

Instructions for use

## ***C. difficile* ELITe MGB® Kit**

---

Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR



REF M800358

UDI 08033891486563



**ÄNDERUNGSVERLAUF**

| Rev.      | Änderungsvermerk                                                                                                                                                                        | Datum<br>(TT.MM.<br>JJ) |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 08        | Durchführung des Analysemodells 13 mit den Geräten ELITE InGenius und ELITE BeGenius                                                                                                    | 05/09/25                |
| 07        | Erweiterte Verwendung mit ELITE BeGenius<br>Neue grafische und inhaltliche Gestaltung der Gebrauchsanweisung.                                                                           | 22/11/24                |
| 06        | ELITE InGenius – LEISTUNGSMERKMALE: Potenziell interferierende Marker um Clostridium nexile ergänzt.                                                                                    | 09/09/24                |
| 05        | Analysedaten (Überprüfung der Nachweisgrenze, Äquivalenz der Matrix-Vorbehandlungen, potenziell interferierende Marker und Substanzen) und alternative Methode der Probenvorbehandlung. | 15/03/24                |
| 00–<br>04 | Neuproduktentwicklung und nachfolgende Änderungen                                                                                                                                       | -                       |

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 VERWENDUNGSZWECK</b>                                            | <b>4</b>  |
| <b>2 ERLÄUTERUNG DES ASSAYS</b>                                      | <b>4</b>  |
| <b>3 TESTPRINZIP</b>                                                 | <b>4</b>  |
| <b>4 BESCHREIBUNG DES PRODUKTS</b>                                   | <b>5</b>  |
| <b>5 MIT DEM PRODUKT BEREITGESTELLTE MATERIALIEN</b>                 | <b>5</b>  |
| <b>6 ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN</b>         | <b>5</b>  |
| <b>7 ANDERE ERFORDERLICHE PRODUKTE</b>                               | <b>5</b>  |
| <b>8 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN</b>                        | <b>6</b>  |
| <b>9 PROBEN UND KONTROLLEN bei ELITE InGenius und ELITE BeGenius</b> | <b>8</b>  |
| <b>10 VERFAHREN BEI ELITE InGenius</b>                               | <b>10</b> |
| <b>11 VERFAHREN BEI ELITE BeGenius</b>                               | <b>16</b> |
| <b>12 LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITE InGenius und ELITE BeGenius</b>    | <b>20</b> |
| <b>13 PROBEN UND KONTROLLEN BEI ANDEREN SYSTEMEN</b>                 | <b>31</b> |
| <b>14 VERFAHREN BEI ANDEREN SYSTEMEN</b>                             | <b>34</b> |
| <b>15 LEISTUNGSMERKMALE BEI ANDEREN SYSTEMEN</b>                     | <b>40</b> |
| <b>16 REFERENZEN</b>                                                 | <b>52</b> |
| <b>17 GRENZEN DES VERFAHRENS</b>                                     | <b>52</b> |
| <b>18 FEHLERBEHEBUNG</b>                                             | <b>53</b> |
| <b>19 SYMBOLE</b>                                                    | <b>57</b> |
| <b>20 ANWENDERHINWEISE</b>                                           | <b>57</b> |
| <b>21 HINWEIS FÜR DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ</b>              | <b>57</b> |
| <b>Appendix A QUICK START GUIDE</b>                                  | <b>59</b> |

# 1 VERWENDUNGSZWECK

Das Produkt **C. difficile ELITE MGB® Kit** ist ein In-vitro-Diagnostikum, das für die Anwendung durch medizinisches Fachpersonal als qualitativer Multiplex-Nukleinsäure-Echtzeit-PCR-Assay für den **Nachweis des Toxin-A-Gens und Toxin B-Gens von toxischem Clostridium difficile** (alias *Clostridioides difficile*, **C. difficile**), einschließlich des hypervirulenten epidemischen NAP1/BI/027-Stamms, in DNA-Proben, die aus ungeformten oder flüssigen Stuhlproben extrahiert wurden, bestimmt ist.

Dieser Assay ist in Verbindung mit den Geräten **ELITE InGenius®** und **ELITE BeGenius®**, automatisierten und integrierten Systemen zur Extraktion, Real-Time-PCR und Ergebnisinterpretation mit humanen Stuhlproben validiert.

Der Assay ist außerdem in Verbindung mit dem **7500 Real-Time PCR System** für die Verwendung mit humanen Stuhlproben validiert.

Das Produkt ist in Kombination mit den klinischen Daten und weiteren Laborbefunden des Patienten zur Verwendung als Hilfsmittel bei der Diagnose von toxischen **C. difficile**-Infektionen im Gesundheitswesen bestimmt.

Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen alle relevanten klinischen Beobachtungen und Laborbefunde herangezogen werden.

# 2 ERLÄUTERUNG DES ASSAYS

Eine toxische *C. difficile*-Infektion äußert sich in der Regel als leichter bis mittelschwerer Durchfall, der gelegentlich mit Bauchkrämpfen einhergeht. In seltenen Fällen können Patienten mit toxischer *C. difficile*-Infektion ein akutes Abdomen und eine fulminante, lebensbedrohliche Kolitis entwickeln. Etwa 20 % der Personen, die ins Krankenhaus eingewiesen werden, infizieren sich während des Krankenhausaufenthalts mit toxischem *C. difficile*, und mehr als 30 % dieser Patienten entwickeln Durchfall. Somit ist die toxische **C. difficile**-Kolitis derzeit eine der häufigsten nosokomialen Infektionen. Die Verdachtsdiagnose einer toxischen *C. difficile*-Kolitis sollte bei jedem Patienten mit Durchfall gestellt werden, der innerhalb der letzten 2 Monate Antibiotika erhalten hat und/oder wenn der Durchfall 72 Stunden oder mehr nach dem Krankenhausaufenthalt auftritt. Die Kolonisierung erfolgt über den fäkal-oralen Weg. Die pathogenen Stämme von toxischem *C. difficile* produzieren 2 verschiedene Toxine. Toxin A ist ein Enterotoxin, und Toxin B ist ein Zytotoxin. Sowohl Toxin A als auch Toxin B scheinen eine Rolle bei der Pathogenese der toxischen *C. difficile*-Kolitis beim Menschen zu spielen.

Das **C. difficile ELITE MGB Kit** besteht aus einem auf Echtzeit-Amplifikation basierenden Triplex-Assay, der auf das Toxin-A- und das Toxin-B-Gen von toxischem *C. difficile* abzielt, sowie einer internen Kontrolle. Auf Echtzeit-Amplifikation basierende Assays verkürzen die Laborzeit im Vergleich zu Standard-Kulturtests erheblich und verbessern die Effizienz des Verfahrens.

Das **C. difficile ELITE MGB Kit** zielt sowohl auf das Toxin-A-Gen (tcdA) als auch auf das Toxin-B-Gen (tcdB) ab. Somit werden alle möglichen toxischen Genotypen (A+/B+; A+/B-; A-/B+) nachgewiesen.

# 3 TESTPRINZIP

Der Assay ist eine qualitative Echtzeit-PCR für den Nachweis des **Toxin-A- und des Toxin B-Gens von toxischem Clostridium difficile** (*C. difficile*), einschließlich des hypervirulenten epidemischen NAP1/BI/027-Stamms, die aus Proben isoliert und mit dem Testreagenz **PCR Mix**, das Primer und ELITE MGB-Technologie-Sonden enthält, amplifiziert wurden.

Die ELITE MGB-Sonden werden aktiviert, wenn sie mit den jeweiligen PCR-Produkten hybridisieren. **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** überwachen den Fluoreszenzanstieg und berechnen die Schwellenwertzyklen (Ct) sowie die Schmelztemperaturen (Tm).

Bei den ELITE MGB-Sonden werden die Fluorophore im spiralförmig gefalteten, einzelsträngigen Zustand der Sonde gequenchet. Die Fluorophore sind in der Sonden/Amplicon-Duplex aktiv, da der Quencher räumlich von dem Fluorophor getrennt ist.

Es ist zu beachten, dass das Fluorophor während der PCR nicht abgespalten wird und für die Dissoziationsanalyse und die Berechnung der Schmelztemperatur verwendet werden kann.

## 4 BESCHREIBUNG DES PRODUKTS

Das **C. difficile ELITE MGB Kit** enthält das Assay-Reagenz **C. difficile PCR Mix**, ein optimiertes und stabilisiertes PCR-Gemisch, das die spezifischen Primer und Sonden enthält für:

- **C. difficile-Toxin A-spezifisches Gen, nachgewiesen in Kanal Toxin A**; die Sonde ist durch den MGB stabilisiert, mit dem Eclipse Dark Quencher gequencht und mit dem Farbstoff AquaPhluor® 525 (AP525) markiert.
- **C. difficile-Toxin B-spezifisches Gen, nachgewiesen in Kanal Toxin B**; die Sonde ist durch den MGB stabilisiert, mit dem Eclipse Dark Quencher gequencht und mit einem FAM-Farbstoff markiert.
- **Internal Control (IC)**, spezifisch für die künstliche Sequenz **IC2**, nachgewiesen in Kanal **IC**; die Sonde ist durch den MGB stabilisiert, mit dem Eclipse Dark Quencher gequencht und mit dem Farbstoff AquaPhluor 642 (AP642) markiert.

Das Reaktionsgemisch **C. difficile PCR Mix** enthält außerdem Puffer, Magnesiumchlorid, Nukleotidtriphosphate und „Hot-start“-DNA-Polymerase.

Das Produkt **C. difficile ELITE MGB Kit** enthält ausreichend Reagenzien für **96 Tests** auf dem **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius**, wobei 20 µl pro Reaktion verwendet werden.

Das Produkt enthält ausreichend Reagenzien für **100 Tests auf anderen Systemen**, wobei 20 µl pro Reaktion verwendet werden.

## 5 MIT DEM PRODUKT BEREITGESTELLTE MATERIALIEN

Tabelle 1

| Komponente                                      | Beschreibung                                                                      | Menge             | Gefahrenklasse |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------|
| <b>C. difficile-PCR-Mix</b><br>Art.-Nr. M800358 | Gemisch aus Reagenzien für<br>Real-Time-PCR-<br>Röhrchen <b>GELBEM Verschluss</b> | <b>4 x 540 µl</b> | -              |

## 6 ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

- Laminar-Flow-Haube.
- Puderfreie Einweghandschuhe aus Nitril oder einem ähnlichen Material.
- Vortex-Mixer.
- Tischzentrifuge (~5.000 U/min).
- Tisch-Mikrozentrifuge (~13.000 U/min).
- Mikropipetten und sterile Spitzen mit Aerosolfilter oder sterile Direktverdrängerspitzen (Volumenbereich: 0,5–1000 µl).
- sterile 2,0-ml-Röhrchen mit Schraubverschluss (Sarstedt, Art.-Nr. 72.694.005).
- sterile 0,5-ml-Röhrchen mit Schraubverschluss (Sarstedt, Art.-Nr. 72.730.005)
- Hochreines Wasser für die Molekularbiologie.

## 7 ANDERE ERFORDERLICHE PRODUKTE

Die Reagenzien für die Extraktion der Proben-DNA, die interne Extraktions- und Inhibitionskontrolle, die Amplifikations-Positiv- und Negativkontrolle und die Verbrauchsmaterialien sind nicht in diesem Produkt enthalten.

Für die automatisierte Nukleinsäureextraktion, Echtzeit-PCR und Ergebnisinterpretation von Proben werden die folgenden Produkte benötigt.

**Tabelle 2**

| Geräte und Software                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Produkte und Reagenzien                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ELITE InGenius</b> (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, Art.-Nr. INT030).<br><b>ELITE InGenius Software</b> , Version 1.3.0.19 (oder später).<br><b>Cdiff ELITE_PC</b> , Assay Protocol (Assay-Protokoll) mit Parametern für die Positive Control-Analyse.<br><b>Cdiff ELITE_NC</b> , Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Negative Control-Analyse.<br><b>Cdiff ELITE_ST_200_100</b> , Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Stuhlproben-Analyse. | <b>ELITE InGenius SP200</b> (EG SpA., Art.-Nr. INT032SP200)<br><b>CPE - Internal Control</b> (EG SpA, Art.-Nr. CTCRCPE).<br><b>C. difficile – ELITE Positive Control</b> (EG SpA, Art.-Nr. M800373)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>ELITE BeGenius</b> (EG SpA, Art.-Nr. INT040).<br><b>ELITE BeGenius Software</b> , Version 2.3.0 (oder später).<br><b>Cdiff ELITE_Be_PC</b> , Assay Protocol (Assay-Protokoll) mit Parametern für die Positive Control-Analyse.<br><b>Cdiff ELITE_Be_NC</b> , Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Negative Control-Analyse.<br><b>Cdiff ELITE_Be_ST_200_100</b> , Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Stuhlproben-Analyse.                | <b>ELITE InGenius</b> und <b>ELITE BeGenius</b> Verbrauchsmaterialien (siehe ELITE InGenius und ELITE BeGenius Gebrauchsanweisung)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument</b> (ThermoFisher Scientific, Art.-Nr. 4406985)<br><b>NucliSENS® easyMAG®</b> (bioMérieux SA, Art.-Nr. 200111)<br><b>ELITE STAR</b> (EG S.p.A., Art.-Nr. INT010)<br><b>ELITE GALAXY</b> (EG SpA, Art.-Nr. INT020)                                                                                                                                                                                                                          | <b>MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL</b> (Life Technologies, Art.-Nr. 4346906)<br><b>NucliSENS® easyMAG® Reagents</b> (bioMérieux SA, Art.-Nr. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135),<br><b>InviMag Universal Kit / IG</b> (INVITEK, Art.-Nr. 2450120100).<br><b>ELITE GALAXY 300 Extraction Kit</b> (EG SpA, Art.-Nr. INT021EX).<br><b>CPE – Internal Control</b> (EG SpA, Art.-Nr. CTCRCPE)<br><b>C. difficile – ELITE Positive Control</b> (EG SpA, Art.-Nr. M800373)<br><b>S.T.A.R. buffer</b> (Roche Diagnostics GmbH, Art.-Nr. 3 335 208). |

## 8 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Dieses Produkt ist nur für den In-vitro-Gebrauch bestimmt.

### Allgemeine Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Alle biologischen Proben sind so zu handhaben und zu entsorgen, als wären sie infektiös. Direkten Kontakt mit biologischen Proben vermeiden. Verspritzen und Aerosolbildung vermeiden. Röhrchen, Spitzen und andere Materialien, die mit den biologischen Proben in Kontakt kommen, müssen vor der Entsorgung mindestens 30 Minuten lang mit 3%igem Natriumhypochlorit (Bleiche) behandelt oder eine Stunde lang bei 121 °C autoklaviert werden.

Alle zur Durchführung des Tests verwendeten Reagenzien und Materialien sind so zu handhaben und zu entsorgen, als wären sie infektiös. Direkten Kontakt mit den Reagenzien vermeiden. Verspritzen und Aerosolbildung vermeiden. Abfall ist unter Einhaltung angemessener Sicherheitsstandards zu handhaben und zu entsorgen. Brennbares Einwegmaterial muss verbrannt werden. Saurer und basischer Flüssigabfall muss vor der Entsorgung neutralisiert werden. Extraktionsreagenzien dürfen nicht mit Natriumhypochlorit (Bleiche) in Kontakt kommen.

Geeignete Schutzkleidung und Schutzhandschuhe sowie Augen-/Gesichtsschutz tragen.

Lösungen niemals mit dem Mund pipettieren.

Das Essen, Trinken, Rauchen oder die Verwendung von Kosmetika ist in den Arbeitsbereichen untersagt.

Nach der Handhabung von Proben und Reagenzien gründlich die Hände waschen.

Restliche Reagenzien und Abfälle gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.

Vor der Durchführung des Assays alle bereitgestellten Anweisungen aufmerksam lesen.

Bei der Durchführung des Tests die bereitgestellten Produktanweisungen befolgen.

Das Produkt nicht nach dem angegebenen Ablaufdatum verwenden.

Es dürfen nur mit dem Produkt bereitgestellte und vom Hersteller empfohlene Reagenzien verwendet werden.

Keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen verwenden.

Keine Reagenzien anderer Hersteller verwenden.

### Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für die Molekularbiologie

Molekularbiologische Verfahren dürfen nur von qualifizierten und geschulten Fachkräften durchgeführt werden, um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden, insbesondere im Hinblick auf den Nukleinsäureabbau in den Proben oder die Probenkontamination durch PCR-Produkte.

Bei manueller Einrichtung des Amplifikationslaufs ist eine räumliche Trennung von Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten zu beachten. Niemals ein Amplifikationsprodukt in den für die Extraktion/Vorbereitung von Amplifikationsreaktionen vorbehaltenen Bereich einführen.

Bei manueller Einrichtung des Amplifikationslaufs müssen Laborkittel, Schutzhandschuhe und Hilfsmittel vorhanden sein, die ausschließlich für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten verwendet werden.

Niemals Laborkittel, Schutzhandschuhe oder Hilfsmittel aus dem für die Amplifikation / den Nachweis von Amplifikationsprodukten vorbehaltenen Bereich in den für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen vorbehaltenen Bereich bringen.

Es werden Laborkittel, Handschuhe und Werkzeuge benötigt, die speziell für den jeweiligen Arbeitslauf vorgesehen sind.

Die Proben müssen geeignet und möglichst für diese Art der Analyse bestimmt sein. Proben müssen unter einer Laminar-Flow-Haube gehandhabt werden. Die zur Verarbeitung der Proben verwendeten Pipetten dürfen ausschließlich für diesen Zweck verwendet werden. Die Pipetten müssen entweder Direktverdrängungspipetten sein oder zusammen mit Aerosolfilterspitzen verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril und sowohl DNase- und RNase-frei als auch DNA- und RNA-frei sein.

Die Reagenzien müssen unter einer Sicherheitswerkbank gehandhabt werden. Die Pipetten, die für die Handhabung der Reagenzien verwendet werden, dürfen nur für diesen Zweck verwendet werden. Die Pipetten müssen entweder Direktverdrängungspipetten sein oder zusammen mit Aerosolfilterspitzen verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril, frei von DNasen und RNasen sowie frei von DNA und RNA sein.

Die Extraktionsprodukte müssen so verwendet werden, dass eine Freisetzung in die Umgebung verhindert und eine Kontamination des Arbeitsbereichs des Geräts vermieden wird.

Die PCR-Kassette (PCR Cassette) muss vorsichtig behandelt werden und darf niemals geöffnet werden, um eine Diffusion von PCR-Produkten in die Umgebung und eine Verschleppungskontamination zu verhindern.

### Komponentenspezifische Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

**Tabelle 3**

| Komponente                  | Umgebungstemperatur bei Lagerung      | Haltbarkeit nach Anbruch | Tiefgefrier-Auftau-Zyklen | On-Board-Stabilität (ELITE InGenius und ELITE BeGenius) |
|-----------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>C. difficile-PCR-Mix</b> | -20 °C oder darunter (lichtgeschützt) | einen Monat              | bis zu fünf               | bis zu fünf separate* Läufe von jeweils drei Stunden    |

## 9 PROBEN UND KONTROLLEN bei ELITe InGenius und ELITe BeGenius

### 9.1 Proben

Dieses Produkt ist für die Verwendung auf dem **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** mit den folgenden klinischen Proben, die gemäß den Laborrichtlinien identifiziert und gehandhabt und unter den folgenden Bedingungen entnommen, transportiert und aufbewahrt wurden, bestimmt:

**Tabelle 4**

| Probe         | Anforderungen an die Entnahme       | Transport-/Lagerbedingungen      |              |             |             |
|---------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------------|-------------|-------------|
|               |                                     | +16 / +26 °C<br>(Raumtemperatur) | +2 – +8 °C*  | -20 ± 10 °C | -70 ± 15 °C |
| Nativer Stuhl | ohne Konservierungsmittel entnommen | ≤ 24 Stunden                     | ≤ 48 Stunden | ≤ 1 Monat   | > 1 Monat   |

Es wird empfohlen, die Proben vor dem Einfrieren in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen. Bei Verwendung von gefrorenen Proben müssen die Proben vor der Extraktion aufgetaut werden, um einen möglichen Nukleinsäureabbau zu vermeiden.

Befolgen Sie zur Probenvorbehandlung mit InhibitEX Buffer (QIAGEN, Deutschland, Art.-Nr. 19593) die nachstehend beschriebenen Anweisungen:

Vorbehandlungsverfahren ausgehend von nativem Stuhl, der ohne Konservierungsmittel gesammelt wurde

- 1 ml InhibitEX Buffer in ein 2-ml-Sarstedt-Röhrchen übertragen,
- die Stuhlprobe mit einem Minitip Flocked Swab mit Sollbruchstelle bei 80 mm (Copan) sammeln, die Probe aus verschiedenen Stuhlabschnitten aufnehmen und den Überschuss entsorgen; hierfür den Tupferschaft gegen die Behälterwand drücken und abbrechen,
- den Tupfer in das 2-ml-Sarstedt-Röhrchen mit dem InhibitEX Buffer einführen und mindestens 10 Mal drehen; dabei an der Röhrchenwand entlangstreifen,
- den Tupfer entsorgen und den Röhrchenverschluss schließen,
- durch Vortexen ~60 Sek. mischen,
- in einem Thermomixer 10 Min. bei ~+80 °C und ~800 U/min inkubieren,
- 15 Sek. bei 10.000 xg (RZB) zentrifugieren,
- 200 µl des geklärten Stuhlüberstands vorsichtig in ein Extraktionsröhrchen (beim Gerät ELITe InGenius) oder in ein 2-ml-Sarstedt-Röhrchen (beim Gerät ELITe BeGenius) überführen, dabei darauf achten, dass das pelletierte fäkale Material nicht beeinträchtigt wird.

