono visualizzati nella finestra **Visualizza risultati (View Results)**. I risultati possibili sono:

Tabella 1. Risultati e interpretazione di Xpert C. difficile

Risultato	Interpretazione
<p>C. diff tossigenico, POSITIVO, PRESUNTO NEG per 027 (Toxigenic C. diff POSITIVE, 027 PRESUMPTIVE NEG)</p> <p>Vedere la Figura 2</p>	<p>Sono state rilevate sequenze di DNA bersaglio di <i>C. difficile</i> tossigenico.</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>C. difficile</i> tossigenico — il bersaglio (i bersagli) di <i>C. difficile</i> tossigenico (tossina B o tossina B più tossina binaria o delezione <i>tcdC</i> nt 117) hanno un Ct entro il range di validità e un endpoint superiore al valore minimo. SPC — NA (non applicabile); l'SPC viene ignorato poiché l'amplificazione del bersaglio per <i>C. difficile</i> può competere con questo controllo Verifica della sonda — AMMESSO (PASS). Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
<p>C. diff tossigenico, POSITIVO, PRESUNTO POS per 027 (Toxigenic C. diff POSITIVE, 027 PRESUMPTIVE POS)</p> <p>Vedere la Figura 3</p>	<p>Sono state rilevate sequenze di DNA bersaglio per <i>C. difficile</i> tossigenico e presunta positività per 027/NAP1/BI.</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>C. difficile</i> tossigenico, presunto 027/NAP1/BI — tutti i <i>C. difficile</i> tossigenici, bersagli presunti di 027/NAP1/BI (tossina B, tossina binaria e delezione <i>tcdC</i> nt 117) hanno Ct entro il range di validità ed endpoint superiori al valore minimo. SPC — NA (non applicabile); l'SPC viene ignorato poiché l'amplificazione del bersaglio di <i>C. difficile</i> può competere con questo controllo. Verifica della sonda — AMMESSO (PASS). Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
<p>C. diff tossigenico, NEGATIVO, PRESUNTO NEG per 027 (Toxigenic C. diff NEGATIVE, 027 PRESUMPTIVE NEG)</p> <p>Vedere la Figura 4</p>	<p>Non sono state rilevate sequenze di DNA bersaglio di <i>C. difficile</i> (tossina B).</p> <p>NEGATIVO (NEGATIVE) — Non sono state rilevate sequenze di DNA di <i>C. difficile</i> tossigenico (tossina B); non sono stati rilevati altri DNA bersaglio di <i>C. diff</i> tossigenico (tossina binaria e delezione <i>tcdC</i> nt 117). L'SPC soddisfa i criteri di accettazione.</p> <ul style="list-style-type: none"> NEGATIVO (NEGATIVE) - DNA bersaglio di <i>C. difficile</i> non rilevato. SPC — AMMESSO (PASS); il controllo SPC presenta un Ct entro il range di validità e un endpoint al di sopra del valore minimo impostato. Verifica della sonda — AMMESSO (PASS). Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
<p>NON VALIDO (INVALID)</p> <p>Vedere la Figura 5</p>	<p>Non è possibile determinare la presenza o l'assenza di DNA bersaglio di <i>C. difficile</i>; ripetere il test attenendosi alle istruzioni della seguente sezione "Procedura di ripetizione del test". L'SPC non soddisfa i criteri di accettazione, il campione non è stato trattato correttamente o la PCR è stata inibita.</p> <ul style="list-style-type: none"> NON VALIDO (INVALID) — La presenza o l'assenza di DNA bersaglio di <i>C. difficile</i> non può essere determinata. SPC — RESPINTO (FAIL); il risultato del bersaglio per SPC è negativo, il Ct per SPC non rientra nel range di validità e l'endpoint è al di sotto del valore minimo. Verifica della sonda — AMMESSO (PASS). Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.