Befolgen Sie zur Probenvorbehandlung mit S. T. A. R. Buffer (Roche Diagnostics GmbH, Art.-Nr. 3 335 208) die nachstehend beschriebenen Anweisungen:

Vorbehandlungsverfahren ausgehend von nativem Stuhl, der ohne Konservierungsmittel gesammelt wurde

- Für jeden Rohstuhl ein beschriftetes 1,5-ml-Röhrchen vorbereiten und 0,8 ml des S. T. A. R. Buffer in ein Röhrchen geben.
- Rohstuhl vortexen, dann einen Pipettierer mit einer Aerosol-resistenten Spitze verwenden, um ca. 200 µl (bei dicken Stuhlproben eine Spitze mit breiter Öffnung oder einen Plastikspatel verwenden) des Rohstuhls in das 1,5-ml-Röhrchen mit dem S.T.A.R. Buffer überführen.
- Das Röhrchen dicht verschließen und dann vortexen, um das Gemisch zu homogenisieren (20–30 s).
- Die homogenisierte Lösung 1 Minute lang bei 13.000 xg (RZB) zentrifugieren, um die Probe zu klären.
- 200 µl des geklärten Stuhlüberstands vorsichtig in ein Extraktionsröhrchen (beim Gerät ELITe InGenius) oder in ein 2-ml-Sarstedt-Röhrchen (beim Gerät ELITe BeGenius) überführen.
- Der geklärten Stuhl darf bis zu 7 Tage bei +2 bis +8 °C aufbewahrt werden, bevor mit der Extraktion fortgefahren wird.

**HINWEIS!**

Der S.T.A.R. Puffer muss bei Raumtemperatur gelagert werden. Wenn der Puffer unter Raumtemperatur gelagert wird, können sich weiße Ausfällungen bilden. Vor Beginn des Extraktionsverfahrens prüfen, ob sich Ausfällungen gebildet haben, und die Lösung in diesem Fall im Wasserbad oder im Inkubator auf 30–40 °C erwärmen, bis sich die Ausfällungen aufgelöst haben.

Aufgereinigte Nukleinsäuren bei +2 bis +8 °C aufbewahren, wenn sie noch am Tag der Extraktion verwendet werden, bzw. bei einer Temperatur unter -20 °C bei Langzeitlagerung.

Zum Testen von Proben mit dem **ELITE InGenius** und dem **ELITE BeGenius** müssen die folgenden Assay-Protokolle (Assay Protocol) verwendet werden. Diese IVD-Protokolle wurden speziell mit ELITE MGB Kits und **ELITE InGenius** bzw. **ELITE BeGenius** mit den angegebenen Matrices validiert.

**Tabelle 5 Assay-Protokolle für C. difficile ELITE MGB Kit**

| Probe                                                        | Gerät                 | Name des Assay-Protokolls        | Bericht         | Eigenschaften                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nativer Stuhl, der ohne Konservierungsmittel gesammelt wurde | <b>ELITE InGenius</b> | <b>Cdiff ELITE_ST_200_100</b>    | Positiv/negativ | Extraktion Eingangsvolumen: 200 µl<br>Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl<br>Interne Kontrolle: 10 µl<br>Beschallung: KEINE<br>Volumen PCR-Mix: 20 µl<br>Eingangsvolumen Proben-PCR: 10 µl |
|                                                              | <b>ELITE BeGenius</b> | <b>Cdiff ELITE_Be_ST_200_100</b> |                 |                                                                                                                                                                                          |

Bei allen Protokollen müssen 200 µl vorbehandelte Probe in ein Extraction Tube (Extraktionsröhrchen) (bei ELITE InGenius) bzw. ein 2-ml-Sarstedt-Röhrchen (bei ELITE BeGenius) überführt werden.

**HINWEIS!**

Das Pipettieren in das **Extraktionsröhrchen** oder das **2-ml-Sarstedt-Röhrchen** kann **Kontamination verursachen**. Die geeigneten Pipetten verwenden und alle im entsprechenden Abschnitt aufgeführten Empfehlungen befolgen. 8 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN page 6

Aufgereinigte Nukleinsäuren können bei Raumtemperatur 16 Stunden und bei -20 °C oder darunter höchstens einen Monat aufbewahrt werden.

Daten zu störenden Substanzen sind im Abschnitt „[12 LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITE InGenius und ELITE BeGenius page 20](#)“ unter „Potenziell interferierende Substanzen“ aufgeführt.

## 9.2 PCR-Kontrollen

Die Ergebnisse der PCR-Kontrollen müssen für jede Charge des PCR-Reagenzes erstellt und genehmigt werden.

- Für die Positive Control das Produkt **C. difficile - ELITE Positive Control** (nicht in diesem Kit enthalten) mit dem Assay-Protokoll **Cdiff ELITE\_PC** oder **Cdiff ELITE\_Be\_PC** verwenden,
- Für die Negative Control hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht in diesem Kit enthalten) mit dem Assay-Protokoll **Cdiff ELITE\_NC** oder **Cdiff ELITE\_Be\_NC** verwenden.

**HINWEIS!**

**ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** ermöglichen die Erstellung und Speicherung der Validierung der PCR-Kontrollen für jede PCR-Reagenziencharge. Die Ergebnisse der PCR-Kontrollen verfallen nach **15 Tagen**, danach müssen die Positive Control und die Negative Control erneut durchgeführt werden.

Die PCR-Kontrollen müssen erneut generiert werden, wenn eines der folgenden Ereignisse eintritt:

- eine neue Reagenziencharge wird verwendet,
- die Ergebnisse der Qualitätskontrollanalyse (siehe nächster Abschnitt) liegen außerhalb der Spezifikation,
- eine größere Wartungs- oder Instandhaltungsmaßnahme am **ELITE InGenius** oder **ELITE BeGenius** durchgeführt wird.

### 9.3 Qualitätskontrollen

Es wird empfohlen, das Extraktions- und PCR-Verfahren zu überprüfen. Es können archivierte Proben oder zertifiziertes Referenzmaterial verwendet werden. Externe Kontrollen sind gemäß den einschlägigen Anforderungen der lokalen, staatlichen und föderalen Akkreditierungsorganisationen zu verwenden.

Externe Kontrollen für *Clostridium difficile*-Assays werden von mehreren Herstellern angeboten (z. B. Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich, und ZeptoMetrix Corp., USA).

## 10 VERFAHREN BEI ELITE InGenius

Das beim Gebrauch des **C. difficile ELITE MGB Kit** mit dem **ELITE InGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

**Tabelle 6**

|                  |                                            |                                                                            |
|------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>SCHRITT 1</b> | Prüfung der Systembereitschaft             |                                                                            |
| <b>SCHRITT 2</b> | Einrichtung des Laufs                      | A) Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR])                           |
|                  |                                            | B) Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR])                           |
|                  |                                            | C) Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR]) |
| <b>SCHRITT 3</b> | Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse | 1) Validierung der Ergebnisse der Positive Control und Negative Control    |
|                  |                                            | 2) Validierung der Probenergebnisse                                        |
|                  |                                            | 3) Ausgabe des Probenergebnisberichts                                      |

### SCHRITT 1 - Prüfung der Systembereitschaft

Vor Beginn des Laufs:

- **ELITE InGenius** einschalten und den Modus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen,
- auf der Startseite im Menü „Controls“ (Kontrollen) bestätigen, dass die PCR-Kontrollen (**Positive Control**, **Negative Control**) für die zu verwendende Charge des **PCR Mix** genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen PCR-Kontrollen für die Charge **PCR Mix** verfügbar sind, die PCR-Kontrollen wie in den folgenden Abschnitten beschrieben durchführen,
- den Typ des Laufs auswählen, dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche zur Einrichtung des Laufs befolgen und die von EG SpA bereitgestellten Assay-Protokolle verwenden (siehe „Proben und Kontrollen“).

Falls das betreffende Assay Protokoll nicht im System geladen ist, wenden Sie sich an Ihren ELITEchGroup Kundendienstvertreter vor Ort.

### SCHRITT 2 - Einrichtung des Laufs

Das **C. difficile ELITE MGB Kit** kann auf **ELITE InGenius** für die folgenden Läufe verwendet werden:

- Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR]),
- Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR]),
- Positive Control und Negative Control-Lauf (PCR Only [nur PCR])

Alle benötigten Parameter sind in den auf dem Gerät verfügbaren Assay Protokollen enthalten und werden bei Auswahl des Assay Protokolls automatisch geladen.

### HINWEIS!

**ELITE InGenius** kann mit dem „Laboratory Information System“ (Laborinformationssystem – LIS) verbunden werden, worüber die Laufinformationen heruntergeladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

Vor dem Einrichten eines Laufs:

Die benötigten PCR Mix-Röhrchen 30 Minuten auf Raumtemperatur auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für **24 Tests** unter optimalen Bedingungen (mindestens 5 Tests pro Lauf). Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.

### HINWEIS!

Den **PCR Mix** lichtgeschützt auftauen lassen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

Zum Einrichten eines der drei Lauftypen die folgenden Schritte unter Beachtung der grafischen Benutzeroberfläche ausführen.

**Tabelle 7**

|          | <b>A. Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR])</b>                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>B. Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR])</b>                                                                                                                                                                              | <b>C. Lauf für Positive und Negative Control (PCR Only [nur PCR])</b>                                                                                                                                                                                         |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1</b> | <b>Proben identifizieren</b> und, falls erforderlich, auf Raumtemperatur auftauen.<br>Die Proben gemäß dem im Abschnitt „Proben und Kontrollen“ beschriebenen Verfahren vorbehandeln.<br>Für diesen Assay müssen <b>200 µl vorbehandelte Probe</b> in ein zuvor beschriftetes Extraktionsröhrchen überführt werden. | <b>Elutionsröhrchen</b> mit den extrahierten Nukleinsäuren auf Raumtemperatur <b>auftauen</b> .<br>Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern. | Positive Control-Röhrchen 30 Minuten auf Raumtemperatur <b>auftauen</b> .<br>Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.<br>Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Reaktionen. |
| <b>2</b> | Die benötigten <b>CPE-Röhrchen</b> 30 Minuten auf Raumtemperatur <b>auftauen</b> . Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern. Jedes Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen.                                                        | Nicht anwendbar                                                                                                                                                                                                                      | Die <b>Negative Control vorbereiten</b> : dazu mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie in ein „Elution Tube“ (Elutionsröhr.) überführen, das im Lieferumfang des ELITE InGenius SP 200 Consumable Set enthalten ist.                     |
| <b>3</b> | Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.                                                                                                                                                                                                                                                      | Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.                                                                                                                                                                       | Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.                                                                                                                                                                                                |
| <b>4</b> | Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktion Eingangsvolumen) 200 µl und das extrahierte „Extracted Elute Volume“ (Extrahiertes Eluatvolumen) 100 µl beträgt.                                                                                                                                      | Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktion Eingangsvolumen) 200 µl und das extrahierte „Extracted Elute Volume“ (Extrahiertes Eluatvolumen) 100 µl beträgt.                                                       | Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktion Eingangsvolumen) 200 µl und das extrahierte „Extracted Elute Volume“ (Extrahiertes Eluatvolumen) 100 µl beträgt.                                                                                |
| <b>5</b> | Für jede Probe eine Spur zuweisen und unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.                                                                                                                                                                                             | Für jede Probe eine Spur zuweisen und unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.                                                                                                              | Nicht anwendbar                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>6</b> | <b>Das Assay-Protokoll</b> in der Spalte „Assay“ (Prüfung) <b>auswählen</b> (siehe „Proben und Kontrollen“).                                                                                                                                                                                                        | <b>Das Assay-Protokoll</b> in der Spalte „Assay“ (Prüfung) <b>auswählen</b> (siehe „Proben und Kontrollen“).                                                                                                                         | <b>Das Assay-Protokoll</b> in der Spalte „Assay“ (Prüfung) <b>auswählen</b> (siehe „Proben und Kontrollen“). Die Chargennummer und das Ablaufdatum der Positive Control und des hochreinen Wassers für die Molekularbiologie eingeben.                        |
| <b>7</b> | Sicherstellen, dass unter „Protocol“ (Protokoll) Folgendes angezeigt wird: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).                                                                                                                                                                                                      | In der Spalte „Protocol“ (Protokoll) „PCR Only“ (nur PCR) auswählen.                                                                                                                                                                 | Sicherstellen, dass in der Spalte „Protocol“ (Protokoll) „PCR Only“ (nur PCR) ausgewählt ist.                                                                                                                                                                 |

Tabelle 7 (continued)

|    | A. Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR])                                                                                                                                                                                       | B. Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR])                                                                                                                                                                    | C. Lauf für Positive und Negative Control (PCR Only [nur PCR])                                                                                                                                                      |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8  | Als Proben-Ladeposition „Extraction Tube“ (Extraktionsröhrchen) in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) auswählen.                                                                                                            | Sicherstellen, dass die Ladeposition der Probe in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) „Elution Tube (bottom row)“ (Elutionsröhr [untere Reihe]) lautet.                                                   | Sicherstellen, dass die Ladeposition der Probe in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) „Elution Tube (bottom row)“ (Elutionsröhr [untere Reihe]) lautet.                                                   |
| 9  | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                          | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                       | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                       |
| 10 | <b>CPE und PCR Mix</b> gemäß der „Load List“ (Liste Laden) auf den „Inventory Block“ (Bestandsmanager) <b>laden</b> und die Chargennummer und das Ablaufdatum des PCR Mix sowie die Anzahl der Reaktionen für jedes Röhrchen eingeben. | PCR Mix gemäß der „Load List“ (Ladeliste) auf den „Inventory Block“ (Bestandsblock) <b>laden</b> und die Chargennummer und das Ablaufdatum des PCR Mix sowie die Anzahl der Reaktionen für jedes Röhrchen eingeben. | PCR Mix gemäß der „Load List“ (Ladeliste) auf den „Inventory Block“ (Bestandsblock) <b>laden</b> und die Chargennummer und das Ablaufdatum des PCR Mix sowie die Anzahl der Reaktionen für jedes Röhrchen eingeben. |
| 11 | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                          | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                       | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                       |
| 12 | Die Spitzen in den „Tip Racks“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Inventarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.                                                                                                         | Die Spitzen in den „Tip Racks“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Inventarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.                                                                                      | Die Spitzen in den „Tip Racks“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Inventarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.                                                                                      |
| 13 | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                          | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                       | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                       |
| 14 | PCR Cassette, ELITE InGenius SP 200 Extraktionskartuschen und alle benötigten Verbrauchsmaterialien und zu extrahierenden Proben <b>laden</b> .                                                                                        | PCR Cassette und Elution Tube (Elutionsröhrchen) mit extrahierten Proben <b>laden</b> .                                                                                                                             | PCR Cassette, Positive Control- und Negative Control-Röhrchen <b>laden</b> .                                                                                                                                        |
| 15 | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                          | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                       | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                       |
| 16 | Schließen Sie die Gerätetür.                                                                                                                                                                                                           | Schließen Sie die Gerätetür.                                                                                                                                                                                        | Schließen Sie die Gerätetür.                                                                                                                                                                                        |
| 17 | „Start“ (Starten) drücken.                                                                                                                                                                                                             | „Start“ (Starten) drücken.                                                                                                                                                                                          | „Start“ (Starten) drücken.                                                                                                                                                                                          |

Nach Beendigung des Laufs ermöglicht **ELITE InGenius** es dem Benutzer, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

### HINWEIS!

Am Ende des Laufs muss die übrige extrahierte Probe im **Elution Tube** (Elutionsröhr.) aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen, gekennzeichnet und maximal einen Monat bei  $-20 \pm 10$  °C aufbewahrt werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

### HINWEIS!

Am Ende des Laufs kann der **PCR Mix** aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei  $-20$  °C oder darunter aufbewahrt oder für bis zu 5 Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block aufbewahrt werden; vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

### HINWEIS!

Am Ende des Laufs kann die übrige **Positive Control** aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei  $-20$  °C oder darunter aufbewahrt werden. Ein Verschütten der **Positive Control** vermeiden. Die übrige **Negative Control** muss entsorgt werden.

**HINWEIS!**

Die **Positive Control** kann für 4 separate Läufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden.

**HINWEIS!**

Am Ende des Laufs müssen die **PCR Cassette** und die anderen Verbrauchsmaterialien unter Berücksichtigung sämtlicher gesetzlicher und umweltrechtlicher Vorschriften entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

**SCHRITT 3 - Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse**

**ELITE InGenius** überwacht die Fluoreszenzsignale der Zielsequenz und der Internal Control für jede Reaktion und wendet die Assay-Protokoll-Parameter automatisch an, um PCR-Kurven zu erstellen, anhand derer anschließend die Ergebnisse interpretiert werden.

Am Ende des Laufs wird der Bildschirm „Results Display“ (Ergebnisanzeige) automatisch angezeigt. Auf diesem Bildschirm werden die Ergebnisse und Laufdaten angezeigt. Über diesen Bildschirm können Ergebnisse genehmigt und Berichte („Sample Report“ (Probenbericht) oder „Track Report“ (Spurbericht)) ausgedruckt oder gespeichert werden. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

**HINWEIS!**

**ELITE InGenius** kann mit dem „Laboratory Information System“ (Laborinformationssystem – LIS) verbunden werden, worüber die Laufinformationen heruntergeladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

**ELITE InGenius** generiert Ergebnisse mithilfe des **C. difficile ELITE MGB Kit** und geht dabei folgendermaßen vor:

1. Validierung der Positive Control- und Negative Control-Ergebnisse,
2. Validierung der Probenergebnisse,
3. Ausgabe des Probenergebnisberichts.

**Validierung der Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und die Negative Control**

Die **ELITE InGenius Software** interpretiert die PCR-Ergebnisse für die Zielsequenzen der Reaktion der Positive Control und der Negative Control mit den Parametern der Assay-Protokolle (Assay Protocols) **ELITE\_PC** und **ELITE\_NC**. Die sich daraus ergebenden Ct- und Tm-Werte werden zur Überprüfung des Systems (Reagenziencharge und Gerät) verwendet.

Die für die PCR-Reagenziencharge spezifischen Ergebnisse der Positive Control und Negative Control werden in der Datenbank („Controls“) gespeichert. Sie können von Mitarbeitern mit der Qualifikation „Administrator“ oder „Analyst“ unter Befolgung der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche angezeigt und genehmigt werden.

Die Positive Control- und Negative Control-Ergebnisse laufen **nach 15 Tagen** ab.

Die Ergebnisse der Amplifikation der Positive Control und Negative Control werden von der **ELITE InGenius-Software** verwendet, um die Regelkarten („Control Charts“) zur Überwachung der Leistung der Amplifikationsstufen einzurichten. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

**HINWEIS!**

Erfüllt das Ergebnis der Positive Control bzw. Negative Control nicht die Annahmekriterien, wird die Meldung „Failed“ (nicht bestanden) auf dem Bildschirm „Controls“ (Kontrollen) angezeigt. In diesem Fall können die Ergebnisse nicht genehmigt werden und die Positive Control- bzw. Negative Control-Läufe müssen wiederholt werden.

**HINWEIS!**

Ist das Ergebnis der Positive Control bzw. Negative Control ungültig und wurden die Proben in denselben Lauf einbezogen, können die Proben genehmigt werden; ihre Ergebnisse werden jedoch nicht validiert. In diesem Fall müssen alle fehlgeschlagenen Kontrollen und Proben wiederholt werden.

## Validierung der Probenergebnisse

Die **ELITE InGenius Software** interpretiert die PCR-Ergebnisse für die Zielsequenz (Kanäle **Toxin A** und **Toxin B**) und die Internal Control (Kanal **IC**) mit den Assay-Protokoll-Parametern **Cdiff ELITE\_ST\_200\_100**.

Die Ergebnisse werden auf dem Bildschirm „Results Display“ (Ergebnisanzeige) angezeigt.

Der Probenlauf kann genehmigt werden, wenn die zwei in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Bedingungen erfüllt sind.

**Tabelle 8**

| 1) Positivkontrolle           | Status               |
|-------------------------------|----------------------|
| C. difficile Positive Control | APPROVED (Genehmigt) |
| 2) Negativkontrolle           | Status               |
| C. difficile Negative Control | APPROVED (Genehmigt) |

Die Probenergebnisse werden von der **ELITE InGenius-Software** anhand der Assay-Protocol-Parameter automatisch interpretiert.

Die möglichen Ergebnismeldungen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Für jede Probe meldet das System eine Kombination aus den folgenden Meldungen, die angeben, ob die Pathogen-DNA nachgewiesen wurden oder nicht.