Risultato	Interpretazione
ERRORE (ERROR)	<p>Non è possibile determinare la presenza o l'assenza di DNA bersaglio di <i>C. difficile</i>; ripetere il test attenendosi alle istruzioni della seguente sezione “Procedura di ripetizione del test”. Il controllo per la verifica della sonda non ha funzionato, probabilmente a causa del riempimento inadeguato della provetta di reazione, dell'individuazione di un problema a livello di integrità della sonda o del superamento dei limiti massimi di pressione.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tossina B (<i>tcdB</i>) — NESSUN RISULTATO (NO RESULT) • Tossina binaria (<i>cdt</i>) — NESSUN RISULTATO (NO RESULT) • <i>tcdCA117</i> — NESSUN RISULTATO (NO RESULT) • *SPC — NESSUN RISULTATO (NO RESULT) <p>Verifica della sonda — NON RIUSCITA (FAIL)^a; uno o tutti i risultati di verifica della sonda hanno dato esito negativo.</p>
NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	<p>Non è possibile determinare la presenza o l'assenza di DNA bersaglio di <i>C. difficile</i>; ripetere il test attenendosi alle istruzioni della seguente sezione “Procedura di ripetizione del test”. La quantità di dati raccolta non è sufficiente per generare i risultati del test (l'operatore, per esempio, ha interrotto l'esecuzione di un test).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tossina B (<i>tcdB</i>) — NESSUN RISULTATO (NO RESULT) • Tossina binaria (<i>cdt</i>) — NESSUN RISULTATO (NO RESULT) • <i>tcdCA117</i> — NESSUN RISULTATO (NO RESULT) • SPC — NESSUN RISULTATO (NO RESULT) • Verifica della sonda — NA (NON APPLICABILE)

^a Se la verifica della sonda ha avuto esito positivo, l'errore è dovuto a un guasto di un componente del sistema.

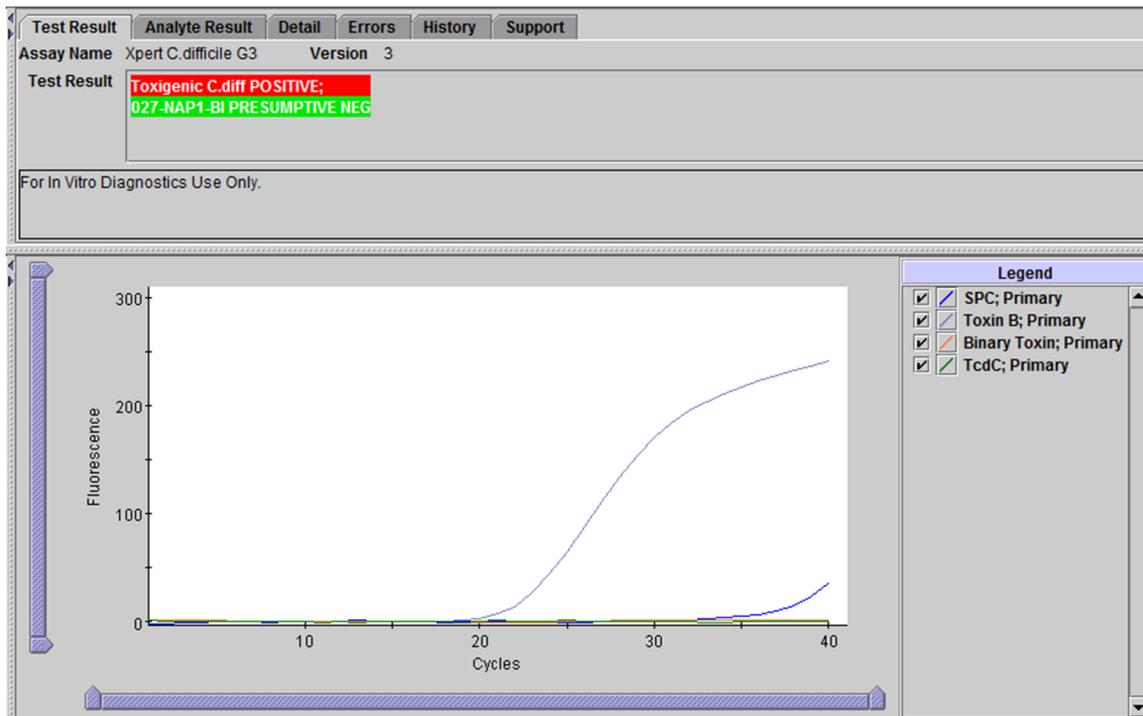


Figura 2. Esempio di risultato positivo per Xpert C. difficile e presunto negativo per 027

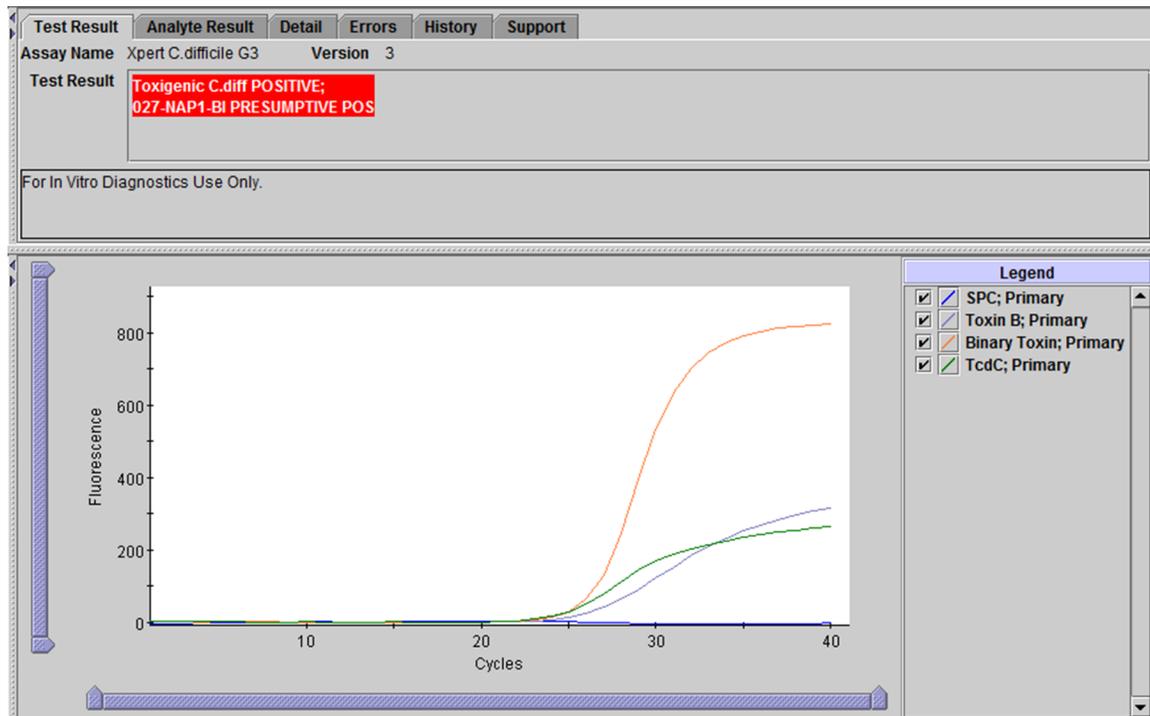


Figura 3. Esempio di risultato positivo per Xpert C. difficile e presunto positivo per 027