**Tabelle 9**

| Ergebnis der Probe                                                                                                                               | Interpretation                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Toxin A: DNA Detected C.difficile (Toxin A: DNA erkannt C.difficile)                                                                             | <b>DNA des Toxin-A-Gens von C. difficile wurde in der Probe nachgewiesen.</b><br>Die Probe ist C. difficile-positiv.                                                                                                                                                                    |
| Toxin B: DNA Detected C.difficile (Toxin B: DNA erkannt C.difficile)                                                                             | <b>DNA des Toxin-B-Gens von C. difficile wurde in der Probe nachgewiesen.</b><br>Die Probe ist C. difficile-positiv.                                                                                                                                                                    |
| Toxin B: DNA Detected C.difficile possible 027 (Toxin B: DNA erkannt C.difficile möglich 027)                                                    | <b>DNA des Toxin-B-Gens von C. difficile wurde in der Probe nachgewiesen</b> und ist möglicherweise ein hypervirulenter Stamm mit Ribotyp 027.<br>Die Probe ist C. difficile-positiv.                                                                                                   |
| Toxin B: DNA Detected Species not determined (Toxin B: DNA nachgewiesen Spezies nicht bestimmt)                                                  | <b>Vorhandensein von Toxin-B-Gen in der Probe nachgewiesen, obwohl die Spezies nicht bestimmt werden kann.</b> Mögliches Vorhandensein der DNA anderer Clostridioides-verwandter Spezies. Das Vorhandensein von C. difficile in geringen Kopienzahlen kann nicht ausgeschlossen werden. |
| Toxin B: DNA Detected C.difficile DNA Detected C.difficile possible 027 (Toxin B: DNA erkannt C.difficile DNA erkannt C.difficile möglich 027)   | <b>DNA des Toxin-B-Gens von C. difficile wurde in der Probe nachgewiesen.</b><br>Auch das Vorhandensein von Toxin-B-DNA vom hypervirulenten C.-difficile-Stamm mit Ribotyp 027 wurde nachgewiesen.<br>Die Probe ist C. difficile-positiv.                                               |
| Toxin B: DNA Detected Species not determined DNA Detected C.difficile (Toxin B: DNA nachgewiesen Spezies nicht bestimmt DNA erkannt C.difficile) | <b>DNA des Toxin-B-Gens von C. difficile wurde in der Probe nachgewiesen.</b> Auch das mögliche Vorhandensein von Toxin-B-DNA anderer Clostridioides-verwandter Spezies wurde nachgewiesen.<br>Die Probe ist C. difficile-positiv.                                                      |

**Tabelle 9 (continued)**

|                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Toxin B: DNA Detected Species not determined DNA Detected C.difficile possible 027 (Toxin B: DNA nachgewiesen Spezies nicht bestimmt DNA erkannt C.difficile möglich 027)                                                  | DNA des Toxin-B-Gens von C. difficile wurde in der Probe <b>nachgewiesen</b> und ist möglicherweise ein hypervirulenter Stamm mit Ribotyp 027.<br>Auch das mögliche Vorhandensein von Toxin-B-DNA anderer Clostridioides-verwandter Spezies wurde nachgewiesen.<br>Die Probe ist C. difficile-positiv.                 |
| Toxin B: DNA Detected Species not determined DNA Detected C.difficile DNA Detected C.difficile possible 027 (Toxin B: DNA nachgewiesen Spezies nicht bestimmt DNA erkannt C.difficile DNA erkannt C.difficile möglich 027) | <b>DNA des Toxin-B-Gens von C. difficile wurde</b> in der Probe <b>nachgewiesen</b> .<br>Auch das mögliche Vorhandensein von Toxin-B-DNA des hypervirulenten C.-difficile-Stamms mit Ribotyp 027 und Toxin-B-DNA anderer Clostridioides-verwandter Spezies wurden nachgewiesen.<br>Die Probe ist C. difficile-positiv. |
| Toxin A:DNA Not detected or below the LoD (Toxin A:DNA nicht erkannt oder unter Nachweisgrenze)                                                                                                                            | <b>Es wurde keine DNA des Toxin-A-Gens von C. difficile</b> in der Probe <b>nachgewiesen</b> oder ihre Konzentration liegt unter der Nachweisgrenze des Assays.                                                                                                                                                        |
| Toxin B:DNA Not detected or below the LoD (Toxin B:DNA nicht erkannt oder unter Nachweisgrenze)                                                                                                                            | <b>Es wurde keine DNA des Toxin-b-Gens von C. difficile</b> in der Probe <b>nachgewiesen</b> oder ihre Konzentration liegt unter der Nachweisgrenze des Assays.                                                                                                                                                        |
| Invalid-Retest Sample (Ungültig - Probe erneut testen)                                                                                                                                                                     | <b>Ungültiges Testergebnis</b> aufgrund von fehlerhafter interner Kontrolle (falsche Extraktion oder Verschleppung des Inhibitors).<br>Der Test sollte wiederholt werden.                                                                                                                                              |

Von der **ELITE InGenius Software** als „Invalid-Retest Sample“ (Ungültig - Probe erneut testen) ausgegebene Proben sind nicht für die Ergebnisinterpretation geeignet. In diesem Fall wurde die Internal Control DNA aufgrund von Problemen beim Amplifikations- oder Extraktionsschritt nicht effizient erkannt (Abbau von DNA, Verlust von DNA während der Extraktion oder Verschleppung des Inhibitors im Eluat), was zu falschen Ergebnissen führen kann.

Wenn das Eluatvolumen ausreicht, kann die extrahierte Probe mithilfe eines Amplifikationslaufs im Modus „PCR Only“ (nur PCR) erneut getestet werden. Ist auch das zweite Ergebnis ungültig, muss die Probe beginnend mit der Extraktion eines neuen Aliquots im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) erneut getestet werden. (siehe [18 FEHLERBEHEBUNG page 53](#)).

Als „Not Detected or below the LoD“ (nicht erkannt oder unter Nachweisgrenze) ausgegebene Proben sind für die Analyse geeignet, es war jedoch nicht möglich, C. difficile-DNA für das Toxin-A- und das Toxin-B-Gen nachzuweisen. In diesem Fall kann nicht ausgeschlossen werden, dass die C. difficile-DNA für das Toxin-A- und das Toxin-B-Gen bei einer Konzentration unter der Nachweisgrenze des Assays vorhanden ist (siehe „[12 LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITE InGenius und ELITE BeGenius page 20](#)“). Alternativ könnte ein nicht toxikogenes C. difficile in der Probe vorhanden sein.

Als „DNA Detected Species not determined“ (DNA nachgewiesen Spezies nicht bestimmt) ausgegebene Proben sind für die Analyse geeignet, es war jedoch nicht möglich, C. difficile-DNA für das Toxin-A- und das Toxin-B-Gen nachzuweisen. In diesem Fall kann nicht ausgeschlossen werden, dass die C.-difficile-DNA für das Toxin-A- und das Toxin-B-Gen bei einer Konzentration unter der Nachweisgrenze des Assays vorhanden ist (siehe „[12 LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITE InGenius und ELITE BeGenius page 20](#)“). Alternativ könnte ein nicht toxikogenes C. difficile in der Probe vorhanden sein.

### HINWEIS!

Bei der Interpretation der mit dem Assay erhaltenen Ergebnisse müssen alle relevanten klinischen Beobachtungen und Laborbefunde herangezogen werden.

Die Probenergebnisse werden in der Datenbank gespeichert und können, falls gültig, vom „Administrator“ oder „Analyst“ unter Befolgung der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche unter „Results Display“ (Ergebnisanzeige) genehmigt werden. Über das Fenster „Results Display“ können die Ergebnisse des Probenlaufs als „Sample Report“ (Probenbericht) und „Track Report“ (Spurbericht) ausgedruckt und gespeichert werden.

## Ausgabe des Probenergebnisberichts

Die Probenergebnisse werden in der Datenbank gespeichert, und Berichte können als „Sample Report“ (Probenbericht) und „Track Report“ (Spurbericht) exportiert werden.

Der „Sample Report“ zeigt die Ergebnisdetails sortiert nach ausgewählter Probe (SID, „Sample ID“) an.

Der „Track Report“ zeigt die Ergebnisdetails nach ausgewählter Spur an.

Der „Sample Report“ und der „Track Report“ können ausgedruckt und von autorisiertem Personal unterschrieben werden.

## 11 VERFAHREN BEI ELITE BeGenius

Das beim Gebrauch des **C. difficile ELITE MGB Kit** mit dem **ELITE BeGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

**Tabelle 10**

|                  |                                            |                                                                            |
|------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>SCHRITT 1</b> | Prüfung der Systembereitschaft             |                                                                            |
| <b>SCHRITT 2</b> | Einrichtung des Laufs                      | A) Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR])                           |
|                  |                                            | B) Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR])                           |
|                  |                                            | C) Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR]) |
| <b>SCHRITT 3</b> | Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse | 1) Validierung der Ergebnisse der Positive Control und Negative Control    |
|                  |                                            | 2) Validierung der Probenergebnisse                                        |
|                  |                                            | 3) Ausgabe des Probenergebnisberichts                                      |

### SCHRITT 1 - Prüfung der Systembereitschaft

Vor Beginn des Laufs:

- **ELITE BeGenius** einschalten und den Modus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen,
- - auf der Startseite im Menü „Controls“ (Kontrollen) bestätigen, dass die PCR-Kontrollen (**Positive Control**, **Negative Control**) für die zu verwendende Charge des **PCR Mix** genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen PCR-Kontrollen für die Charge **PCR Mix** verfügbar sind, die PCR-Kontrollen wie in den folgenden Abschnitten beschrieben durchführen,
- den Typ des Laufs auswählen, dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche zur Einrichtung des Laufs befolgen und die von EG SpA bereitgestellten Assay-Protokolle verwenden (siehe „Proben und Kontrollen“).

Falls das betreffende Assay Protokoll nicht im System geladen ist, wenden Sie sich an Ihren ELITEchGroup Kundendienstvertreter vor Ort.

### SCHRITT 2 - Einrichtung des Laufs

Das **C. difficile ELITE MGB Kit** kann auf **ELITE BeGenius** für die folgenden Läufe verwendet werden:

- Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR]),
- Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR]),
- Positive Control und Negative Control-Lauf (PCR Only [nur PCR])

Alle benötigten Parameter sind in den auf dem Gerät verfügbaren Assay-Protokollen enthalten und werden bei Auswahl des Assay-Protokolls automatisch geladen.

**HINWEIS!**

**ELITe BeGenius** kann mit dem „Laboratory Information System“ (Laborinformationssystem – LIS) verbunden werden, worüber die Laufinformationen heruntergeladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

Vor dem Einrichten eines Laufs:

Die benötigten PCR Mix-Röhrchen 30 Minuten auf Raumtemperatur auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für **24 Tests** unter optimalen Bedingungen (mindestens 5 Tests pro Lauf). Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.

**HINWEIS!**

Den **PCR Mix** lichtgeschützt auftauen lassen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

Zum Einrichten eines der drei Lauftypen die folgenden Schritte unter Beachtung der grafischen Benutzeroberfläche ausführen:

**Tabelle 11**

|          | <b>A. Probenlauf (Extract + PCR<br/>[Extraktion + PCR])</b>                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>B. Lauf mit eluierter Probe (PCR<br/>Only [nur PCR])</b>                                                                                                                                                                                               | <b>C. Lauf für Positive und Negative<br/>Control (PCR Only [nur PCR])</b>                                                                                                                                                                               |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1</b> | <b>Proben identifizieren</b> und, falls erforderlich, auf Raumtemperatur auftauen.<br>Die Proben gemäß dem im Abschnitt „Proben und Kontrollen“ beschriebenen Verfahren vorbehandeln.<br>Für diesen Assay müssen <b>200 µl vorbehandelte Probe</b> in ein zuvor etikettiertes 2-ml-Sarstedt-Röhrchen überführt werden. | Falls erforderlich, die <b>Elutionsröhrchen</b> mit den extrahierten Nukleinsäuren auf Raumtemperatur <b>auftauen</b> . Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern. | Positive Control-Röhrchen 30 Minuten auf Raumtemperatur <b>auftauen</b> . Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Reaktionen. Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern. |
| <b>2</b> | Die benötigten <b>CPE-Röhrchen</b> 30 Minuten auf Raumtemperatur <b>auftauen</b> . Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern. Jedes Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen.                                                           | Nicht anwendbar                                                                                                                                                                                                                                           | Die <b>Negative Control</b> vorbereiten: dazu mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie in ein „Elution Tube“ (Elutionsröhr.) überführen, das im Lieferumfang des ELITe InGenius SP 200 Consumable Set enthalten ist.                |
| <b>3</b> | Auf der Startseite „ <b>Perform Run</b> “ (Lauf durchführen) auswählen.                                                                                                                                                                                                                                                | Auf der Startseite „ <b>Perform Run</b> “ (Lauf durchführen) auswählen.                                                                                                                                                                                   | Auf der Startseite „ <b>Perform Run</b> “ (Lauf durchführen) auswählen.                                                                                                                                                                                 |
| <b>4</b> | Alle Racks aus der „Cooler Unit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.                                                                                                                                                                                                                                      | Die „Racks“ aus „Lane 1, 2 und 3 (L1, L2 und L3) der „Cooler Unit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.                                                                                                                                       | Die „Racks“ aus „Lane 1, 2 und 3 (L1, L2 und L3) der „Cooler Unit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.                                                                                                                                     |
| <b>5</b> | Den Laufmodus („Run mode“) wählen: <b>„Extract + PCR“</b> (Extraktion + PCR).                                                                                                                                                                                                                                          | Den Laufmodus („Run mode“) wählen: <b>„PCR Only“</b> (Nur PCR).                                                                                                                                                                                           | Den Laufmodus („Run mode“) wählen: <b>„PCR Only“</b> (Nur PCR).                                                                                                                                                                                         |
| <b>6</b> | <b>Die Proben</b> in das Probenrack („Sample Rack“) <b>laden</b> . Wenn als Sekundärröhrchen „2 mL Tubes“ (2-ml-Röhrchen) geladen werden, verwenden Sie die blauen Adapter für das „Sample Rack“.                                                                                                                      | <b>Die Proben</b> in das „Elution Rack“ (Elutionsablage) <b>laden</b> .                                                                                                                                                                                   | Die Positive Control- und Negative Control-Röhrchen in das „Elution Rack“ (Elutionsablage) <b>laden</b> .                                                                                                                                               |

Tabelle 11 (continued)

|    | A. Probenlauf (Extract + PCR<br>[Extraktion + PCR])                                                                                                                                                                                                                                                                                           | B. Lauf mit eluierter Probe (PCR<br>Only [nur PCR])                                                                                                                                                                                                                                                                     | C. Lauf für Positive und Negative<br>Control (PCR Only [nur PCR])                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7  | Das „ <b>Sample Rack</b> “ in die „Cooler Unit“ <b>einsetzen</b> , beginnend mit „Lane 5“ (L5).<br>Falls erforderlich, unter „Sample ID“ (SID) die Proben-ID für jede verwendete „Position“ eingeben (Beim Laden von Sekundärröhrchen „2 mL Tube“ (2-mL-Röhrchen) angeben). Bei Sekundärröhrchen ohne Barcode die Proben-ID manuell eingeben. | Das „ <b>Elution Rack</b> “ in die „Cooler Unit“ <b>einsetzen</b> , beginnend mit „Lane 3“ (L3).<br>Falls erforderlich, für jede „Position“ die Proben-ID („Sample ID“), die Probenmatrix („Sample Matrix“), das Extraktionskit („Extraction Kit“) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted eluate vol.“) eingeben. | Das „ <b>Elution Rack</b> “ in die „Cooler Unit“ <b>einsetzen</b> , beginnend mit „Lane 3“ (L3).<br>Falls erforderlich, für jede „Position“ unter „Reagent name“ den Reagenznamen, unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben. |
| 8  | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                           | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 9  | Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktion Eingangsvolumen) 200 µl und das extrahierte „Extracted Elute Volume“ (Extrahiertes Eluatvolumen) 100 µl beträgt.                                                                                                                                                                | Nicht anwendbar                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Nicht anwendbar                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 10 | Das Assay Protocol (Assay-Protokoll) in der Spalte „Assay“ (Prüfung) auswählen (siehe „Proben und Kontrollen“).                                                                                                                                                                                                                               | Das Assay Protocol (Assay-Protokoll) in der Spalte „Assay“ (Prüfung) auswählen (siehe „Proben und Kontrollen“).                                                                                                                                                                                                         | Das Assay Protocol (Assay-Protokoll) in der Spalte „Assay“ (Prüfung) auswählen (siehe „Proben und Kontrollen“).                                                                                                                                                                                                                             |
| 11 | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                           | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|    | <div style="background-color: #0056b3; color: white; text-align: center; padding: 5px;"><b>HINWEIS!</b></div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Bei Verarbeitung von mehr als 12 Proben das Verfahren ab Punkt 6 wiederholen.</div>                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 12 | Die „Elution tubes“ (Elutionsröhr) in das „Elution Rack“ (Elutionsablage) laden (Elutionsröhrchen können zur Verbesserung der Rückverfolgbarkeit mit einem Barcode etikettiert werden).                                                                                                                                                       | Nicht anwendbar                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Nicht anwendbar                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 13 | Das „Elution Rack“ in die „Cooler Unit“ einsetzen, beginnend mit „Lane 3“ (L3).<br>Bei Verarbeitung von mehr als 12 Proben das Verfahren wiederholen und dabei „Lane 2“ (L2) verwenden.                                                                                                                                                       | Nicht anwendbar                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Nicht anwendbar                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 14 | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Nicht anwendbar                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Nicht anwendbar                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 15 | <b>CPE und PCR Mix</b> in das „Reagent/Elution Rack“ (Reagenz-/Elutionsrack) laden.                                                                                                                                                                                                                                                           | Den PCR Mix in das „Reagent/Elution Rack“ (Reagenz-/Elutionsrack) <b>laden</b> .                                                                                                                                                                                                                                        | Den PCR Mix in das „Reagent/Elution Rack“ (Reagenz-/Elutionsrack) <b>laden</b> .                                                                                                                                                                                                                                                            |

Tabelle 11 (continued)

|    | A. Probenlauf (Extract + PCR<br>[Extraktion + PCR])                                                                                                                                                                                                                                                                                        | B. Lauf mit eluierter Probe (PCR<br>Only [nur PCR])                                                                                                                                                                                                                                                                           | C. Lauf für Positive und Negative<br>Control (PCR Only [nur PCR])                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 16 | Das „Reagent/Elution Rack“ in die „Cooler Unit“ in „Lane 2“ (L2), falls verfügbar, oder in „Lane 1“ (L1) einsetzen.<br>Falls erforderlich, für jedes PCR Mix-Reagenz und/oder CPE unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben. | Das „Reagent/Elution Rack“ in die „Cooler Unit“ in „Lane 2“ (L2), falls verfügbar, oder in „Lane 1“ (L1) einsetzen.<br>Falls erforderlich, für jedes PCR Mix-Reagenz unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben. | Das „Reagent/Elution Rack“ in die „Cooler Unit“ in „Lane 2“ (L2), falls verfügbar, oder in „Lane 1“ (L1) einsetzen.<br>Falls erforderlich, für jedes PCR Mix-Reagenz unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben. |
| 17 | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 18 | Die Spitzen in den „Tip Racks“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Inventarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.                                                                                                                                                                                                             | Die Spitzen in den „Tip Racks“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Inventarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.                                                                                                                                                                                                | Die Spitzen in den „Tip Racks“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Inventarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.                                                                                                                                                                                                |
| 19 | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 20 | Das „ <b>PCR Rack</b> “ mit „PCR Cassette“ (PCR-Kassette) in den Inventory Area (Inventarbereich) laden.                                                                                                                                                                                                                                   | Das „ <b>PCR Rack</b> “ mit „PCR Cassette“ (PCR-Kassette) in den Inventory Area (Inventarbereich) laden.                                                                                                                                                                                                                      | Das „ <b>PCR Rack</b> “ mit „PCR Cassette“ (PCR-Kassette) in den Inventory Area (Inventarbereich) laden.                                                                                                                                                                                                                      |
| 21 | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 22 | Das „Extraction Rack“ (Extraktionsrack) mit den „ELITE InGenius SP 200“ Extraktionskartuschen und die für die Extraktion erforderlichen Verbrauchsmaterialien laden.                                                                                                                                                                       | Nicht anwendbar                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Nicht anwendbar                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 23 | Schließen Sie die Gerätetür.                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Schließen Sie die Gerätetür.                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Schließen Sie die Gerätetür.                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 24 | „Start“ (Starten) drücken.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | „Start“ (Starten) drücken.                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | „Start“ (Starten) drücken.                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

Nach Beendigung des Laufs ermöglicht **ELITE BeGenius** es dem Benutzer, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

### HINWEIS!

Am Ende des Laufs muss die übrige extrahierte Probe im **Elution Tube** (Elutionsröhr.) aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen, gekennzeichnet und maximal einen Monat bei  $-20 \pm 10$  °C aufbewahrt werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

### HINWEIS!

Am Ende des Laufs kann der **PCR Mix** aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei  $-20$  °C oder darunter aufbewahrt oder für bis zu 5 Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block aufbewahrt werden; vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

**HINWEIS!**

Am Ende des Laufs kann die übrige **Positive Control** aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C oder darunter aufbewahrt werden. Ein Verschütten der Positive Control vermeiden. Die übrige **Negative Control** muss entsorgt werden.

**HINWEIS!**

Die **Positive Control** kann für 4 separate Läufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden.

**HINWEIS!**

Am Ende des Laufs müssen die **PCR Cassette** und die anderen Verbrauchsmaterialien unter Berücksichtigung sämtlicher gesetzlicher und umweltrechtlicher Vorschriften entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

**SCHRITT 3 - Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse**

**ELITE BeGenius** überwacht die Fluoreszenzsignale der Zielsequenz und der Internal Control für jede Reaktion und wendet die Assay-Protokoll-Parameter automatisch an, um PCR-Kurven zu erstellen, anhand derer anschließend die Ergebnisse interpretiert werden.

Am Ende des Laufs wird der Bildschirm „Results Display“ (Ergebnisanzeige) automatisch angezeigt. Auf diesem Bildschirm werden die Ergebnisse und Laufdaten angezeigt. Über diesen Bildschirm können die Ergebnisse genehmigt und die Berichte („Sample Report“ (Probenbericht) oder „Track Report“ (Spurbericht)) ausgedruckt oder gespeichert werden. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

**HINWEIS!**

**ELITE BeGenius** kann mit dem „Laboratory Information System“ (Laborinformationssystem – LIS) verbunden werden, worüber die Laufinformationen heruntergeladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

**ELITE BeGenius** generiert die Ergebnisse mithilfe des **C. difficile ELITE MGB Kit** und geht dabei folgendermaßen vor:

1. Validierung der Positive Control- und Negative Control-Ergebnisse,
2. Validierung der Probenergebnisse,
3. Ausgabe des Probenergebnisberichts.

**HINWEIS!**

Einzelheiten sind dem entsprechenden Abschnitt unter „Verfahren bei **ELITE InGenius**“ zu entnehmen.

## 12 LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITE InGenius und ELITE BeGenius

### 12.1 Nachweisgrenze

Die analytische Sensitivität dieses Assays, ausgedrückt als Nachweisgrenze (LoD, Limit of Detection) der DNA-Amplifikation, ermöglicht den Nachweis von zirka 10 Kopien in 10 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde mithilfe von Plasmid-DNA getestet. Diese enthielt die Amplifikationsprodukte, deren Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Plasmid-DNA wurde auf einen Titer von zirka 10 Kopien/10 µl unter Vorhandensein von 20.000 Kopien von Internal Control (IC) / 10 µl verdünnt. Diese Probe wurde in 18 Wiederholungen getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit Produkten der ELITEchGroup S. p. A. in Kombination mit zwei verschiedenen **ELITE InGenius** Geräten durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 12**

| Proben                                   | Anzahl | positiv | negativ | Toxin A Mittlerer Ct-Wert | Toxin B Mittlerer Ct-Wert |
|------------------------------------------|--------|---------|---------|---------------------------|---------------------------|
| 10 Kopien Plasmid-DNA + 20.000 Kopien IC | 18     | 18      | 0       | 35,80                     | 36,62                     |

Zur Verifizierung der Nachweisgrenze (LoD) wurden auf ELITE InGenius negative klinische Stuhlproben, die mit Referenzmaterialien (ZeptoMetrix) in einer Konzentration von 500 KbE/ml dotiert waren, getestet. Der Test wurde unter Verwendung der beiden Vorbehandlungsverfahren **InhibitEX Buffer** (QIAGEN) und **S.T.A.R. buffer** (Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 13**

| Stuhlprobe                         | Titer (KbE/ml) | Anzahl | C. difficile |         | Prozentsatz positiver Ergebnisse |
|------------------------------------|----------------|--------|--------------|---------|----------------------------------|
|                                    |                |        | Positiv      | Negativ |                                  |
| Vorbehandlung mit S.T.A.R Buffer   | 500            | 30     | 30           | 0       | 100 %                            |
| Vorbehandlung mit Inhibitex Buffer | 500            | 30     | 30           | 0       | 100 %                            |

Zur Verifizierung des LoD-Werts von 500 KbE/ml wurden auf ELITE BeGenius native Stuhlproben, die mit Referenzmaterial dotiert waren, getestet. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten die behaupteten Konzentrationen.

## 12.2 Äquivalenz der Matrix-Vorbehandlungen

Die Äquivalenz der Matrix-Vorbehandlung mit **InhibitEX Buffer** (QIAGEN) und **S. T. A. R. buffer** (Roche Diagnostics GmbH) wurde anhand von vermutlich negativen nativen Stuhlproben der verschiedenen Probanden und denselben Proben, die mit Referenzmaterial (ZeptoMetrix) in einer Konzentration von 3 x LoD dotiert wurden, überprüft.

Die Ergebnisse der negativen prozentualen Übereinstimmung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 14**

| Negative Stuhlprobe                | Anzahl | C. difficile |         | Negative prozentuale Übereinstimmung |
|------------------------------------|--------|--------------|---------|--------------------------------------|
|                                    |        | Positiv      | Negativ |                                      |
| Vorbehandlung mit S.T.A.R Buffer   | 26     | 0            | 26      | 96,2 %                               |
| Vorbehandlung mit InhibitEx Buffer | 26     | 0            | 26      | 96,2 %                               |

Die Ergebnisse der positiven prozentualen Übereinstimmung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 15**

| Dotierte Stuhlprobe                | Anzahl | C. difficile |         | Positive Übereinstimmung in % |
|------------------------------------|--------|--------------|---------|-------------------------------|
|                                    |        | Positiv      | Negativ |                               |
| Vorbehandlung mit S.T.A.R Buffer   | 25     | 25           | 0       | 100 %                         |
| Vorbehandlung mit InhibitEx Buffer | 25     | 25           | 0       | 100 %                         |

### 12.3 Test mit zertifiziertem Referenzmaterial

Die Leistung des Produkts wurde anhand des kalibrierten Referenzmaterials „Clostridium difficile 017 Evaluation Panel“ (Qnostics, Ltd, Vereinigtes Königreich) bewertet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation mit Produkten der ELITechGroup S. p. A. zusammen mit dem Gerät **ELITe InGenius** durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 16 Tests mit „Clostridium difficile 017 Evaluation Panel“**

| Probe     | Probeninhalt             | Nenntiter (CFU/ml)  | Positiv / Replikate |
|-----------|--------------------------|---------------------|---------------------|
| CD1421749 | <i>C. difficile</i> A-B+ | 8,0x10 <sup>4</sup> | 2/2                 |
| CD1421759 | <i>C. difficile</i> A-B+ | 8,0x10 <sup>5</sup> | 2/2                 |
| CD1421769 | <i>C. difficile</i> A-B+ | 8,0x10 <sup>6</sup> | 2/2                 |
| CD142CS53 | <i>C. sordellii</i> A-B- | 2,1x10 <sup>5</sup> | 0/2                 |

Alle Proben wurden richtig erkannt.

Ein weiterer Test wurde anhand des kalibrierten Referenzmaterials „Clostridium difficile 027 Evaluation Panel“ (Qnostics, Ltd, Vereinigtes Königreich) durchgeführt. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation mit Produkten der ELITechGroup S. p. A. zusammen mit dem Gerät **ELITe InGenius** durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 17 Tests mit „Clostridium difficile 027 Evaluation Panel“**

| Probe     | Probeninhalt             | Nenntiter (CFU/ml)  | Positiv / Replikate |
|-----------|--------------------------|---------------------|---------------------|
| CD1422737 | <i>C. difficile</i> A+B+ | 3,0x10 <sup>5</sup> | 2/2                 |
| CD1422747 | <i>C. difficile</i> A+B+ | 4,0x10 <sup>5</sup> | 2/2                 |
| CD1422757 | <i>C. difficile</i> A+B+ | 5,0x10 <sup>5</sup> | 2/2                 |
| CD1422767 | <i>C. difficile</i> A+B+ | 5,0x10 <sup>6</sup> | 2/2                 |

Alle Proben wurden richtig erkannt.

Die Leistung des Produkts wurde auch anhand des Referenzmaterials „QCMD 2013 Clostridium difficile EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich), einer Reihe von *C. difficile*-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration, bewertet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. zusammen mit dem Gerät **ELITe InGenius** durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 18 Tests mit „QCMD 2013 Clostridium difficile EQA Panel“**

| Probe   | Probeninhalt            | Nenntiter (CFU/ml)  | Probenstatus   | Pos. / Wiederh. |
|---------|-------------------------|---------------------|----------------|-----------------|
| CD13-01 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6x10 <sup>5</sup> | Häufig erkannt | 2/2             |
| CD13-02 | <i>C. difficile</i> 017 | 8,0x10 <sup>6</sup> | Häufig erkannt | 2/2             |
| CD13-03 | Cd Negativ              | -                   | Negativ        | 0/2             |
| CD13-04 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6x10 <sup>6</sup> | Erkannt        | 2/2             |

**Tabelle 18 Tests mit „QCMD 2013 Clostridium difficile EQA Panel“ (continued)**

| Probe   | Probeninhalt            | Nenntiter (CFU/ml)  | Probenstatus   | Pos. / Wiederh. |
|---------|-------------------------|---------------------|----------------|-----------------|
| CD13-05 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6x10 <sup>6</sup> | Häufig erkannt | 2/2             |
| CD13-06 | <i>C. difficile</i> 017 | 8,0x10 <sup>5</sup> | Häufig erkannt | 2/2             |
| CD13-07 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6x10 <sup>3</sup> | Erkannt        | 2/2             |
| CD13-08 | <i>C. sordellii</i>     | 2,1x10 <sup>5</sup> | Negativ        | 0/2             |
| CD13-09 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6x10 <sup>5</sup> | Häufig erkannt | 2/2             |
| CD13-10 | <i>C. difficile</i> 017 | 8,0x10 <sup>4</sup> | Erkannt        | 2/2             |

Alle Proben wurden richtig erkannt.

## 12.4 Vergleichspräzision mit Referenzmaterial

Die Vergleichspräzision der Ct-Werte, die mit dem C. difficile ELITE MGB Kit in Verbindung mit dem ELITE InGenius ermittelt wurden, wurde durch Analyse des Referenzmaterials „NATtrol™ C. difficile Verification Panel“ (ZeptoMetrix, USA) das die Ribotypen 002, 017, 078 und 027 enthielt, geprüft.

Die Vergleichspräzision wurde mittels Analyse von Panel-Proben in Doppelbestimmungen, in zwei Läufen pro Tag bestimmt. Drei verschiedene Produktchargen wurden an drei verschiedenen Tagen auf drei verschiedenen Geräten durch drei verschiedene Bediener getestet.

Die Ct-Werte des des Toxin-A- und des Toxin B-Gens wurden zur Berechnung des prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) herangezogen, um die Vergleichspräzision als Ungenauigkeit zu bewerten.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 19**

| Probe                     | Toxin-A-Gen     |                   |      |      | Toxin-B-Gen     |                   |      |      |
|---------------------------|-----------------|-------------------|------|------|-----------------|-------------------|------|------|
|                           | Pos. / Wiederh. | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Pos. / Wiederh. | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |
| <i>C. difficile</i> 002   | 12/12           | 20,70             | 0,31 | 1,50 | 12/12           | 21,78             | 0,23 | 1,05 |
| <i>C. difficile</i> 017   | 12/12           | 24,39             | 0,20 | 0,84 | 12/12           | 25,48             | 0,11 | 0,43 |
| <i>C. difficile</i> 078   | 12/12           | 24,32             | 0,24 | 0,98 | 12/12           | 25,30             | 0,09 | 0,34 |
| <i>C. difficile</i> 027-1 | 12/12           | 22,42             | 0,25 | 1,12 | 12/12           | 23,13             | 0,16 | 0,71 |
| <i>C. difficile</i> 027-2 | 12/12           | 24,10             | 0,32 | 1,32 | 12/12           | 24,82             | 0,25 | 1,01 |
| <i>C. sordelli</i>        | 0/12            | -                 | -    | -    | 0/12            | -                 | -    | -    |

Die Vergleichspräzision der Ct-Werte für die beiden Zielsequenzen zeigte einen niedrigen VK %, der 2 % nicht überstieg.

Die Vergleichspräzision wurde mittels Analyse von Panel-Proben in Doppelbestimmungen, in zwei Läufen pro Tag bestimmt. Drei verschiedene Produktchargen wurden an drei verschiedenen Tagen auf drei verschiedenen Geräten durch drei verschiedene Bediener getestet.

## 12.5 Potenziell interferierende Marker: Interferenz

Die Hemmung durch potenziell interferierende Marker wurde durch die Analyse eines Panels aufgereinigter Nukleinsäuren in hoher Konzentration (mindestens  $10^5$  Kopien/Reaktion) bewertet, das die folgenden Organismen umfasst: *Aeromonas hydrophilia* (AH), *Bacteroides fragilis* (BF), *Vibrio cholera* (VC), *Helicobacter pylori* (HP), *Saccharomyces cerevisiae* (SC), *Plesiomonas shigelloides* (PS), *Klebsiella pneumoniae* (KC), *Escherichia coli* (Ecoli), *Serratia marcescens* (SM), *Acinetobacter baumannii* (AB), *Bifidobacterium spp* (Bifido), *Candida albicans* (CA), *Citrobacter freundii* (CF), *Clostridium nexile* (Cnex), *Proteus mirabilis* (PM), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Enterobacter cloacae* (EC), *Giardia lamblia* (GL), *Cryptosporidium spp* (CP), *Entamoeba histolytica* (EH), *Enterovirus*, *Adenovirus*, *Astrovirus*, *Norovirus*, *Rotavirus*, *Sapovirus*.

Die genomische DNA jedes Organismus wurde in hoher Konzentration (mindestens  $10^5$  Kopien/Reaktion) mit genomischer DNA von *Clostridioides difficile* (Vircell Microbiologists, Spanien, Bestell-Nr. MBC043) als Referenzmaterial in einer Konzentration von etwa 3 x LoD (1500 KbE/ml) dotiert und mit 20.000 Kopien/Reaktion der Vorlage für die Internal Control (CPE – Internal Control) dotiert, um die extrahierten klinischen Proben nachzuahmen.

Außerdem wurden Referenzproben mit den Zielsequenzen, aber ohne die potenziell interferierenden Organismen, analysiert.

Jeder Organismus wurde in 6 Wiederholungen in randomisierten Positionen auf dem ELITE InGenius im Modus „PCR Only“ (Nur PCR) getestet.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

**Tabelle 20**

| Probe                     | Anzahl  |         | Mittlerer Ct-Wert |         |       | % Pos. Übereinstimmung | Ergebnis         |
|---------------------------|---------|---------|-------------------|---------|-------|------------------------|------------------|
|                           | Toxin B | Toxin A | Toxin B           | Toxin A | IC    |                        |                  |
| Referenz (Cdif)           | 6/6     | 6/6     | 37,29             | 37,08   | 24,41 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdif + AH-BF-VC           | 6/6     | 6/6     | 36,97             | 36,57   | 24,27 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdif + HP-SC-PS           | 6/6     | 6/6     | 37,33             | 37,42   | 23,92 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdif + KP-Ecoli-SM        | 6/6     | 6/6     | 37,56             | 37,64   | 23,67 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdif + AB-Bifido-CA       | 6/6     | 6/6     | 37,93             | 38,37   | 24,26 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdif + CF-Cnex-PM         | 6/6     | 6/6     | 38,55             | 38,00   | 24,26 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdif + PA-EC-GL           | 6/6     | 6/6     | 38,66             | 38,11   | 24,16 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdiff+ EH                 | 6/6     | 6/6     | 38,26             | 37,90   | 23,94 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdiff+ CP                 | 6/6     | 6/6     | 38,03             | 38,29   | 23,97 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdiff-Adeno               | 6/6     | 6/6     | 37,81             | 37,49   | 23,64 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdiff-Entero              | 6/6     | 6/6     | 37,62             | 37,86   | 23,03 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdiff-Astro               | 6/6     | 6/6     | 37,58             | 37,34   | 24,11 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdiff-Noro                | 6/6     | 6/6     | 37,75             | 37,90   | 24,22 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdiff-Sapo                | 6/6     | 6/6     | 37,21             | 36,92   | 23,92 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdiff-Rota                | 6–6     | 6–6     | 37,74             | 37,45   | 22,90 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdiff Virulent-Cnex*      | 6–6     | 6–6     | 37,38             | 38,10   | 24,36 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdiff Hypervirulent-Cnex* | 6–6     | 6–6     | 37,58             | 39,21   | 24,90 | 100 %                  | Keine Inhibition |
| Cdiff Hypervirulent-Cnex* | 6–6     | 6–6     | 37,58             | 39,21   | 24,90 | 100 %                  | Keine Inhibition |

Bei allen getesteten potenziell interferierenden Organismen wurde im Test mit dem C. difficile ELITE MGB Kit keine Inhibition der C. difficile-Zielamplifikation nachgewiesen.

\* Gemäß Sequenzanalyse wurde *Clostridium Nexile*, Stamm VPI C48-37 mit Primern der Sonde für das Toxin-B-Ziel amplifiziert. *C. nexile* exprimiert kein Toxin B, es besteht jedoch eine ausreichende Sequenzhomologie, um ein Signal im Assay zu erzeugen. Aufgrund der unterschiedlichen Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) zwischen *C. difficile* Virulent (kein Ribotyp 027), *C. difficile* Hypervirulent (Ribotyp 027) und *C. nexile* ermöglicht der Assay jedoch die Unterscheidung einer möglichen Koinfektion.

## 12.6 Potenziell interferierende Marker: Kreuzreaktivität

Das Fehlen einer Kreuzreaktivität mit potenziell interferierenden Organismen wurde auch durch die Analyse eines Panels aufgereinigter Nukleinsäuren aus verschiedenen Organismen überprüft, wie oben unter „Potenziell interferierende Marker: Interferenz“ beschrieben.

Die genomische DNA jedes Organismus in hoher Konzentration (mindestens  $10^5$  Kopien/Reaktion) wurde mit 20.000 Kopien/Reaktion der Vorlage für die Internal Control (CPE – Internal Control) dotiert, um die extrahierten klinischen Proben nachzuahmen.

Außerdem wurden Referenzproben mit den Zielsequenzen, aber ohne die potenziell interferierenden Organismen, analysiert.

Jeder Organismus wurde in 6 Wiederholungen in randomisierten Positionen auf dem ELITE InGenius im Modus „PCR Only“ (Nur PCR) getestet.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

**Tabelle 21**

| Probe            | Positiv / Replikate |         | IC Mittlerer Ct-Wert | Negative prozentuale Übereinstimmung | Ergebnis               |
|------------------|---------------------|---------|----------------------|--------------------------------------|------------------------|
|                  | Toxin A             | Toxin B |                      |                                      |                        |
| Referenz         | 0/6                 | 0/6     | 24,55                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| AH-BF-VC         | 0/6                 | 0/6     | 23,77                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| HP-SC-PS         | 0/6                 | 0/6     | 23,72                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| KP-Ecoli-SM      | 0/6                 | 0/6     | 23,85                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| AB-Bifido-CA     | 0/6                 | 0/6     | 25,58                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| CF-Cnex-PM       | 0/6                 | 0/6     | 25,50                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| PA-EC-GL         | 0/6                 | 0/6     | 23,90                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| CP-EH-Enter      | 0/6                 | 0/6     | 23,77                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| Adeno-Astro-Noro | 0/6                 | 0/6     | 23,87                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| Rota-Sapo        | 0/6                 | 0/6     | 23,84                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| C. nexile*       | 0/6                 | 0/6     | 23,74                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |

Die getesteten potenziell interferierenden Organismen wiesen für die Zielsequenzen beim Test mit dem C. difficile ELITE MGB Kit keine Kreuzreaktivität auf.

Gemäß Sequenzanalyse wurde *Clostridium Nexile*, Stamm VPI C48-37 mit Primern der Sonde für das Toxin-B-Ziel amplifiziert. *C. nexile* exprimiert kein Toxin B, es besteht jedoch eine ausreichende Sequenzhomologie, um ein Signal im Assay zu erzeugen. Aufgrund der unterschiedlichen Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) zwischen *C. difficile* und *C. Nexile* gibt der Assay das korrekte Ergebnis „DNA Detected Species not determined“ (DNA erkannt, Spezies nicht bestimmt) aus.

## 12.7 Potenziell interferierende Substanzen

Die Wirkung potenziell interferierender Substanzen wurde durch die Analyse endogener oder exogener Substanzen, die in nativen Stuhlproben (schwierigste Matrix) vorkommen können, innerhalb klinisch relevanter Grenzwerte bewertet. Insbesondere wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten exogenen und endogenen Substanzen gemäß CLSI EP37 Ed1E getestet:

**Tabelle 22**

| Störende Substanz        | Wirkprinzip/Produkt                            | ID   | Konzentration |
|--------------------------|------------------------------------------------|------|---------------|
| Einläufe                 | Vaseline-Öl                                    | VAS  | 20 mg/ml      |
| Spermizide Gleitmittel   | Nonoxynol-9                                    | NON  | 1,2 Vol.-%    |
| Antidurchfallmedikamente | Bismutsubsalicylat                             | BISM | 0,87 mg/ml    |
|                          | Loperamidhydrochlorid                          | LOP  | 0,005 mg/ml   |
| Laxanzien                | Bisacodyl                                      | BISA | 0,25 mg/ml    |
| Antibiotika              | Azithromycin                                   | AZI  | 10 µg/ml      |
|                          | Vancomycin                                     | VAN  | 0,12 mg/ml    |
|                          | Metronidazol                                   | MET  | 0,12 mg/ml    |
|                          | Ampicillin                                     | AMP  | 0,08 mg/ml    |
|                          | Cefpodoxim                                     | CEF  | 4,5 µg/ml     |
|                          | Ciprofloxacin                                  | CIP  | 5 µg/ml       |
| Entzündungshemmer        | Hydrocortison                                  | HYD  | 3 mg/ml       |
| Antiazida                | Calciumcarbonat                                | CAL  | 0,5 mg/ml     |
|                          | Alginsäure                                     | ALG  | 0,01 mg/ml    |
|                          | Aluminiumhydroxid                              | ALU  | 0,03 mg/ml    |
|                          | Magnesiumtrisilicat                            | MAG  | 0,01 mg/ml    |
| Vollblut                 | Hämoglobin, Immunglobuline, Nukleinsäuren usw. | VB   | 5 Vol.-%      |
| Stuhlbestandteile        | Mucin                                          | MUC  | 3 mg/ml       |
|                          | Palmitinsäure                                  | PAL  | 0,85 mg/ml    |
|                          | Stearinsäure                                   | STE  | 0,85 mg/ml    |

Die potenziell interferierenden Substanzen wurden in nativen Stuhlproben, in 6 Gruppen zu je 3 Substanzen unterteilt, getestet. Mucin, Cefpodoxim, Ciprofloxacin, Hydrocortison und Vollblut wurden allein getestet. Referenzmaterial von *Clostridioides difficile* NAP1 (ZeptoMetrix) wurde in den Stuhlproben in einer Konzentration von etwa 3 x LoD dotiert.