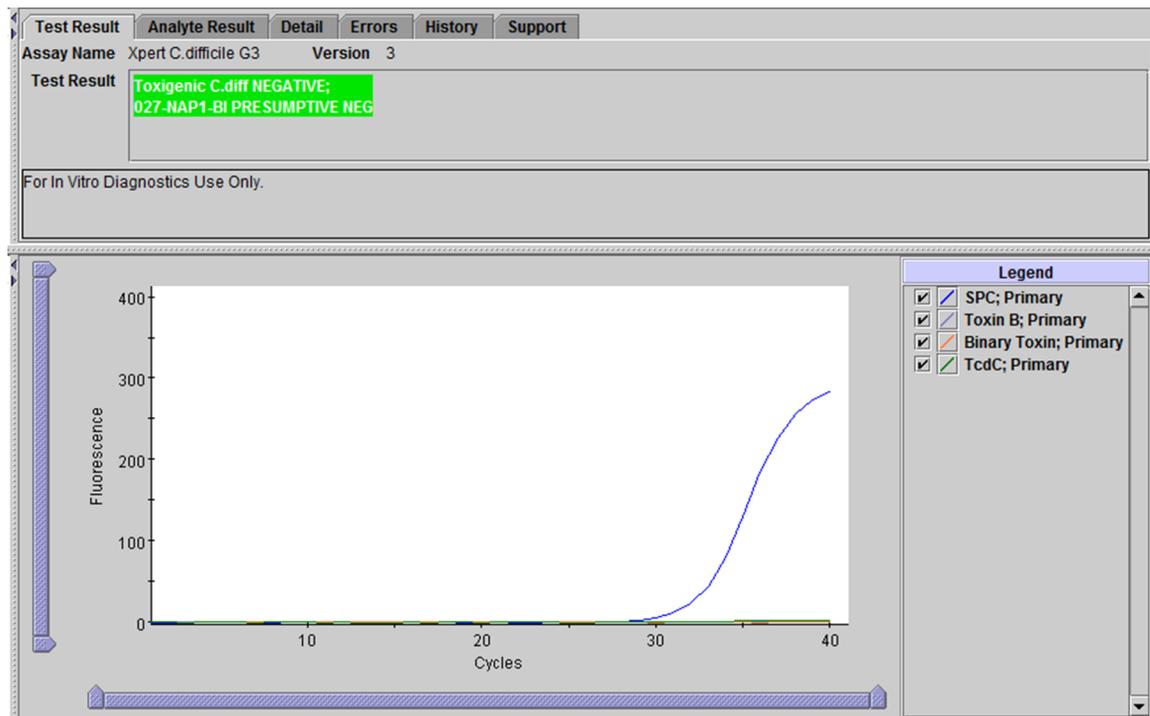


Figura 4. Esempio di risultato negativo per C. difficile e presunto negativo per 027