Zu jeder Probe wurden 20.000 Kopien/Reaktion der Vorlage für die Internal Control (CPE – Internal Control) hinzugefügt.

Außerdem wurde die Referenzprobe mit Zielsequenzen, aber ohne die potenziell interferierenden Substanzen, analysiert.

Jede Substanz wurde in 6 Wiederholungen in randomisierten Positionen auf dem ELITe InGenius im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) getestet.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 23**

| Probe              | Positiv / Replikate |         | Mittlerer Ct-Wert |         |       | Positive Übereinstimmung in % |         | Ergebnis         |
|--------------------|---------------------|---------|-------------------|---------|-------|-------------------------------|---------|------------------|
|                    | Toxin B             | Toxin A | Toxin B           | Toxin A | IC    | Toxin B                       | Toxin A |                  |
| Referenz (Cdiff)   | 6/6                 | 6/6     | 34,68             | 34,53   | 25,35 | 100 %                         | 100 %   | Keine Inhibition |
| Cdiff+ VAN+MET+AMP | 6/6                 | 6/6     | 36,43             | 36,53   | 25,54 | 100 %                         | 100 %   | Keine Inhibition |
| Cdiff+LOP+BISA+AZI | 6/6                 | 6/6     | 36,31             | 36,27   | 25,46 | 100 %                         | 100 %   | Keine Inhibition |
| Cdiff+ ALG+ALU+MAG | 6/6                 | 6/6     | 36,41             | 36,48   | 25,72 | 100 %                         | 100 %   | Keine Inhibition |
| Cdiff+ WB          | 6/6                 | 6/6     | 35,64             | 35,41   | 25,72 | 100 %                         | 100 %   | Keine Inhibition |
| Cdiff+VAS+NON+BISM | 6/6                 | 6/6     | 34,75             | 34,31   | 25,36 | 100 %                         | 100 %   | Keine Inhibition |
| C.dif+CAL+PAL+STE  | 6/6                 | 6/6     | 35,95             | 36,20   | 25,70 | 100 %                         | 100 %   | Keine Inhibition |
| C.dif+MUC          | 6/6                 | 6/6     | 36,96             | 37,24   | 25,70 | 100 %                         | 100 %   | Keine Inhibition |
| Cdiff+ CEF         | 6/6                 | 6/6     | 35,14             | 34,93   | 25,69 | 100 %                         | 100 %   | Keine Inhibition |
| Cdiff+ CIP         | 6–6                 | 6–6     | 34,96             | 34,54   | 25,79 | 100 %                         | 100 %   | Keine Inhibition |
| Cdiff+ HYD         | 6–6                 | 6–6     | 34,85             | 34,26   | 25,86 | 100 %                         | 100 %   | Keine Inhibition |

Bei allen getesteten potenziell interferierenden Substanzen wurde im Test mit dem *C. difficile* ELITE MGB Kit keine Inhibition der *C. difficile*-Zielamplifikation nachgewiesen.

## 12.8 Potenziell interferierende Substanzen: Kreuzreaktivität

Das Fehlen einer Kreuzreaktivität mit potenziell interferierenden Substanzen wurde auch durch die Analyse endogener oder exogener Substanzen überprüft, die in nativen Stuhlproben (schwierigste Matrix) innerhalb klinisch relevanter Grenzwerte vorkommen können, wie im obigen Test auf potenziell interferierende Substanzen angegeben.

Die potenziell interferierenden Substanzen wurden in nativen Stuhlproben, in 6 Gruppen zu je 3 Substanzen unterteilt, getestet. Mucin und Vollblut wurden allein getestet.

Zu jeder Probe wurden 20.000 Kopien/Reaktion der Vorlage für die Internal Control (CPE – Internal Control) hinzugefügt.

Außerdem wurde eine Referenzprobe ohne die potenziell interferierenden Substanzen analysiert.

Jede Probe wurde extrahiert und in 6 Wiederholungen in randomisierten Positionen im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) mit dem ELITE InGenius-System amplifiziert.

Jede Substanz wurde in 6 Wiederholungen in randomisierten Positionen auf dem ELITE InGenius im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) getestet.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

**Tabelle 24**

| Probe        | Positiv / Replikate |         | IC Mittlerer Ct-Wert | Negative prozentuale Übereinstimmung | Ergebnis               |
|--------------|---------------------|---------|----------------------|--------------------------------------|------------------------|
|              | Toxin A             | Toxin B |                      |                                      |                        |
| Referenz     | 0/6                 | 0/6     | 25,91                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| LOB+BISA+AZI | 0/6                 | 0/6     | 25,69                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| VAN+MET+AMP  | 0/6                 | 0/6     | 25,58                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| ALG+ALU+MAG  | 0/6                 | 0/6     | 25,79                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| CEF+CIP+HYD  | 0/6                 | 0/6     | 25,77                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| VB           | 0/6                 | 0/6     | 25,50                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| VAS+NON+BISM | 0/6                 | 0/6     | 25,88                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| CAL+PAL+STE  | 0/6                 | 0/6     | 25,64                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |
| MUC          | 0/6                 | 0/6     | 25,63                | 100 %                                | Keine Kreuzreaktivität |

Alle getesteten potenziell interferierenden Substanzen wiesen für die *C. difficile*-Zielsequenz beim Test mit dem *C. difficile* ELITE MGB Kit keine Kreuzreaktivität auf.

## 12.9 Wiederholpräzision

Zur Bewertung der Wiederholpräzision des Assays mit ELITE InGenius und ELITE BeGenius wurde ein Panel von nativen Stuhlproben, die negativ oder mit zertifiziertem Referenzmaterial von *C. difficile* (ZeptoMetrix) dotiert waren, analysiert.

Ein Beispiel für die Ergebnisse der Wiederholpräzision innerhalb eines Laufs (an einem Tag) ist in den nachstehenden Tabellen aufgeführt.

**Tabelle 25 Wiederholpräzision innerhalb eines Laufs bei ELITE InGenius (Tag 1)**

| Probe    | A-nz-ahl | Toxin B           |      |      | Toxin A           |      |      | % Übereinstimmung |
|----------|----------|-------------------|------|------|-------------------|------|------|-------------------|
|          |          | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |                   |
| Neg.     | 8        | -                 | -    | -    | -                 | -    | -    | 100 %             |
| 3 x LoD  | 8        | 36,14             | 0,35 | 0,96 | 35,74             | 0,57 | 1,59 | 100 %             |
| 10 x LoD | 8        | 33,68             | 0,33 | 0,99 | 33,05             | 0,39 | 1,19 | 100 %             |

**Tabelle 26 Wiederholpräzision innerhalb eines Laufs bei ELITE BeGenius (Tag 1)**

| Probe    | Anzahl | Toxin B           |      |      | Toxin A           |      |      | % Übereinstimmung |
|----------|--------|-------------------|------|------|-------------------|------|------|-------------------|
|          |        | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |                   |
| Neg.     | 8      | -                 | -    | -    | -                 | -    | -    | 100 %             |
| 3 x LoD  | 8      | 36,84             | 0,37 | 1,01 | 36,31             | 0,51 | 1,41 | 100 %             |
| 10 x LoD | 8      | 34,12             | 0,44 | 1,29 | 33,17             | 0,45 | 1,35 | 100 %             |

Ein Beispiel für die Ergebnisse der laufübergreifenden Wiederholpräzision (an zwei Tagen) ist in den nachstehenden Tabellen aufgeführt.

**Tabelle 27 Laufübergreifende Wiederholpräzision bei ELITE InGenius**

| Probe    | Anzahl | Toxin B           |      |      | Toxin A           |      |      | % Übereinstimmung |
|----------|--------|-------------------|------|------|-------------------|------|------|-------------------|
|          |        | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |                   |
| Neg.     | 16     | -                 | -    | -    | -                 | -    | -    | 100 %             |
| 3 x LoD  | 16     | 36,11             | 0,35 | 0,96 | 35,75             | 0,44 | 1,22 | 100 %             |
| 10 x LoD | 16     | 33,51             | 0,31 | 0,93 | 32,88             | 0,41 | 1,24 | 100 %             |

**Tabelle 28 Laufübergreifende Wiederholpräzision bei ELITE BeGenius**

| Probe    | Anzahl | Toxin B           |      |      | Toxin A           |      |      | % Übereinstimmung |
|----------|--------|-------------------|------|------|-------------------|------|------|-------------------|
|          |        | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |                   |
| Neg.     | 16     | -                 | -    | -    | -                 | -    | -    | 100 %             |
| 3 x LoD  | 16     | 36,73             | 0,39 | 1,06 | 36,03             | 0,61 | 1,70 | 100 %             |
| 10 x LoD | 16     | 33,97             | 0,39 | 1,16 | 33,02             | 0,47 | 1,44 | 100 %             |

Beim Test der Wiederholpräzision erkannte der C. difficile ELITE MGB Kit alle Proben wie erwartet und wies eine maximale Variabilität der Ct-Zielwerte als VK% unter 5 % aus.

## 12.10 Vergleichspräzision

Zur Bewertung der Vergleichspräzision des Assays mit ELITE InGenius und ELITE BeGenius wurde ein Panel von nativen Stuhlproben, die negativ oder mit zertifiziertem Referenzmaterial von *C. difficile* (ZeptoMetrix) dotiert waren, analysiert.

Ein Beispiel der Ergebnisse der chargenübergreifenden Vergleichspräzision (bei zwei Chargen) ist in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

**Tabelle 29 Chargenübergreifende Vergleichspräzision bei ELITE InGenius**

| Probe    | Anzahl | Toxin B           |      |      | Toxin A           |      |      | % Übereinstimmung |
|----------|--------|-------------------|------|------|-------------------|------|------|-------------------|
|          |        | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |                   |
| Neg.     | 8      | -                 | -    | -    | -                 | -    | -    | 100 %             |
| 3 x LoD  | 8      | 36,22             | 0,67 | 1,85 | 35,24             | 0,28 | 0,78 | 100 %             |
| 10 x LoD | 8      | 33,86             | 0,27 | 0,81 | 32,72             | 0,34 | 1,05 | 100 %             |

**Tabelle 30 Chargenübergreifende Vergleichspräzision bei ELITE BeGenius**

| Probe    | Anzahl | Toxin B           |      |      | Toxin A           |      |      | % Übereinstimmung |
|----------|--------|-------------------|------|------|-------------------|------|------|-------------------|
|          |        | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |                   |
| Neg.     | 8      | -                 | -    | -    | -                 | -    | -    | 100 %             |
| 3 x LoD  | 8      | 36,47             | 0,61 | 1,69 | 34,63             | 0,44 | 1,28 | 100 %             |
| 10 x LoD | 8      | 33,92             | 0,24 | 0,72 | 32,20             | 0,23 | 0,72 | 100 %             |

Ein Beispiel der geräteübergreifenden Vergleichspräzision (bei zwei Geräten) ist in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

**Tabelle 31 Geräteübergreifende Vergleichspräzision bei ELITE InGenius**

| Probe    | Anzahl | Toxin B           |      |      | Toxin A           |      |      | % Übereinstimmung |
|----------|--------|-------------------|------|------|-------------------|------|------|-------------------|
|          |        | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |                   |
| Neg.     | 16     | -                 | -    | -    | -                 | -    | -    | 100 %             |
| 3 x LoD  | 16     | 35,74             | 0,27 | 0,75 | 34,92             | 0,34 | 0,96 | 100 %             |
| 10 x LoD | 16     | 33,41             | 0,69 | 2,05 | 32,47             | 0,59 | 1,82 | 100 %             |

**Tabelle 32 Geräteübergreifende Vergleichspräzision bei ELITE BeGenius**

| Probe    | Anzahl | Toxin B           |      |      | Toxin A           |      |      | % Übereinstimmung |
|----------|--------|-------------------|------|------|-------------------|------|------|-------------------|
|          |        | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |                   |
| Neg.     | 16     | -                 | -    | -    | -                 | -    | -    | 100 %             |
| 3 x LoD  | 16     | 36,26             | 0,46 | 1,27 | 34,74             | 0,63 | 1,81 | 100 %             |
| 10 x LoD | 16     | 33,55             | 0,35 | 1,03 | 32,04             | 0,36 | 1,13 | 100 %             |

Beim Test der Vergleichspräzision erkannte der C. difficile ELITE MGB Kit alle Proben wie erwartet und wies eine maximale Variabilität der Ct-Zielwerte als VK% unter 5 % aus.

## 12.11 Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Die diagnostische Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer Proben wurde mit ELITE InGenius durch die Analyse von als C. difficile-DNA-negativ bestätigten klinischen Stuhlproben bewertet.

Da ELITE BeGenius gleichwertige analytische Leistungen wie ELITE InGenius aufweist, ist die diagnostische Güte der auf den beiden Geräten durchgeführten Tests ebenfalls als gleichwertig anzusehen. Daher gilt die mit ELITE InGenius erhaltene diagnostische Spezifität des Assays auch für ELITE BeGenius.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 33**

| Negative Stuhlproben | Anzahl | Positiv | Negativ | Diagnostische Spezifität in % |
|----------------------|--------|---------|---------|-------------------------------|
| <i>C. difficile</i>  | 45     | 1       | 44      | 97,8 %                        |

Der IC-Grenzwert wurde für ELITE InGenius und ELITE BeGenius auf 32 festgelegt.

## 12.12 Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Zur Bewertung der diagnostischen Sensitivität des Assays als Bestätigung positiver klinischer Proben wurden in Verbindung mit ELITE InGenius klinische Stuhlproben analysiert, die für C.-difficile-DNA als positiv bestätigt worden waren.

Da ELITE BeGenius gleichwertige analytische Leistungen wie ELITE InGenius aufweist, ist die diagnostische Güte der auf den beiden Geräten durchgeführten Tests ebenfalls als gleichwertig anzusehen. Daher gilt die mit ELITE InGenius erhaltene diagnostische Sensitivität des Assays auch für ELITE BeGenius.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 34**

| Positive Stuhlproben | Anzahl | Positiv | Negativ | Diagnostische Sensitivität in % |
|----------------------|--------|---------|---------|---------------------------------|
| <i>C. difficile</i>  | 30     | 30      | 0       | 100 %                           |

### HINWEIS!

Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Produkts mit Matrices und Geräten durchgeführt wurden, sind in der technischen Produktdokumentation für das „C. difficile ELITE MGB Kit“, M800358, aufgeführt.

## 13 PROBEN UND KONTROLLEN BEI ANDEREN SYSTEMEN

### 13.1 Proben

Dieses Produkt darf ausschließlich mit aus folgenden klinischen Proben extrahierter DNA verwendet werden: Proben aus flüssigem oder ungeformtem Stuhl.

Für die DNA-Extraktion vorgesehene Stuhlproben sollten gemäß den Standardverfahren für die Entnahme und Handhabung von Stuhlproben entnommen und gemäß den Laborrichtlinien identifiziert werden. Rohstuhl sollte in einem sterilen Behälter mit Schraubverschluss ausreichend versiegelt werden, um einen unbeabsichtigten Austritt des Inhalts zu verhindern. Außerdem muss die Probe gemäß allen geltenden Vorschriften zum Transport von Krankheitserregern transportiert werden. Proben vor der Verarbeitung bis zu 48 Stunden gekühlt (bei +2 bis +8 °C) aufbewahren. Kann die Klärung des Stuhls nicht innerhalb von 48 Stunden nach der Entnahme durchgeführt werden, die Probe bei ≤ -70 °C aufbewahren.

Für jeden Rohstuhl ein beschriftetes 1,5-ml-Röhrchen vorbereiten und 0,8 ml des S. T. A. R. Buffer in das Röhrchen geben. Rohstuhl vortexen, dann einen Pipettierer mit einer Aerosol-resistenten Spitze verwenden, um ca. 200 µl (bei dicken Stuhlproben eine Spitze mit breiter Öffnung oder einen Plastikspatel verwenden) des Rohstuhls in das

1,5-ml-Röhrchen mit dem S.T.A.R. Buffer überführen. Das Röhrchen dicht verschließen und dann vortexen, um das Gemisch zu homogenisieren (20–30 s). Die homogenisierte Lösung 1 Minute lang bei 13.000 xg (RZB) zentrifugieren, um die Probe zu klären. 400–650 µl des geklärten Stuhlüberstands vorsichtig in ein beschriftetes Sekundärröhrchen überführen, dabei darauf achten, dass das pelletierte fäkale Material nicht beeinträchtigt wird. Die Volumina und die mit den Extraktionssystemen kompatiblen Sekundärröhrchen sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen. Der geklärten Stuhl darf bis zu 7 Tage bei +2 bis +8 °C aufbewahrt werden, bevor mit der Extraktion fortgefahren wird.

#### HINWEIS!

Der S.T.A.R. Puffer muss bei Raumtemperatur gelagert werden. Wenn der Puffer unter Raumtemperatur gelagert wird, können sich weiße Ausfällungen bilden. Vor Beginn des Extraktionsverfahrens prüfen, ob sich Ausfällungen gebildet haben, und die Lösung in diesem Fall im Wasserbad oder im Inkubator auf 30–40 °C erwärmen, bis sich die Ausfällungen aufgelöst haben.

#### HINWEIS!

Für die Bearbeitung von geklärten Stuhlproben mit dem **ELITe STAR System** und der **Softwareversion 3.4.13** (oder entsprechende spätere Versionen), ist das Extraktionsprotokoll **UUNI\_E100\_S200\_ELI** zu verwenden, das 200 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 100 µl eluiert (tatsächlich erfolgt die Elution in 115 µl, wovon 100 µl aufgefangen werden). Nach dem Transfer in das Sekundärröhrchen die geklärten Proben auf **ELITe STAR** laden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 400–600 µl erforderlich. **50 µl CPE - Internal Control** und **750 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie** in ein **Proteinase-Carrier-Röhrchen** geben, wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Aufgereinigte Nukleinsäuren bei +2 bis +8 °C aufbewahren, wenn sie noch am Tag der Extraktion verwendet werden, bzw. bei einer Temperatur unter -20 °C bei Langzeitlagerung.

#### HINWEIS!

Für die Bearbeitung von geklärten Stuhlproben mit dem **ELITe GALAXY System** und der **Softwareversion 1.3.1** (oder entsprechende spätere Versionen), ist das Extraktionsprotokoll **xNA Extraction (Universal)** zu verwenden, das 300 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 100 µl eluiert (tatsächlich erfolgt die Elution in 110 µl, wovon 100 µl aufgefangen werden). Nach dem Transfer in das Sekundärröhrchen die geklärten Proben auf **ELITe GALAXY** laden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 400–650 µl, je nach Röhrchentyp, erforderlich. **2,5 µl/Probe CPE - Internal Control** und **7,5 µl/Probe hochreines Wasser für die Molekularbiologie in IC + Trägerlösung** geben, wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Aufgereinigte Nukleinsäuren bei +2 bis +8 °C aufbewahren, wenn sie noch am Tag der Extraktion verwendet werden, bzw. bei einer Temperatur unter -20 °C bei Langzeitlagerung.

**HINWEIS!**

Für die Verarbeitung von geklärten Stuhlproben mit **NucliSENS® easyMAG®** 20 µl jedes geklärten Stuhls in das **NucliSENS easyMAG** Einweg-Probengefäß (8 Proben pro Gefäß und bis zu drei Gefäße pro Lauf) geben, wie in der Arbeitsliste des Geräts festgelegt.

Eine Extraktionsanforderung auf dem **System „NucliSENS easyMAG“** wie folgt einrichten:

- Matrix = Stuhl;
- Protokoll = Generic 2.0.1;
- Volumen (ml) = 0,02 ml;
- Eluat (µl) = 110 µl;
- Typ = Primär.

Einen neuen Extraktionslauf mit einem eindeutigen und wiedererkennbaren Dateinamen (z. B. „Jahr-Monat-Tag-Extract01“) erstellen und dann die Extraktionsanforderungen in der Reihenfolge der Platzierung in den Einwegbehälter vorsichtig zum Lauf hinzufügen; anschließend das 10-minütigen Lyseverfahren beginnen.