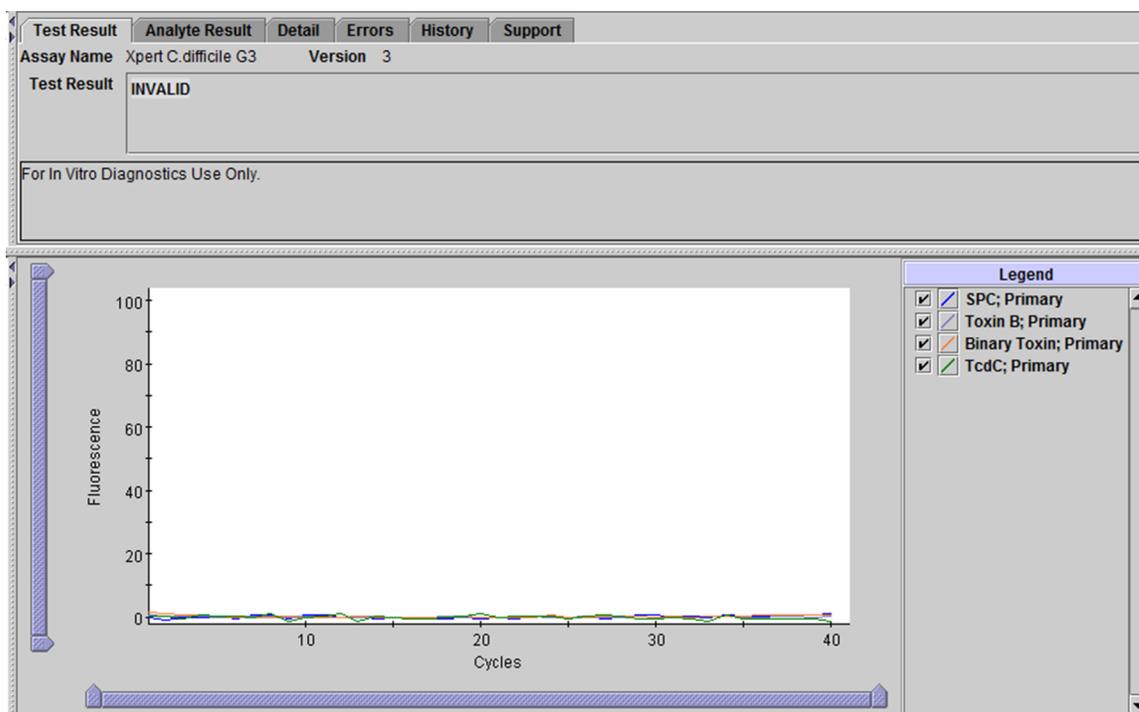


Figura 5. Esempio di risultato non valido

16 Motivi per ripetere il saggio

16.1 Motivi per ripetere il test

Se si ottiene uno dei risultati descritti qui di seguito, ripetere il test attenendosi alle istruzioni riportate nella Sezione 16.2.

- Un risultato **NON VALIDO (INVALID)** indica che l'SPC non è stato superato. Il campione non è stato trattato correttamente o la PCR è stata inibita.
- Il risultato **ERRORE (ERROR)** indica che il controllo per la verifica della sonda può non aver funzionato e che il test è stato interrotto, probabilmente a causa del riempimento inadeguato della provetta di reazione, dell'individuazione di un problema a livello di integrità della sonda del reagente, del superamento dei limiti massimi di pressione o dell'individuazione di un errore di posizionamento della valvola.
- **NESSUN RISULTATO (NO RESULT)** indica che i dati raccolti sono insufficienti. Ad esempio, l'operatore ha interrotto un test in corso.

16.2 Procedura di ripetizione del test

Per la ripetizione del test entro 3 ore da un risultato indeterminato, usare una nuova cartuccia (non riutilizzare le cartucce) e nuovi reagenti.

1. Estrarre la nuova cartuccia dal kit.
2. Trasferire tutto il contenuto rimanente dalla camera del campione in un nuovo flaconcino di reagente per il campione, usando una pipetta di trasferimento monouso.
3. Miscelare in vortex e aggiungere l'intero contenuto del reagente per il campione alla camera del campione della nuova cartuccia Xpert C. difficile.
4. Chiudere il coperchio e iniziare il nuovo test.

Per la ripetizione del test a 3 ore da un risultato indeterminato, utilizzare un nuovo campione prelevato mediante tampone dal campione di analisi originale del paziente.

17 Limitazioni

Gli isolati Non-027/NAP1/BI rappresentativi del tossinotipo XIV verranno segnalati come **POSITIVO per C. difficile tossigenico (Toxigenic C. diff POSITIVE); PRESUNTO POSITIVO per 027 (027 PRESUMPTIVE POSITIVE)** usando il test Xpert *C. difficile*.

Occasionalmente, gli isolati Non-027/NAP1/BI rappresentativi dei tossinotipi IV, V e X verranno segnalati come **POSITIVO per C. difficile tossigenico (Toxigenic C. diff POSITIVE); PRESUNTO POSITIVO per 027 (027 PRESUMPTIVE POSITIVE)** usando il test Xpert *C. difficile*.

Le prestazioni del test Xpert *C. difficile* sono state convalidate solo tramite le procedure fornite nel presente foglietto illustrativo. Qualsiasi modifica apportata a queste procedure può alterare le prestazioni del test. I risultati del test Xpert *C. difficile* devono essere interpretati in concomitanza con altri dati di laboratorio o clinici a disposizione del medico.

Si possono ottenere risultati del test erronei come conseguenza di una raccolta dei campioni di analisi inadeguata, della mancata osservanza delle procedure consigliate per la raccolta, la manipolazione e la conservazione dei campioni, di errori tecnici, di commistione dei campioni o a causa di una presenza di microrganismi nel campione di analisi troppo esigua per essere rilevata dal test. La rigorosa osservanza delle istruzioni del presente foglietto illustrativo è necessaria per evitare risultati erronei.

L'identificazione di *C. difficile* dipende dal numero di microrganismi presenti nel campione, pertanto l'affidabilità dei risultati dipende dalla correttezza della raccolta, manipolazione e conservazione del campione di analisi.

A causa del fattore di diluizione associato alla procedura di ripetizione dell'analisi, è possibile che i campioni di analisi positivi per *C. difficile* prossimi o equivalenti al limite di rilevamento (LoD) del test *C. difficile* diano risultati falsi negativi in occasione della ripetizione del test.

La ripetizione del test Xpert *C. difficile* in presenza dei risultati **NON VALIDO (INVALID), ERRORE (ERROR) o NESSUN RISULTATO (NO RESULT)** dipende dalla prassi e dai protocolli dei singoli presidi. Dovrebbero essere disponibili procedure alternative. Per la coltura si dovranno collocare i rimanenti campioni di analisi dei tamponi in opportuni sistemi di trasporto, per un periodo massimo di 4 giorni.

Un risultato positivo non presuppone necessariamente la presenza di organismi vitali. Può comunque essere indicativo della presenza di *C. difficile*.

Le epidemie di CDI possono essere causate da ceppi diversi da 027/NAP1/BI.

L'identificazione dell'acido nucleico di *C. difficile* nelle feci conferma la presenza di questi microrganismi nei pazienti affetti da diarrea ma può non indicare *C. difficile* come l'agente eziologico della diarrea.

Le caratteristiche prestazionali di questo test sono state stabilite solo con il tipo di campione di analisi elencato nella sezione Destinazione d'uso. Le prestazioni di questo test con altri tipi di campioni di analisi non sono state valutate.

Sono possibili risultati falsi negativi quando l'organismo infettante presenta mutazioni, inserimenti, delezioni o ridistribuzioni genetiche oppure quando il test viene effettuato in una fase troppo precoce della malattia.

18 Sostanze interferenti

Le potenziali sostanze inibitorie testate comprendono sangue, eccesso di feci e muco. Le sostanze sono state testate in replicati di tre con il ceppo batterico *C. difficile* 027/NAP1/BI inoculati vicino al limite di rilevamento analitico (~ 3x LoD) e maggiore (~ 50x LoD). Il materiale in eccesso delle feci è stato valutato con campioni clinici effettivi in uno studio analitico multicentrico. Occasionalmente si osserva un effetto inibitorio in presenza di eccesso di feci sul tampone. Non sono stati osservati effetti inibitori significativi in presenza di sangue o muco.

19 Caratteristiche prestazionali

Le caratteristiche prestazionali del test Xpert *C. difficile* sono state determinate in uno studio analitico prospettico in due siti in Europa confrontando il test Xpert *C. difficile* sul sistema GeneXpert (test Xpert *C. difficile*) con coltura tossigenica seguita da PCR-ribotipizzazione dei campioni positivi alla coltura. Per essere arruolati nello studio, i campioni di analisi dovevano provenire da individui con colture indicate e/o ordinate, secondo le prassi istituzionali.

19.1 Risultati complessivi

Sono stati testati un totale di 285 campioni di analisi per *C. difficile* con il test Xpert *C. difficile* e confrontati con il metodo di coltura diretta (vedere la tabella seguente).

Tabella 2. Caratteristiche prestazionali del test Xpert *C. difficile* rispetto alla coltura diretta

		Coltura tossigenica				
		<i>C. difficile</i>	027/NAP1/ BI pos	Negativi		
Xpert <i>C. difficile</i>	Tossina B+	34	0	16	Sensibilità	100%
	027/NAP1/BI	0	0	1	Specificità	93%
	Negativi	0	0	234		

20 Caratteristiche prestazionali di 027/NAP1/BI

Per determinare le caratteristiche prestazionali del ceppo 027/NAP1/BI, i campioni clinici sono stati valutati internamente da Xpert *C. difficile*, coltivati e PCR-ribotipizzati. I dati dello studio sono forniti nella tabella seguente. Negativo in questo caso significa i ceppi *C. difficile* tossigenici che non sono 027/NAP1/BI.