Während des 10-minütigen Lyseverfahrens die Magnetic Silica-Suspension für 8 Proben vorbereiten; hierzu **550 µl NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**, **545 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie** und **5 µl C. difficile Internal Control** mischen. Für jede Probe den BioHit-Pipettierer oder einen manuellen Pipettierer verwenden, um 125 µl der Magnetic Silica-Suspension in den NucliSENS easyMAG Strip for Premix zu geben. Den BioHit-Pipettierer verwenden, um 100 µl der Magnetic Silica-Suspension in jede Probe im 8-Well-Einweg-Probengefäß zu geben, durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren gut mischen und anschließend das automatisierte Extraktionsverfahren starten. Nach Abschluss des Prozesses die isolierten Nukleinsäuren innerhalb von 30 Minuten nach Abschluss der Extraktion aus dem Einweggefäß entfernen, um eine Kontamination der Proben mit der Magnetic Silica zu vermeiden.

### 13.2 Störende Substanzen

Das Vorhandensein von menschlichem Blut, Mucin, Fäkal Fett, rezeptfreien und verschreibungspflichtigen Arzneimitteln in Proben hat nachweislich keine Auswirkungen auf den Nachweis von toxischem **C. difficile** mit dem **C. difficile ELITe MGB® Kit**, das in Verbindung mit **NucliSENS® easyMAG®** verwendet wird.

**Tabelle 35**

| Potenziell interferierende Substanz       | Wirkstoff             | Interferenzen? |
|-------------------------------------------|-----------------------|----------------|
| Pilz-/Juckreizhemmende Substanzen vaginal | Nystatin              | Nein           |
| Cremes / Salben / Suppositorien           | Hydrocortison, 1 %    | Nein           |
| Anti-Hämorrhoiden-Cremes / Salben         | Phenylephrin, 0,25 %  | Nein           |
| Antazida                                  | Calciumcarbonat       | Nein           |
| Einläufe                                  | Mineralöl             | Nein           |
| Spermizide Gleitmittel                    | Nonoxynol 9           | Nein           |
| Antidurchfallmedikamente                  | Loperamidhydrochlorid | Nein           |
| Antidurchfallmedikamente                  | Bismutsubsalicylat    | Nein           |
| Laxanzien                                 | Sennoside             | Nein           |

**Tabelle 35 (continued)**

| Potenziell interferierende Substanz | Wirkstoff                                   | Interferenzen? |
|-------------------------------------|---------------------------------------------|----------------|
| Antibiotika (oral oder injizierbar) | Metronidazol (oral)                         | Nein           |
|                                     | Ciprofloxacin (oral)                        | Nein           |
|                                     | Azithromycin (oral)                         | Nein           |
|                                     | Vancomycin (oral)                           | Nein           |
|                                     | Zosyn (injizierbar)                         | Nein           |
| Nichtsteroidale Entzündungshemmer   | Naproxen-Natrium                            | Nein           |
| Steroidale Entzündungshemmer        | Prednison                                   | Nein           |
| Erfrischungstücher                  | Benzalkoniumchlorid 0,40 %                  | Nein           |
| Erfrischungstücher                  | Isopropylalkohol, 70 %                      | Nein           |
| Fäkalfett (Palmitinsäure)           | Palmitinsäure                               | Nein           |
| Fäkalfett (Stearinsäure)            | Stearinsäure                                | Nein           |
| Blut                                | Glucose, Hormone, Enzyme, Ionen, Eisen usw. | Nein           |
| Schleim                             | Immunglobuline, Lysozym, Polymere usw.      | Nein           |

Es liegen keine Daten zu einer Inhibition durch andere antivirale, antibiotische und chemotherapeutische oder immunsupprimierende Medikamente vor.

Eine große Menge humaner genomischer DNA in der aus der Probe extrahierten DNA kann die Amplifikationsreaktion hemmen.

### 13.3 Amplifikationskontrollen

Es ist erforderlich, jeden Amplifikationslauf mit einer Negativkontrolle und einer Positivkontrolle zu validieren.

Für die Negativkontrolle hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht enthalten) verwenden.

Für die Positivkontrolle „**C. difficile - ELITE Positive Control**“ Art.-Nr. M800373 (nicht enthalten) verwenden.

### 13.4 Qualitätskontrollen

Es wird empfohlen, das gesamte Analyseverfahren für jeden Extraktions- und Amplifikationslauf durch Verarbeiten einer negativ getesteten Probe und einer positiv getesteten Probe oder eines kalibrierten Referenzmaterials, zu validieren.

## 14 VERFAHREN BEI ANDEREN SYSTEMEN

### Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs

(Im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten durchzuführen)

Vor Beginn des Laufs die in der Dokumentation des Geräts enthaltenen Herstellerempfehlungen befolgen und:

- Computer einschalten, Echtzeit-Thermocycler einschalten, dedizierte Software ausführen, einen Lauf für die „absolute Quantifizierung“ öffnen;
- bei Verwendung des Applied Biosystem® **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** oder des Applied Biosystem® **7500 Fast Real-Time PCR System** „Run mode: Fast 7500“ (Laufmodus: Fast 7500) einstellen;

- bei Verwendung des Applied Biosystem® **7500 Real-Time PCR System** wird „Run mode: Standard 7500“ (Laufmodus: Standard 7500) automatisch ausgewählt;
- einen neuen Detektor („detector“) erstellen oder durch Auswahl des Detector Manager den entsprechenden Detektor im Menü „Tool“ (Werkzeug) einstellen:
  - den Detektor („detector“) für die Toxin-A-Gen-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „VIC“ (AP525 ähnelt VIC) und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „Toxin A“ nennen;
  - den Detektor („detector“) für die Toxin-B-Gen-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „Toxin B“ nennen;
  - den Detektor („detector“) für die Internal-Control-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „CY5“ (AP642 ähnelt Cy5) und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „IC“ nennen;
- in das Menü „View“ (Ansicht) gehen, den „Well Inspector“ auswählen und für jede in der Mikrotiterplatte verwendete Vertiefung den Detektor („detector“) (zu messender Fluoreszenztyp) so einrichten, dass „passive reference“ (passive Referenz) = „ROX“ (AP593 ist analog zu ROX), um die gemessene Fluoreszenz und den Reaktionstyp (Probe, Amplifikations-Negativkontrolle, Amplifikations-Positivkontrolle) zu normalisieren. Diese Informationen zum **Arbeitsblatt** am Ende dieser Gebrauchsanweisung hinzufügen oder die Mikrotiterplatten-Einrichtung ausdrucken. Das **Arbeitsblatt** muss bei der Überführung des Reaktionsgemischs und der Proben in die Vertiefungen sorgfältig befolgt werden.

Nachstehend ist ein Beispiel aufgeführt, wie eine qualitative Analyse von 12 Proben organisiert werden kann.

|    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 |
| NC | PC |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
|    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
|    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
|    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
|    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
|    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
|    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
|    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
|    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
|    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
|    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |

**Legende:** S1 - S12: Zu analysierende Proben; NC: Amplifikations-Negative Control; PC: Amplifikations-Positive Control.

Gemäß der Gerätedokumentation in der dedizierten Software („Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile“ (Gerät > Thermocycler-Protokoll > Temperaturprofil)) die Parameter des **Temperaturzyklus** festlegen:

- zur Amplifikationsphase den **Schritt zur Verlängerung bei 72 ° C** hinzufügen („Add Step“ (Schritt hinzufügen));

#### HINWEIS!

Die Fluoreszenzerfassung („Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection“ (Gerät > Thermocycler-Protokoll > Einstellungen > Datenerfassung)) muss während des Hybridisierungsschritts auf 56 °C eingestellt sein.

- die Zeitsteuerung wie in der nachstehenden Tabelle „**Temperaturzyklus**“ angegeben ändern,
- die Anzahl an Zyklen auf **45** einstellen,
- das Reaktionsvolumen auf **30 µl** einstellen,
- optional: die Dissoziationsphase hinzufügen („Add Dissociation Stage“) und den Temperaturbereich von 40 °C bis 80 °C einstellen.

Tabelle 36

| Parameter des Temperaturzyklus          |                        |               |
|-----------------------------------------|------------------------|---------------|
| Phase                                   | Temperaturen           | Zeitsteuerung |
| Dekontamination                         | 50 °C                  | 2 min.        |
| Erste Denaturierung                     | 93 °C                  | 2 min.        |
| Amplifikation und Detektion (45 Zyklen) | 93 °C                  | 10 s          |
|                                         | 56 °C (Datenerfassung) | 30 s          |
|                                         | 72 °C                  | 15 s          |
| Dissoziation (optional)                 | 95 °C                  | 15 s          |
|                                         | 40 °C                  | 1 min.        |
|                                         | 80 °C                  | 15 s          |
|                                         | 60 °C                  | 15 s          |

### Einrichten der Amplifikation

(Im Bereich für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen durchzuführen)

Vor Beginn des Laufs muss Folgendes durchgeführt werden:

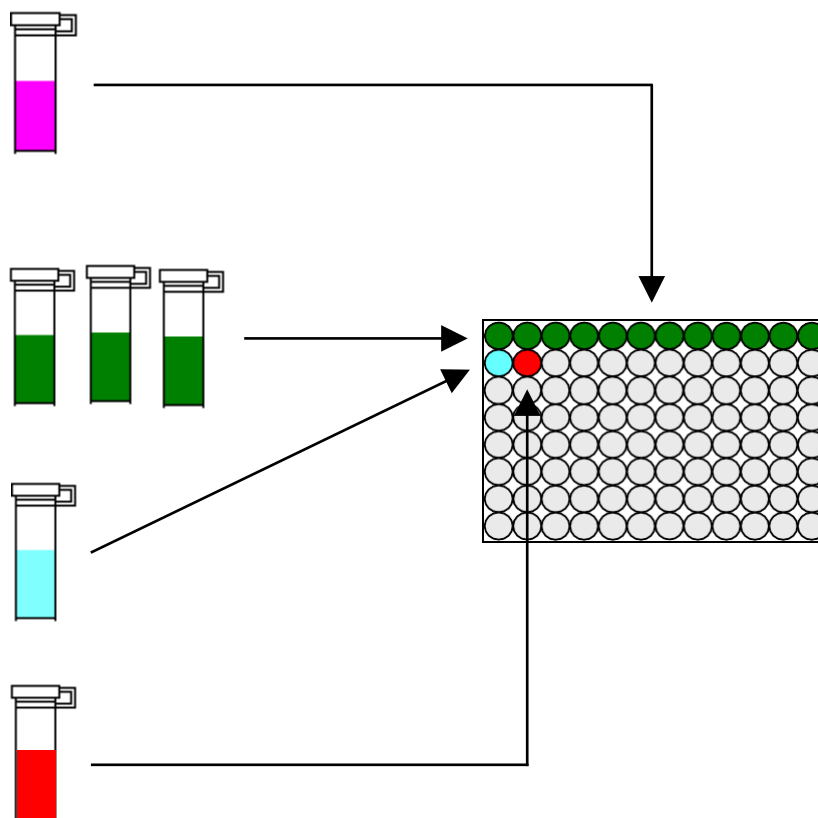
- die Röhrchen mit den zu analysierenden verarbeiteten Proben auftauen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis lagern,
  - die für den Lauf benötigten **C. difficile PCR Mix**-Röhrchen auftauen und daran denken, dass jedes Röhrchen für die Vorbereitung von **25 Reaktionen** ausreicht. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen maximal vier Stunden auf Eis lagern,
  - ein **C. difficile Positive Control**-Röhrchen auftauen (nicht enthalten). Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und maximal vier Stunden auf Eis lagern,
  - die während des Laufs verwendete **Amplifikations-Mikrotiterplatte** zur Hand nehmen; dabei puderfreie Handschuhe tragen und darauf achten, dass die Vertiefungen nicht beschädigt werden.
1. **20 µl C. difficile PCR Mix** präzise auf den Boden der Vertiefungen der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** geben, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Bläschenbildung vermeiden.

### HINWEIS!

Wenn das Reaktionsgemisch nicht vollständig aufgebraucht wird, das Restvolumen maximal einen Monat bei -20 °C dunkel aufbewahren. Das Reaktionsgemisch maximal **fünf** Gefrier- und Auftauzyklen unterziehen.

2. Zum Reaktionsgemisch **10 µl** der ersten verarbeiteten Probe in die dafür vorgesehene Vertiefung hinzufügen, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Mit den übrigen extrahierten Proben auf die gleiche Weise verfahren.
3. Zum Reaktionsgemisch **10 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie** (nicht mitgeliefert) in der Vertiefung für die Negativkontrolle hinzufügen, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt.
4. Zum Reaktionsgemisch **10 µl C. difficile Positive Control** in die entsprechende Vertiefung hinzufügen, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt.
5. Die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit der **Amplifikations-Klebefolie** dicht verschließen.
6. Wenn eine Zentrifuge mit einem Plattenadapter zur Verfügung steht, die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** herunterzentrifugieren, um das Reaktionsgemisch am Boden der Vertiefungen zu entnehmen.
7. Die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** in den Echtzeit-Thermocycler im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten transferieren und den Temperaturzyklus für die Amplifikation starten. Die Laufeinstellung unter einem eindeutigen und erkennbaren Dateinamen (z. B. „Jahr-Monat-Tag-C. difficile-EGSpA“) speichern.

Die folgende Abbildung zeigt den Ablauf der Amplifikationsreaktion.



1. **20 µl PCR Mix in jede Vertiefung hinzufügen**
2. **20 µl extrahierte DNAs hinzufügen**
3. **10 µl Negative Control hinzufügen**
4. **10 µl Positive Control hinzufügen**

#### HINWEIS!

Wenn die Vorbereitung der Amplifikationsreaktion mit dem Gerät **ELITE GALAXY** durchgeführt wird, die Elutions-Mikrotiterplatte, den Q-PCR Mix und die Amplifikations-Mikrotiterplatte wie in der Gebrauchsanweisung des Geräts angegeben laden und die Schritte auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen.

#### HINWEIS!

Am Ende des Temperaturzyklus muss die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit den Reaktionsprodukten aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Um ein Verschütten der Reaktionsprodukte zu vermeiden darf die **klare selbsthaftende Dichtungsfolie nicht von der Amplifikations-Mikrotiterplatte entfernt werden**.

#### Qualitative Analyse der Ergebnisse

Die aufgezeichneten Werte der während der Amplifikationsreaktionen von der Toxin-A-Gensonde (VIC-Detektor „Toxin A“), der Toxin-B-Gensonde (FAM-Detektor „Toxin B“) und der Internal Control-Sonde (CY5-Detektor „IC“) ausgesendeten Fluoreszenz müssen von der Gerätesoftware analysiert werden.

Vor Beginn der Analyse die in der Dokumentation des Geräts enthaltenen Herstellerempfehlungen befolgen und:

- unter „Results > Amplification plot > delta Rn vs. Cycle“ (Ergebnisse > Amplifikationsdarstellung > Delta Rn vs. Zyklus) die **Analyseeinstellungen („Analysis Settings“)** für alle Detektoren auf **„Auto Baseline“ (Auto-Baseline)** und **„Manual Ct“ (manueller Ct-Wert)** sowie den **Schwellenwert („Threshold“)** auf **0,05** einstellen. Die Schaltfläche **Analyze** drücken und die Ergebnisse **speichern**.

Die Werte der von den spezifischen Sonden während der Amplifikationsreaktion ausgesendeten Fluoreszenz und der **Schwellenwert** („Threshold“) der Fluoreszenz ermöglichen die Bestimmung des **Schwellenwertzyklus** („Threshold cycle (Ct)“). Der Ct ist der Zyklus, in dem die Fluoreszenz den **Schwellenwert** erreicht und ist proportional zur anfänglichen Zielmenge.

In der Amplifikationsreaktion der **Positive Control** dienen die Ct-Werte der Toxin-A- und Toxin-B-Detektoren („Results □ Report“ (Ergebnisse □ Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

**Tabelle 37**

| Reaktion der Positive Control VIC-Detektor<br>„Toxin A“ | Assayergebnis | Amplifikation/Detektion |
|---------------------------------------------------------|---------------|-------------------------|
| Ct < 35                                                 | POSITIV       | KORREKT                 |

**Tabelle 38**

| Reaktion der Positive Control FAM-Detektor<br>„Toxin B“ | Assayergebnis | Amplifikation/Detektion |
|---------------------------------------------------------|---------------|-------------------------|
| Ct < 35                                                 | POSITIV       | KORREKT                 |

Wenn das Ergebnis der Amplifikation der Positive Control bei Toxin-A- oder Toxin-B-Detektoren Ct ≥ 35 oder Ct Undetermined (Ct unbestimmt) ist, wurde die Ziel-DNA nicht nachgewiesen. Das heißt, dass während des Amplifikations- oder des Detektionsschritts Probleme aufgetreten sind (falsches Dispensieren des Reaktionsgemischs oder der Positivkontrollen, Abbau des Reaktionsgemischs oder der Positivkontrollen, falsche Einstellung der Position der Positivkontrollen, falsche Einstellung des Temperaturzyklus), die zu falschen Ergebnissen führen können. Der gesamte Lauf ist ungültig und muss ab dem Amplifikationsschritt wiederholt werden.

In der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** dienen die Ct-Werte der Toxin-A-, Toxin-B- und IC-Detektoren („Results □ Report“ (Ergebnisse □ Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

**Tabelle 39**

| Reaktion der Negative Control VIC-Detektor<br>„Toxin A“ | Assayergebnis | Amplifikation/Detektion |
|---------------------------------------------------------|---------------|-------------------------|
| Ct unbestimmt oder Ct ≥ 40                              | NEGATIV       | KORREKT                 |

**Tabelle 40**

| Reaktion der Negative Control FAM-Detektor<br>„Toxin B“ | Assayergebnis | Amplifikation/Detektion |
|---------------------------------------------------------|---------------|-------------------------|
| Ct unbestimmt oder Ct ≥ 40                              | NEGATIV       | KORREKT                 |

**Tabelle 41**

| Reaktion der Negative Control Cy5-Detektor „IC“ | Assayergebnis | Amplifikation/Detektion |
|-------------------------------------------------|---------------|-------------------------|
| Ct unbestimmt oder Ct ≥ 34                      | NEGATIV       | KORREKT                 |

Wenn das Ergebnis der Amplifikation der **Negative Control** Ct < 40 beim Toxin-A- oder Toxin-B-Detektor bzw. Ct < 34 beim IC-Detektor ist, wurde die Ziel-DNA nicht korrekt nachgewiesen. Das heißt, dass während des Amplifikationsschritts Probleme aufgetreten sind (Kontamination), die zu falsch-positiven Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab dem Amplifikationsschritt wiederholt werden.

Bei jeder **Proben**-Amplifikationsreaktion werden die **Ct**-Werte des Toxin-A- oder Toxin-B-Detektors zum Nachweis der Ziel-DNA herangezogen, während der **Ct**-Wert der Internal Control zur Validierung der Extraktion, Amplifikation und Detektion verwendet wird.

### HINWEIS!

Überprüfen Sie über die Gerätesoftware („Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle“ (Ergebnisse > Amplifikationsdarstellung > Delta Rn vs. Zyklus)), dass der **Ct**-Wert anhand eines prompten und regelmäßigen Anstiegs der Fluoreszenz und nicht anhand von Spitzen oder eines Anstiegs des Hintergrunds (unregelmäßiger oder hoher Hintergrund) ermittelt wurde.

Die **Ct**-Werte der Amplifikationsreaktionen jeder **Probe** („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) werden wie in der folgenden Tabelle beschrieben verwendet:

**Tabelle 42**

| Probenreaktion          |                         |                         | Assayergebnis |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------|
| VIC-Detektor „Toxin A“  | FAM-Detektor „Toxin B“  | Cy5-Detektor „IC“       |               |
| Unbestimmt oder Ct ≥ 40 | Unbestimmt oder Ct ≥ 40 | Ct < 34                 | Negativ       |
|                         |                         | Unbestimmt oder Ct ≥ 34 | Ungültig      |
| Bestimmt, Ct < 40       | Unbestimmt oder Ct ≥ 40 | Nicht anwendbar         | Positiv       |
| Unbestimmt oder Ct ≥ 40 | Bestimmt, Ct < 40       | Nicht anwendbar         | Positiv       |
| Bestimmt, Ct < 40       | Bestimmt, Ct < 40       | Nicht anwendbar         | Positiv       |

**Tabelle 43**

| Assayergebnis | Ergebnisinterpretation                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Negativ       | <b>DNA des Toxin-A-Gens oder des Toxin-B-Gens von C. difficile wurde</b> in der Probe <b>nicht nachgewiesen</b> .<br>Die Probe wurde negativ auf toxisches C. difficile getestet oder die C. difficile-Konzentration liegt unter der Nachweisgrenze des Assays. |
| Ungültig      | <b>Ungültiges Assayergebnis.</b> Lauf mit der Extraktion der gleichen Probe wiederholen oder eine neue Extraktion mit einer neuen Probe durchführen.                                                                                                            |
| Positiv       | <b>DNA des Toxin-A-Gens oder des Toxin-B-Gens von C. difficile wurde</b> in der Probe <b>nachgewiesen</b> .<br>Die Probe ist C. difficile-positiv und könnte <b>toxisch</b> sein.                                                                               |

Das Vorhandensein eines (Toxin-A- oder Toxin-B-Gen) oder beider Marker ist ein Hinweis auf toxisches C. difficile.