Tabella 3. Caratteristiche prestazionali del test Xpert *C. difficile* rispetto alla PCR-ribotipizzazione

		Coltura tossigenica e PCR-ribotipizzazioni			
		027/NAP1/ BI Pos	027/NAP1/ BI Neg		
Xpert <i>C. difficile</i>	027/NAP1/ BI Pos	14	1	Sensibilità	100%
	027/NAP1/ BI Neg	0	10	Specificità	91%

21 Specificità analitica

In uno studio di reattività crociata sono state testate colture di American Type Culture Collection (ATCC) e Culture Collection, University of Göteborg (CCUG) rappresentanti microrganismi strettamente legati al *C. difficile* così come la flora rettale normale e patogena. Due ceppi di *C. difficile* non tossigenico sono stati testati usando il test Xpert *C. difficile*. I microrganismi testati erano rappresentati da 24 specie aerobiche, 14 anaerobiche e due microaerofile. Tre replicati di ciascun isolato sono stati testati ad una concentrazione di almeno 10⁹ CFU per reazione. Nelle condizioni dello studio, tutti gli isolati sono stati segnalati come *C. difficile* tossigenico negativo; nessuno degli isolati è stato rilevato dal test Xpert *C. difficile*. Nello studio sono stati inclusi controlli positivi e negativi. La specificità analitica è stata del 100%.

22 Sensibilità analitica

Sono stati effettuati ulteriori studi per determinare l'intervallo di confidenza del 95% per il limite di rilevamento (LoD) analitico di questo saggio. Il limite di rilevamento è definito come il numero più basso di unità formanti colonie (CFU) per campione che possono essere riproducibilmente distinte da campioni negativi con confidenza del 95%. Sono stati valutati replicati di 20 a sei concentrazioni (100, 300, 600, 1200, 2400 e 4800 CFU/campione).

In base alle condizioni di questo studio e utilizzando un'impostazione Ct massima valida di 37 per *tcdB* e *cdt* e 40 per *tcdC*, i risultati indicano che la stima del punto LoD per *C. difficile* tossigenico è 1657 CFU/tampone con un intervallo di confidenza del 95% che va da 1157 CFU/tampone a 3561 CFU/tampone e per *C. difficile* tossigenico ceppo 027/NAP1/BI 2058 CFU/campione con un intervallo di confidenza del 95% compreso tra 1581 CFU/tampone e 3441 CFU/tampone.

23 Riferimenti bibliografici

1. Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis, Lancet 1978; 1:1063-1066.
2. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. N Engl J Med 2002; 31:334-339
3. Borriello SP. The influence of the normal flora on *Clostridium difficile* colonization of the gut. Ann Med 1990;22-61-7
4. Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect 1998; 40:1-15.
5. Kelly CP, Pothoulakis C, Lamont JT. *Clostridium difficile* colitis. N Engl J Med 1994; 330:257-262.
6. Braun VT, Hundsberger P, Leukel M, Sauerborn and C. von Eichel-Striber. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. 1996; Gene 181:29-38.
7. Hammond GA, Johnson JL. The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. Microb Pathog. 1995;19:203-213.
8. Sambol SPMM, Merrigan D, Lysterly DN Gerding, Johnson S. Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease. Infect. Immun 2000;68:5480-5487.
9. Goncalves C, Decre D, Barbut F, Burghoffer B, Petit JC. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyl-transferase) from *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2004;42:1933-9
10. Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, Brazier J, Duerden B, Popoff M. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiol Lett 2000;186:307-12.
11. Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P. Action-specific ADP-ribotransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. Infect Immun 1998;56:2299-306.
12. Kuijper EJ, Coignard B, Tull P. ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*; EU Member States; European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect. 2006; Oct;12 Suppl 6:2-18. Review.
13. Curry SR, Marsh JW, Muto CA, O'Leary MM, Pasculle AW, Harrison LH. *tcdC* genotypes associated with severe *TcdC* truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*, J Clin Microbiol. 2007 Jan;45(1):215-21. Epub 2006 Oct 11. Erratum in: J Clin Microbiol. 2007 Jun;45(6):2103.
14. MacCannell DR, Louie TJ, Gregson DB, Laverdiere M, Labbe AC, Laing F, Henwick S. Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada, J Clin Microbiol. 2006 Jun;44(6):2147-52.
15. Wilkins TD, Lysterly DM. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. Clin Microbiol. 2003 Feb;41(2):531-4. Review.
16. Delmee M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. Clin Microbiol Infect. 2001 Aug;7(8):411-6. Review.
17. Poutanen SM, Simor AE. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. CMAJ. 2004 Jul 6;171(1):51-8. Review.
18. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (fare riferimento all'ultima edizione).
20. REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga, Elenco delle frasi di rischio, direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE (che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006).
21. Occupational Safety and Health Standards, Hazard Communication, Toxic and Hazard Substances (March 26, 2012) (29 C.F.R., pt. 1910, subpt. Z).

24 Ubicazione delle sedi centrali Cepheid

Sede centrale globale

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

Telefono: + 1 408 541 4191
Fax: + 1 408 541 4192
www.cepheid.com

Sede centrale europea

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Telefono: + 33 563 825 300
Fax: + 33 563 825 301
www.cepheidinternational.com

25 Assistenza tecnica

Prima di contattarci

Prima di contattare il Supporto Tecnico di Cepheid, raccogliere le seguenti informazioni:

- Nome del prodotto
- Numero di lotto
- Numero di serie dello strumento
- Messaggi di errore (se presenti)
- Versione del software e, se pertinente, codice riportato sull'etichetta di servizio (Service Tag) del computer

Stati Uniti d'America

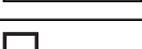
Telefono: + 1 888 838 3222
E-mail: techsupport@cepheid.com

Francia

Telefono: + 33 563 825 319
E-mail: support@cepheideurope.com

Le informazioni di contatto di tutti gli uffici di Supporto Tecnico di Cepheid sono disponibili nel sito: www.cepheid.com/en/support/contact-us

26 Tabella dei simboli

Simbolo	Significato
	Numero di catalogo
	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>
	Non riutilizzare
	Codice lotto
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Attenzione
	Fabbricante
	Paese di produzione
	Contenuto sufficiente per <i>n</i> test
	Controllo
	Data di scadenza
	Marchio CE - Conformità europea
	Limiti di temperatura
	Rischi biologici
	Rappresentante autorizzato in Svizzera
	Importatore



Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna,
Sweden

Tel: +46 8 6843 7000

Fax: +46 8 6843 7010



Cepheid Switzerland GmbH
Zürcherstrasse 66
Postfach 124, Thalwil
CH-8800
Switzerland



Cepheid Switzerland GmbH
Zürcherstrasse 66
Postfach 124, Thalwil
CH-8800
Switzerland



27 Cronologia delle revisioni

Descrizione delle modifiche: 300-9291, dalla Rev. G alla Rev. H

Finalità: correzione dei grafici e conformità ai requisiti del regolamento UE 2017/746

Sezione	Descrizione della modifica
Dichiarazioni relative a marchi di fabbrica, brevetti e copyright	Informazioni legali aggiornate agli standard giuridici attuali di Cepheid.
12	Aggiornamento della formulazione delle sezioni dedicate alla procedura per coerenza tra le diverse Istruzioni per l'uso di Cepheid.
15	Riordino delle figure per corrispondere all'ordine dei risultati nella Tabella 1.
16.2	Aggiornamento della formulazione della sezione Procedura di ripetizione del test per coerenza tra le diverse Istruzioni per l'uso di Cepheid.
26	Aggiunta dei simboli CH REP e Importatore e aggiunta di descrizioni nella tabella dei simboli. Aggiunta dei simboli CH REP e Informazioni sull'importatore con l'indirizzo svizzero.
27	Aggiornamento della tabella Cronologia delle revisioni.
Interamente	Occorrenze del termine "Assay" utilizzato come nome commerciale cambiate in "test".