Lautet das Ergebnis der Proben-Amplifikationsreaktion **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) oder **Ct ≥ 40** beim Toxin-A- und Toxin-B-Detektor und **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) oder **Ct ≥ 34** beim IC-Detektor, bedeutet dies, dass es nicht möglich war, die DNA für die Zielsequenzen und die Internal-Control-DNA effizient nachzuweisen. In diesem Fall sind während des Amplifikationsschritts (ineffiziente oder keine Amplifikation) oder während des Extraktionsschritts (Abbau von DNA, Verlust von DNA während der Extraktion oder Verschleppung von Inhibitoren in der extrahierten DNA) Probleme aufgetreten, die zu falschen und falsch-negativen Ergebnissen führen können. In diesem Fall ist die Probe ungeeignet, der Lauf ist ungültig und muss ab der Extraktion der Probe oder einer neuen Probe desselben Patienten wiederholt werden.

Lautet das Ergebnis der Proben-Amplifikation **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) oder **Ct ≥ 40** beim Toxin-A- und Toxin-B-Detektor und **Ct < 34** beim IC-Detektor, bedeutet dies, dass die toxische C. difficile-DNA in der verarbeiteten Probe nicht nachgewiesen wurde. Die Probe ist vermutlich negativ. Allerdings kann die Anzahl der Organismen in der Probe unter der Nachweisgrenze des Produkts liegen (siehe „Leistungsmerkmale“). In diesem Fall kann das Ergebnis falsch-negativ sein.

**HINWEIS!**

Wenn Toxin-A- und/oder Toxin-B-DNA in einer Probe nachgewiesen wird, kann der IC-Detektor **Ct Undeterminiert** (Ct unbestimmt) oder **Ct  $\geq$  34** sein. Tatsächlich kann die hohe Effizienz der DNA-Amplifikation des Toxin A- und des Toxin B-Gens mit der geringen Effizienz der Internal Control-Amplifikation konkurrieren. In diesem Fall ist die Probe geeignet und das positive Ergebnis des Assays gültig.

## 15 LEISTUNGSMERKMALE BEI ANDEREN SYSTEMEN

### 15.1 Klinische Leistung

Die Leistungsmerkmale des **C. difficile ELITE MGB Kit**, das zusammen mit Stuhlproben und dem System **ELITE STAR** verwendet wird, wurden mittels Analyse einer Reihe klinischer Proben bestimmt, die zuvor mit dem *C. difficile*-Zytotoxizitäts-Kulturtest als Referenzmethode getestet wurden. Insgesamt wurden 82 Stuhlproben, 30 positive und 52 negative, getestet. Jede Probe wurde dem gesamten Analyseverfahren unterzogen, d. h. der Extraktion und Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

**Tabelle 44**

| <b>C. difficile ELITE MGB Kit</b>                                 | <b>Referenzmethode</b>                |                                       |                |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------|
|                                                                   | <b>Tx <i>C. difficile</i> Positiv</b> | <b>Tx <i>C. difficile</i> Negativ</b> | <b>Ge-samt</b> |
| Toxigenes <i>C. difficile</i> -positiv                            | 29                                    | 4                                     | 33             |
| Toxigenes <i>C. difficile</i> -negativ                            | 1                                     | 48                                    | 49             |
| Probe insgesamt gültig für die Analyse                            | 30                                    | 52                                    | 82             |
| Diagnostische Sensitivität (positive prozentuale Übereinstimmung) | 97 %                                  | -                                     |                |
| Diagnostische Spezifität (negative prozentuale Übereinstimmung)   | -                                     | 92 %                                  |                |

Im Vergleich zur Referenzmethode identifizierte das **C. difficile ELITE MGB Kit** 97 % der für toxisches *C. difficile* positiven Proben und 92 % der negativen Proben. Positive Proben, die im Kulturtest positiv waren, wurden vom Assay nicht als positiv bestätigt. Der Assay identifiziert 4 positive Probe, die im Kulturtest negativ waren. Die Schmelzkurvenanalyse bestätigte, dass 4 Proben echt positiv für toxisches *C. difficile* waren.

Abweichende Ergebnisse wurden durch einen unabhängigen molekularen Test (Xpert® *C. difficile* System, Cepheid) aufgeklärt. Das Endergebnis ist in der folgenden Tabelle angegeben.

**Tabelle 45**

| <b>C. difficile ELITE MGB Kit</b>                                 | <b>Referenzmethoden</b>               |                                       |                |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------|
|                                                                   | <b>Tx <i>C. difficile</i> Positiv</b> | <b>Tx <i>C. difficile</i> Negativ</b> | <b>Ge-samt</b> |
| Toxigenes <i>C. difficile</i> -positiv                            | 33                                    | 0                                     | 33             |
| Toxigenes <i>C. difficile</i> -negativ                            | 0                                     | 49                                    | 49             |
| Probe insgesamt gültig für die Analyse                            | 33                                    | 49                                    | 82             |
| Diagnostische Sensitivität (positive prozentuale Übereinstimmung) | 100 %                                 | -                                     |                |
| Diagnostische Spezifität (negative prozentuale Übereinstimmung)   | -                                     | 100 %                                 |                |

Die Leistungsmerkmale des **C. difficile ELITE MGB Kit**, das zusammen mit Stuhlproben und dem System **ELITE GALAXY** verwendet wird, wurden mittels Analyse einer Reihe klinischer Proben bestimmt, die zuvor mit dem Zytotoxizitäts-Kulturtest als Referenzmethode getestet wurden. Insgesamt wurden 82 *C. difficile*-Stuhlproben, 30 positive und 52 negative, getestet. Jede Probe wurde dem gesamten Analyseverfahren unterzogen, d. h. der Extraktion und Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

**Tabelle 46**

| <b>C. difficile ELITE MGB Kit</b>                                 | <b>Referenzmethode</b>         |                                |                |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------|
|                                                                   | <b>Tx C. difficile Positiv</b> | <b>Tx C. difficile Negativ</b> | <b>Ge-samt</b> |
| Toxigenes <i>C. difficile</i> -positiv                            | 28                             | 4                              | 32             |
| Toxigenes <i>C. difficile</i> -negativ                            | 2                              | 48                             | 50             |
| Probe insgesamt gültig für die Analyse                            | 30                             | 52                             | 82             |
| Diagnostische Sensitivität (positive prozentuale Übereinstimmung) | 93 %                           | -                              |                |
| Diagnostische Spezifität (negative prozentuale Übereinstimmung)   | -                              | 92 %                           |                |

Im Vergleich zur Referenzmethode identifizierte das **C. difficile ELITE MGB Kit** 93 % der für toxisches *C. difficile* positiven Proben und 92 % der negativen Proben. 2 Proben, die im Kulturtest positiv waren, wurden vom Assay nicht als positiv bestätigt. Der Assay identifizierte 4 positive Probe, die im Kulturtest negativ waren. Die Schmelzkurvenanalyse bestätigte, dass 4 Proben echt positiv für toxisches *C. difficile* waren.

Abweichende Ergebnisse wurden durch einen unabhängigen molekularen Test (Xpert® C. difficile System, Cepheid) aufgeklärt. Das Endergebnis ist in der folgenden Tabelle angegeben.

**Tabelle 47**

| <b>C. difficile ELITE MGB Kit</b>                                 | <b>Referenzmethoden</b>        |                                |                |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------|
|                                                                   | <b>Tx C. difficile Positiv</b> | <b>Tx C. difficile Negativ</b> | <b>Ge-samt</b> |
| Toxigenes <i>C. difficile</i> -positiv                            | 32                             | 0                              | 32             |
| Toxigenes <i>C. difficile</i> -negativ                            | 1                              | 49                             | 50             |
| Probe insgesamt gültig für die Analyse                            | 33                             | 49                             | 82             |
| Diagnostische Sensitivität (positive prozentuale Übereinstimmung) | 100 %                          | -                              |                |
| Diagnostische Spezifität (negative prozentuale Übereinstimmung)   | -                              | 100 %                          |                |

Die Leistungsmerkmale des **C. difficile ELITE MGB Kit** wurden in einer prospektiven Forschungsstudie ermittelt, in der die mit dem **C. difficile ELITE MGB Kit** in Verbindung mit NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux) und dem 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems) erzielten Ergebnisse mit einem Zytotoxizitäts-Kulturtest als Referenzmethode verglichen wurden.

Insgesamt 100 *C. difficile*-positive und -negative Stuhlproben, die mittels Kulturtest ausgewertet wurden, wurden anschließend mit dem **C. difficile ELITE MGB Kit** getestet. Im Vergleich zur Referenzmethode identifizierte das **C. difficile ELITE MGB Kit** 100 % der für toxisches *C. difficile* positiven Proben und 86 % der negativen Proben.

**Tabelle 48**

| C. difficile ELITe MGB Kit                                        | Referenzmethode            |                            |             |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|
|                                                                   | Tx C. difficile<br>Positiv | Tx C. difficile<br>Negativ | Ge-<br>samt |
| Toxigenes C. difficile-positiv                                    | 50                         | 7                          | 57          |
| Toxigenes C. difficile-negativ                                    | 0                          | 43                         | 43          |
| Probe insgesamt gültig für die Analyse                            | 50                         | 50                         | 100         |
| Diagnostische Sensitivität (positive prozentuale Übereinstimmung) | 100 %                      | -                          |             |
| Diagnostische Spezifität (negative prozentuale Übereinstimmung)   | -                          | 86 %                       |             |

Im Vergleich zur Referenzmethode identifizierte das **C. difficile ELITe MGB Kit** 100 % der für toxisches C. difficile positiven Proben und 86 % der negativen Proben. Der Assay identifiziert 7 positive Probe, die im Kulturtest negativ waren.

Die Diskrepanzanalyse wurde mittels PCR unter Verwendung von Primern durchgeführt, die für das Toxin-B-Gen spezifisch sind, aber von den Primern des **C. difficile ELITe MGB Kit** unabhängig sind. Das Endergebnis ist in der folgenden Tabelle angegeben.

**Tabelle 49**

| C. difficile ELITe MGB Kit                                        | Referenzmethoden           |                            |             |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|
|                                                                   | Tx C. difficile<br>Positiv | Tx C. difficile<br>Negativ | Ge-<br>samt |
| Toxigenes C. difficile-positiv                                    | 50                         | 5                          | 55          |
| Toxigenes C. difficile-negativ                                    | 0                          | 45                         | 45          |
| Probe insgesamt gültig für die Analyse                            | 50                         | 50                         | 100         |
| Diagnostische Sensitivität (positive prozentuale Übereinstimmung) | 100 %                      | -                          |             |
| Diagnostische Spezifität (negative prozentuale Übereinstimmung)   | -                          | 90 %                       |             |

## 15.2 Nichtklinische Leistung

### 15.2.1 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des **C. difficile ELITe MGB Kit** wurde mithilfe der statistischen Probit-Regressionsanalyse berechnet. Die Nachweisgrenze wurde für jeden Stamm als die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.

Die Nachweisgrenze des **C. difficile ELITe MGB Kit**, der in Verbindung mit geklärten Stuhlproben und dem System **ELITe STAR** verwendet wurde, wurde mit zwei Stämmen von toxischem C. difficile bestimmt.

Referenzmaterialien, die C. difficile 027 oder C. difficile 017 (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) enthielten, wurden in negativem geklärtem Stuhl verdünnt. Mehrere Verdünnungen in einem Bereich von 1000 KbE/ml bis 1 KbE/ml wurden getestet, wobei das gesamte Analyseverfahren, Extraktion und Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt wurde.

Die LoD-Werte als KbE/ml sind nachfolgend angegeben.

**Tabelle 50 Nachweisgrenze für geklärte Stuhlproben und das System ELITE STAR**

| Stamm                                        | KbE/ml |
|----------------------------------------------|--------|
| C. difficile 027, Toxin A+B+, Toxinotyp III  | 187    |
| C. difficile 017, Toxin A-B+, Toxinotyp VIII | 278    |

Die Nachweisgrenze des **C. difficile ELITE MGB Kit**, der in Verbindung mit geklärten Stuhlproben und dem System **ELITE GALAXY** verwendet wurde, wurde mit zwei Stämmen von toxischem *C. difficile* bestimmt.

Referenzmaterialien, die *C. difficile* 027 oder *C. difficile* 017 (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) enthielten, wurden in negativem geklärtem Stuhl verdünnt. Mehrere Verdünnungen in einem Bereich von 178 KbE/ml bis 1,78 KbE/ml wurden getestet, wobei das gesamte Analyseverfahren, Extraktion, PCR-Einstellung und Amplifikation, mit Produkten der ELITEchGroup S.p.A. durchgeführt wurde.

Nachfolgend ist die Nachweisgrenze in KbE/ml-Werten angegeben.

**Tabelle 51 Nachweisgrenze für geklärte Stuhlproben und das System ELITE GALAXY**

| Stamm                                        | KbE/ml |
|----------------------------------------------|--------|
| C. difficile 027, Toxin A+B+, Toxinotyp III  | 88     |
| C. difficile 017, Toxin A-B+, Toxinotyp VIII | 84     |

Die Nachweisgrenze des **C. difficile ELITE MGB Kit**, der in Verbindung mit geklärten Stuhlproben und dem System **NucliSENS® easyMAG®** verwendet wurde, wurde mit zwei Stämmen von toxischem *C. difficile* bestimmt.

Frische Kulturen des *C. difficile*-Stamms VPI 10463 und des Stamms 4118 wurden quantifiziert und in negativ geklärtem Stuhl verdünnt. Für die Testung mehrerer Verdünnungen wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und Amplifikation, mit Produkten von BioMérieux und der ELITEchGroup S.p.A. durchgeführt.

Nach der Bestimmung wurde die Nachweisgrenze für jeden Stamm überprüft, indem 20 Wiederholungen in der behaupteten Konzentration getestet wurden. Nachfolgend ist die Nachweisgrenze in KbE/ml-Werten angegeben.

**Tabelle 52 Nachweisgrenze für geklärte Stuhlproben und das NucliSENS® easyMAG® System**

| Stamm                                    | KbE/ml |
|------------------------------------------|--------|
| ATCC 43255, Stamm 10463, Toxinotyp 0     | 1,121  |
| ATCC BAA-1870, Stamm 4118, Toxinotyp III | 3,750  |

### 15.2.2 Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit kalibriertem Referenzmaterial

Die Reproduzierbarkeit der Assayergebnisse im Vergleich zu Ergebnissen, die mit anderen Assays in verschiedenen Laboren erhalten wurden, wurde durch Testen einer Ringversuchsreihe überprüft.

Ein Test wurde mithilfe der Reihe „QCMD 2012 *C. difficile* DNA EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) als Referenzmaterial durchgeführt. Zum Testen der einzelnen Proben wurde die Extraktion mit dem System ELITE STAR und die Amplifikation mit Produkten der ELITEchGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 53 Tests mit Ringversuchsreihe und dem System ELITE STAR**

| Probe   | Typ                     | KbE/ml                | Ergebnis |
|---------|-------------------------|-----------------------|----------|
| CD12-01 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>4</sup> | POS      |
| CD12-02 | <i>C. sordellii</i>     | -                     | NEG      |

**Tabelle 53 Tests mit Ringversuchsreihe und dem System ELITe STAR (continued)**

| Probe   | Typ                     | KbE/ml                | Ergebnis |
|---------|-------------------------|-----------------------|----------|
| CD12-03 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>3</sup> | POS      |
| CD12-04 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>5</sup> | POS      |
| CD12-05 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>5</sup> | POS      |
| CD12-06 | Negativ                 | -                     | NEG      |
| CD12-07 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>6</sup> | POS      |
| CD12-08 | <i>C. difficile</i> 017 | 8 x 10 <sup>6</sup>   | POS      |
| CD12-09 | <i>C. difficile</i> 017 | 8 x 10 <sup>4</sup>   | POS      |
| CD12-10 | <i>C. difficile</i> 017 | 8 x 10 <sup>5</sup>   | POS      |

Alle Proben wurden richtig erkannt.

Ein weiterer Test wurde mithilfe der Reihe „QCMD 2012 *C. difficile* DNA EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) als Referenzmaterial durchgeführt. Zum Testen der einzelnen Proben wurde die Extraktion und PCR-Einstellung mit dem **System ELITe GALAXY** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S. p. A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 54 Tests mit Ringversuchsreihe und dem System ELITe GALAXY**

| Probe   | Typ                     | KbE/ml                | Ergebnis |
|---------|-------------------------|-----------------------|----------|
| CD12-01 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>4</sup> | POS      |
| CD12-02 | <i>C. sordellii</i>     | -                     | NEG      |
| CD12-03 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>3</sup> | POS      |
| CD12-04 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>5</sup> | POS      |
| CD12-05 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>5</sup> | POS      |
| CD12-06 | Negativ                 | -                     | NEG      |
| CD12-07 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>6</sup> | POS      |
| CD12-08 | <i>C. difficile</i> 017 | 8 x 10 <sup>6</sup>   | POS      |
| CD12-09 | <i>C. difficile</i> 017 | 8 x 10 <sup>4</sup>   | POS      |
| CD12-10 | <i>C. difficile</i> 017 | 8 x 10 <sup>5</sup>   | POS      |

Alle Proben wurden richtig erkannt.

Der Test wurde mithilfe der Reihe „QCMD 2013 *C. difficile* DNA EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) als Referenzmaterial durchgeführt. Zum Testen der einzelnen Proben wurde die Extraktion mit NucliSENS® easyMAG® und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 55 Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und NucliSENS® easyMAG®**

| Probe   | Typ                     | KbE/ml                | Pos./Wiederh. | Ergebnis |
|---------|-------------------------|-----------------------|---------------|----------|
| CD13-01 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>5</sup> | 2/2           | POS      |
| CD13-02 | <i>C. difficile</i> 017 | 8 x 10 <sup>6</sup>   | 2/2           | POS      |
| CD13-03 | Negativ                 | -                     | 0/2           | NEG      |
| CD13-04 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>4</sup> | 2/2           | POS      |
| CD13-05 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>6</sup> | 2/2           | POS      |
| CD13-06 | <i>C. difficile</i> 017 | 8 x 10 <sup>5</sup>   | 2/2           | POS      |
| CD13-07 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>3</sup> | 2/2           | POS      |
| CD13-08 | <i>C. sordellii</i>     | 2,1 x 10 <sup>5</sup> | 0/2           | NEG      |
| CD13-09 | <i>C. difficile</i> 027 | 4,6 x 10 <sup>5</sup> | 2/2           | POS      |
| CD13-10 | <i>C. difficile</i> 017 | 8 x 10 <sup>4</sup>   | 2/2           | POS      |

Alle Proben wurden richtig erkannt.

### 15.2.3 Effizienz des Genotypnachweises (Inklusivität)

Mit dem **C. difficile ELITE MGB Kit** wurden 30 toxische *C. difficile*-Isolate, die für die globale genetische Vielfalt repräsentativ sind, korrekt identifiziert, darunter sieben verschiedene Toxintypen (0, III, V, VIII, X, XII und XXII) und dreizehn verschiedene PCR-Ribotypen (001, 002, 010, 012, 014, 017, 020, 027, 036, 056, 087, 110 und 154). Alle Stämme wurden von ATCC, USA, bezogen und quantifiziert, mit Ausnahme des *C. difficile*-Stamms CCUG 8864 (Toxintyp X, A-/B+, der freundlicherweise von Thermo-Fisher Diagnostics zur Verfügung gestellt wurde). Alle getesteten Stämme wurden dem negativen geklärten Stuhl nahe der Nachweisgrenze hinzugefügt und mit dem **C. difficile ELITE MGB Kit** in Verbindung mit dem NucliSENS® easyMAG® System getestet. Alle Stämme wurden positiv getestet.

**Tabelle 56**

| ATCC     | Stamm      | Isoliert                         | Toxin A / B | Toxintyp | PCR Ribotyp |
|----------|------------|----------------------------------|-------------|----------|-------------|
| 9689     | 90556-M6S  | (Stammtyp)                       | A+B+        | 0        | 001         |
| 17857    | 870, N4    | Unbekannt                        | A+B+        | 0        | 001         |
| 43255    | VPI 10463  | Bauchwunde                       | A+B+        | 0        | 087         |
| 43594    | W1194      | Humaner Stuhl, Belgien           | A+B+        | 0        | 005         |
| 43596    | 545        | Humaner Stuhl, Belgien           | A+B+        | 0        | 012         |
| 43597    | Unbekannt  | Humaner Stuhl, Belgien           | A+B+        | 0        | 014         |
| 43598    | 1470 (F)   | Humaner Stuhl, Belgien           | A–B+        | VIII     | 017         |
| 43599    | 2022       | Humaner Stuhl, Belgien           | A+B+        | 0        | 001         |
| 43600    | 2149       | Humaner Stuhl, Belgien           | A+B+        | 0        | 014         |
| 51695    | BDMS 18 AN | Unbekannt                        | A+B+        | 0        | 001         |
| 700792   | 14797-2    | Michigan, Weiblicher Stuhl, 1977 | A+B+        | 0        | 005         |
| BAA-1382 | 630        | Klinisches Isolat, Schweiz, 1982 | A+B+        | 0        | 012         |

**Tabelle 56 (continued)**

| ATCC     | Stamm       | Isoliert                                               | Toxin A / B | Toxinotyp | PCR Ribotyp |
|----------|-------------|--------------------------------------------------------|-------------|-----------|-------------|
| BAA-1803 | Unbekannt   | Quest, klinisches Isolat                               | A+B+        | IIIc      | 027         |
| BAA-1804 | Unbekannt   | Quest, klinisches Isolat                               | A+B+        | 0         | 053         |
| BAA-1805 | Unbekannt   | Quest, klinisches Isolat                               | A+B+        | IIIb      | 027         |
| BAA-1806 | Unbekannt   | Quest, klinisches Isolat                               | A+B+        | 0         | 220         |
| BAA-1808 | Unbekannt   | Quest, klinisches Isolat                               | A+B+        | 0         | 020         |
| BAA-1811 | Unbekannt   | Quest, klinisches Isolat                               | A+B+        | 0         | 057         |
| BAA-1812 | Unbekannt   | Quest, klinisches Isolat                               | A+B+        | XII       | 024         |
| BAA-1813 | Unbekannt   | Quest, klinisches Isolat                               | A+B+        | 0         | 002         |
| BAA-1814 | Unbekannt   | Quest, klinisches Isolat                               | A+B+        | XXII      | 251         |
| BAA-1870 | 4118        | Human, Maine, 2004 (hypervirulenter Stamm NAP1/BI/027) | A+B+        | IIIb      | 027         |
| BAA-1871 | 4111        | Human, New Jersey                                      | A+B+        | 0         | 001         |
| BAA-1872 | 4206        | Human, Maine                                           | A+B+        | 0         | 207         |
| BAA-1873 | 5283        | Human, New York                                        | A+B+        | 0         | 053         |
| BAA-1874 | 4205        | Human, Oregon                                          | A+B+        | 0         | 002         |
| BAA-1875 | 5325        | Human, Georgia                                         | A+B+        | V         | 078         |
| BAA-2155 | LBM 0801058 | Humaner Stuhl, Albuquerque, NM, USA                    | A+B+        | XXII      | 251         |
| BAA-2156 | LBM 0801040 | Humaner Stuhl, Cambridge, UK 2007                      | A+B+        | 0         | 118         |
| -        | CCUG 8864   | Prof. M. Delmee, C. U. Louvain, Brüssel                | A-B+        | X         | 036         |

#### 15.2.4 Kreuzreaktivität und Interferenz

Die analytische Spezifität des **C. difficile ELITE MGB Kit** wurde auf Kreuzreaktivität untersucht, indem nicht-toxigenes *C. difficile*, phylogenetisch mit *C. difficile* verwandte Arten und andere pathogene, in der normalen gastrointestinalen Mikroflora häufig vorkommende Mikroorganismen getestet wurden. Bei den getesteten Arten handelte es sich um bakterielle und mykotische Mikroorganismen (wenn möglich in Konzentrationen von  $1 \times 10^6$  koloniebildenden Einheiten (KbE) getestet), virale und intrazelluläre Parasiten (in Konzentrationen von  $1 \times 10^5$  plaquebildenden Einheiten (PbE) oder einschlussbildenden Einheiten (EbE) getestet). Auch humane genomische DNA wurde getestet (bei  $1 \times 10^6$  Zellen). Alle Organismen (130), die mit dem **C. difficile ELITE MGB Kit** in Verbindung mit dem NucliSENS® easyMAG® System getestet wurden, ergaben keine Kreuzreaktivität, mit Ausnahme von *Clostridium nexile*, das mit der Amplifikationsreaktion für das Toxin-B-Gen kreuzreagierte.

*C. nexile* wurde in etwa 3 % der untersuchten klinischen Proben beobachtet. *C. nexile* exprimiert kein Toxin B, es besteht jedoch eine ausreichende Sequenzhomologie, um ein Signal im Assay zu erzeugen. Die analytische Spezifität betrug insgesamt 99 % (129/130).

Die analytische Spezifität des **C. difficile ELITE MGB Kit** wurde zudem auf mikrobielle Interferenzen untersucht, indem die gleichen Arten getestet wurden, die auch für die Kreuzreaktivität verwendet wurden. Die Mikroorganismen wurden wie oben bei den Kreuzreaktivitätstests beschrieben getestet, aber auch einzeln mit zwei verschiedenen toxigenen *C. difficile*-Stämmen (ATCC 43255, Stamm VPI 10463, Toxinotyp 0 oder ATCC BAA-1870, Stamm 4118, Toxinotyp III) nahe der Nachweisgrenze dotiert. Alle Organismen, die mit dem **C. difficile ELITE MGB Kit** in Verbindung mit dem NucliSENS® easyMAG® System getestet wurden, führten zu keiner mikrobiellen Interferenz.

Tabelle 57

| Gattungen und Arten                           | Art.-Nr. | Anbieter    | Menge               | Interferenzen? |
|-----------------------------------------------|----------|-------------|---------------------|----------------|
| <i>Abiotrophia defectiva</i>                  | 49176    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>                | 19606    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Acinetobacter lwoffii</i>                  | 15309    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>                   | 7966     | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Alcaligenes faecalis subsp. faecalis</i>   | 15554    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Anaerococcus tetradius</i>                 | 35098    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Bacillus cereus</i>                        | 13472    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Bacteroides caccae</i>                     | 43185    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Bacteroides merdae</i>                     | 43184    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Bacteroides stercoris</i>                  | 43183    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i>           | 15703    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Bifidobacterium longum</i>                 | 15707    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Campylobacter coli</i>                     | BAA-370  | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i>     | 33292    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Candida albicans</i>                       | 10231    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Cedecea davisae</i>                        | 33431    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Chlamydia trachomatis</i>                  | 8017775  | Zeptomatrix | 1×10 <sup>5</sup>   | Nein           |
| <i>Citrobacter amalonaticus</i>               | 25405    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Citrobacter freundii</i>                   | 8090     | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Citrobacter koseri</i>                     | 27028    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Citrobacter sedlakii</i>                   | 51115    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Clostridium beijerinckii</i>               | 8260     | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Clostridium bifermentans</i>               | 638      | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Clostridium bolteae</i>                    | BAA-613  | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Clostridium butyricum</i>                  | 19398    | ATCC        | 1,5×10 <sup>5</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium chauvoei</i>                   | 11957    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Clostridium difficile</i> ( nicht-toxigen) | 43593    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Clostridium difficile</i> ( nicht-toxigen) | 43601    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Clostridium difficile</i> ( nicht-toxigen) | 43602    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Clostridium difficile</i> ( nicht-toxigen) | 43603    | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Clostridium difficile</i> ( nicht-toxigen) | 700057   | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Clostridium difficile</i> ( nicht-toxigen) | BAA-1801 | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |
| <i>Clostridium difficile</i> ( nicht-toxigen) | BAA-1807 | ATCC        | 1×10 <sup>6</sup>   | Nein           |

Tabelle 57 (continued)

| Gattungen und Arten                               | Art.-Nr. | Anbieter                  | Menge             | Interferenzen? |
|---------------------------------------------------|----------|---------------------------|-------------------|----------------|
| <i>Clostridium difficile</i> (nicht-toxigen)      | BAA-1809 | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium difficile</i> (nicht-toxigen)      | BAA-1810 | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium difficile</i> Toxinotyp Xla, A-/B- | R11402   | Thermo-Fisher Diagnostics | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium difficile</i> Toxinotyp Xlb, A-/B- | IS58     | Thermo-Fisher Diagnostics | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium fallax</i>                         | 19400    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium haemolyticum</i>                   | 9650     | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium histolyticum</i>                   | 19401    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium innocuum</i>                       | 14501    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium methylpentosum</i>                 | 43829    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium nexile</i>                         | 27757    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Ja             |
| <i>Clostridium novyi</i>                          | 19402    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium paraputrificum</i>                 | 25780    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium perfringens</i>                    | 13124    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium ramosum</i>                        | 25582    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium scindens</i>                       | 35704    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium septicum</i>                       | 12464    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium sordellii</i>                      | 9714     | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium sphenoides</i>                     | 19403    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium spiroforme</i>                     | 29899    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium sporogenes</i>                     | 15579    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium symbiosum</i>                      | 14940    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium tertium</i>                        | 14573    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Clostridium tetani</i>                         | 19406    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Collinsella aerofaciens</i>                    | 25986    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Corynebacterium genitalium</i>                 | 33798    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Desulfovibrio piger</i>                        | 29098    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Edwardsiella tarda</i>                         | 15947    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Eggerthella lenta</i>                          | 25559    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>                     | 51697    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Enterobacter cloacae</i>                       | 13047    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Enterococcus casseliflavus</i> (vanC2)         | 25788    | ATCC                      | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |

Tabelle 57 (continued)

| Gattungen und Arten                            | Art.-Nr. | Anbieter                                     | Menge             | Interferenzen? |
|------------------------------------------------|----------|----------------------------------------------|-------------------|----------------|
| <i>Enterococcus cecorum</i>                    | 43198    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Enterococcus dispar</i>                     | 51266    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (vanB)            | 51299    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Enterococcus faecium</i> (vanA)             | 700221   | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Enterococcus gallinarum</i> (vanC)          | 700425   | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Enterococcus hirae</i>                      | 10541    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Enterococcus raffinosus</i>                 | 49427    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Escherichia coli</i>                        | 35218    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Escherichia fergusonii</i>                  | 35469    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Escherichia hermannii</i>                   | 33650    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Flavonifractor plautii</i>                  | 49531    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Fusobacterium varium</i>                    | 8501     | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Gardnerella vaginalis</i>                   | 14019    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Gemella morbillorum</i>                     | 27824    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Hafnia alvei</i>                            | 13337    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Helicobacter fennelliae</i>                 | 35683    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Helicobacter pylori</i>                     | 43504    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| Homo sapiens, Humane Zellen                    | -        | Seattle Children Hospital Research Institute | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>                      | 8724     | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae | 13883    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i>               | 4356     | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Lactobacillus reuteri</i>                   | 23272    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Lactococcus lactis</i>                      | 11454    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Leminorela grimontii</i>                    | 33999    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Listeria grayi</i>                          | 19120    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Listeria innocua</i>                        | 33090    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Listeria monocytogenes</i>                  | 13932    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>           | 27337    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Plesiomonas shigelloides</i>                | 14029    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Porphyromonas asaccharolytica</i>           | 25260    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |
| <i>Prevotella melaninogenica</i>               | 25845    | ATCC                                         | 1×10 <sup>6</sup> | Nein           |

Tabelle 57 (continued)

| Gattungen und Arten                          | Art.-Nr. | Anbieter | Menge                | Interferenzen? |
|----------------------------------------------|----------|----------|----------------------|----------------|
| <i>Proteus mirabilis</i>                     | 12453    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Proteus penneri</i>                       | 35198    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Providencia alcalifaciens</i>             | 9886     | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Providencia rettgeri</i>                  | 9250     | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Providencia stuartii</i>                  | 33672    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                | 27853    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Ruminococcus bromii</i>                   | 27255    | ATCC     | 1,75×10 <sup>5</sup> | Nein           |
| <i>Salmonella choleraesuis</i> (typhimurium) | 14028    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. Arizonae   | 13314    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. Enterica   | 700720   | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Serratia liquefaciens</i>                 | 27592    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Serratia marcescens</i>                   | 274      | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Shigella boydii</i>                       | 9207     | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Shigella dysenteriae</i>                  | 11835    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Shigella sonnei</i>                       | 25931    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                 | BAA-1556 | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>            | 12228    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>          | 13637    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>              | 12973    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i>            | 43078    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Streptococcus intermedius</i>             | 27335    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Streptococcus uberis</i>                  | 19436    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Trabulsiella guamensis</i>                | 49490    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Veillonella parvula</i>                   | 10790    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Vibrio cholerae</i>                       | 25870    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i>               | 17802    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Yersinia bercovieri</i>                   | 43970    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| <i>Yersinia rohdei</i>                       | 43380    | ATCC     | 1×10 <sup>6</sup>    | Nein           |
| Adenovirus                                   | VR-1516  | ATCC     | 1×10 <sup>5</sup>    | Nein           |
| Coxsackievirus                               | VR-28    | ATCC     | 1×10 <sup>5</sup>    | Nein           |
| Cytomegalovirus                              | VR-1590  | ATCC     | 1×10 <sup>5</sup>    | Nein           |
| Echovirus                                    | VR-41    | ATCC     | 1×10 <sup>5</sup>    | Nein           |

**Tabelle 57 (continued)**

| Gattungen und Arten | Art.-Nr.  | Anbieter    | Menge             | Interferenzen? |
|---------------------|-----------|-------------|-------------------|----------------|
| Enterovirus         | VR-836    | ATCC        | 1×10 <sup>5</sup> | Nein           |
| Norovirus Typ I     | 0810086CF | ZeptoMetrix | 1×10 <sup>5</sup> | Nein           |
| Rotavirus           | VR-2018   | ATCC        | 1×10 <sup>5</sup> | Nein           |

**15.2.5 Vergleichspräzision**

Ein aus 7 Mitgliedern bestehendes Panel mit einer negativen geklärten Stuhlprobe und unterschiedlichen Konzentrationen zweier toxischer *C. difficile*-Stämme (ATCC 43255 und BAA-1870), wurde in drei Wiederholungen von zwei Bedienern getestet. Für jeden *C. difficile*-Stamm umfasste das Panel eine Probe unterhalb der Nachweisgrenze (LoD) (erwartete Positivitätsrate zwischen 20 und 80 %), eine niedrig positive Probe (bei LoD, erwartete Positivitätsrate von 95 %) und eine moderat positive Probe (dreifache LoD, erwartete Positivitätsrate von 100 %). Jeder der beiden Bediener führte 12 Tage lang einen Lauf pro Tag mit drei Reagenzienchargen an einem Standort durch (7 Proben × 3 Wiederholungen × 12 Tage × 2 Läufe). Zum Testen der einzelnen Proben wurde die Extraktion mit dem NucliSENS® easyMAG® System und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Das negative Panelmitglied lieferte zu 100 % negative Ergebnisse, die Positivitätsrate der Proben unter LoD lag bei 78 %, die Positivitätsrate der Proben mit niedrigem LoD bei 98 % und die Positivitätsrate der Panelmitglieder mit mittlerem LoD bei 100 %.

**Tabelle 58 Vergleichspräzision von Tag zu Tag**

| Probentyp            | Tag 1 | Tag 2 | Tag 3 | Tag 4 | Tag 5 | Tag 6 | Tag 7 | Tag 8 | Tag 9 | Tag 10 | Tag 11 | Tag 12 | Gesamte Übereinstimmung in % |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|------------------------------|
| Negativ              | 6/6   | 6/6   | 6/6   | 6/6   | 6/6   | 6/6   | 6/6   | 6/6   | 6/6   | 6/6    | 6/6    | 6/6    | 72/72 (100 %)                |
| Unter Nachweisgrenze | 6/12  | 12/12 | 8/12  | 10/12 | 7/12  | 7/12  | 11/12 | 10/12 | 12/12 | 9/12   | 11/12  | 10/12  | 113/144 (78 %)               |
| Niedrig positiv      | 10/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12 | 11/12  | 12/12  | 12/12  | 141/144 (98 %)               |
| Moderat positiv      | 12/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12 | 12/12  | 12/12  | 12/12  | 144/144 (100 %)              |

**Tabelle 59 Vergleichspräzision von Charge zu Charge**

| Probentyp            | Charge 1 | Charge 2 | Charge 3 | Gesamte Übereinstimmung in % |
|----------------------|----------|----------|----------|------------------------------|
| Negativ              | 30/30    | 27/27    | 15/15    | 72 / 72 (100 %)              |
| Unter Nachweisgrenze | 50/60    | 38/54    | 25/30    | 113 / 144 (78 %)             |
| Niedrig positiv      | 57/60    | 54/54    | 30/30    | 141 / 144 (98 %)             |
| Moderat positiv      | 60/60    | 54/54    | 30/30    | 144 / 144 (100 %)            |

### 15.2.6 Verschleppung / Kreuzkontamination

Zur Bewertung des Potenzials für eine Kreuzkontamination zwischen Proben mit einer hohen *C. difficile* ( $5 \times 10^8$  KbE/ml)-Konzentration und negativen Proben wurde mit dem **C. difficile ELITe MGB® Kit** in Verbindung mit NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux) und dem 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems) eine analytische Studie durchgeführt. Zwei Mitarbeiter führten fünf Läufe mit 24 Probenextraktionen (11 hochtitrige *C. difficile*-Proben, 11 negative Proben, 1 Positive-Control-Probe und 1 Negative-Control-Probe pro Lauf) in einem Schachbrettmuster durch (hochtitrige *C. difficile*-Proben unterbrochen von vollständig negativen Proben). Die verarbeiteten Proben wurden dann in fünf separaten Läufen amplifiziert, wobei mit zwei verschiedene Schachbrettmuster angewendet wurden. Die Kreuzkontaminationstests ergaben bei 55 *C. difficile*-negativen Proben kein falsch-positives Ergebnis.

#### HINWEIS!

Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Produkts durchgeführt wurden, sind in Abschnitt 7 der technischen Dokumentation „C. difficile ELITe MGB® Kit“, FTP M800358, aufgeführt.

## 16 REFERENZEN

Cloud J. and Kelly C. P. (2007) Cur. Opin. Gastroenterology 23: 4 - 9.

Cohen, S. H. et al. (1998) Clin. Infect. Diseases 26: 410 - 412.

Kuijper, E. J. et al. (2006) Clin. Microb. and Infection 12: 2 - 18.

Article about LoB and LoD statistics: K. Linnet and M. Kondratovich (2004) Clin. Chem. 50: 732 - 740.

CLSI EP37, Ed1E: "Supplemental Tables for interference Testing in Clinical Chemistry"

## 17 GRENZEN DES VERFAHRENS

Dieses Produkt darf nur mit den folgenden klinischen Proben verwendet werden: ungeformte oder flüssige humane Stuhlproben.

Die mit diesem Produkt erhaltenen Ergebnisse hängen von der ordnungsgemäßen Durchführung von Identifizierung, Entnahme, Transport, Lagerung und Verarbeitung der Proben ab. Zur Vermeidung falscher Ergebnisse ist es daher notwendig, bei diesen Schritten sorgfältig vorzugehen und die dem Produkt beiliegende Gebrauchsanweisung sorgfältig zu befolgen.

Aufgrund ihrer hohen analytischen Sensitivität ist die bei diesem Produkt verwendete Real-Time-PCR-Methode empfindlich für Kontaminationen durch positive klinische Proben, Positivkontrollen und PCR-Produkte. Kreuzkontamination führt zu falsch-positiven Ergebnissen. Das Produktformat ist so gestaltet, dass Kreuzkontamination begrenzt wird. Trotzdem kann Kreuzkontamination nur durch Beachtung der guten Laborpraxis und der vorliegenden Gebrauchsanweisung vermieden werden.

Dieses Produkt darf nur von qualifiziertem Personal, das im Umgang mit potenziell infektiösen biologischen Proben und als gefährlich klassifizierten chemischen Präparaten geschult ist, verwendet werden. Dadurch sollen Unfälle mit möglicherweise ernsten Folgen für den Anwender und andere Personen vermieden werden.

Die Verwendung dieses Produkts erfordert persönliche Schutzausrüstung und Arbeitsbereiche, die für den Umgang mit potenziell infektiösen biologischen Proben und als gefährlich klassifizierten chemischen Präparaten geeignet sind, um Unfälle mit möglicherweise ernsten Folgen für den Anwender und andere Personen zu vermeiden.

Dieses Produkt macht das Tragen von persönlicher Schutzausrüstung und das Verwenden von für die Einrichtung des Arbeitslaufs vorgesehenen Instrumente erforderlich, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Zur Vermeidung falscher Ergebnisse darf dieses Produkt nur von professionellem, qualifiziertem Personal, das im Umgang mit molekularbiologischen Techniken, wie Extraktion, PCR und Nachweis von Nukleinsäuren geschult ist, verwendet werden.

Eine räumliche Trennung von Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten ist zu beachten, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Für die Verwendung des Produkts werden Spezialkleidung und Instrumente für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten benötigt, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Vor einer Umstellung auf eine neue Technologie sollten die Anwender aufgrund von inhärenten Unterschieden zwischen verschiedenen Technologien Korrelationsstudien zu den Methoden durchführen, um die Unterschiede zwischen den Technologien abschätzen zu können.

Ein mit diesem Produkt erzieltetes positives Ergebnis weist nicht auf das Vorhandensein von lebensfähigem toxischem *C. difficile* hin, sondern lässt das Vorhandensein von toxischem *C. difficile* vermuten. Daher bedeutet ein positives Ergebnis nicht unbedingt, dass die Eradikation fehlgeschlagen ist, da nicht lebensfähige DNA vorhanden sein kann.

Ein mit diesem Produkt erhaltenes negatives Ergebnis gibt an, dass die Toxin-A- oder Toxin-B-Gen-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachgewiesen wurde. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Titer der toxischen *C. difficile*-DNA unter der Nachweisgrenze des Produkts liegt (siehe „Leistungsmerkmale“). In diesem Fall kann das Ergebnis falsch-negativ sein.

Bei Koinfektionen kann die Sensitivität für eine Zielsequenz durch die Amplifikation einer zweiten Zielsequenz (siehe „Leistungsmerkmale“) beeinträchtigt werden.

Mit diesem Produkt erhaltene Ergebnisse können manchmal aufgrund von Ausfällen der internen Kontrolle ungültig sein. In diesem Fall ist die Probe beginnend mit der Extraktion erneut zu testen, was zu einer Verzögerung der endgültigen Testergebnisse führen kann.

Etwaige Polymorphismen, Insertionen oder Deletionen in der Primer- oder Sondenbindungsregion der Ziel-DNA können den Nachweis der Ziel-DNA beeinträchtigen.

Wie bei allen anderen diagnostischen Produkten müssen die mit diesem Produkt erhaltenen Ergebnisse in Kombination mit allen relevanten klinischen Beobachtungen und Laborbefunden interpretiert werden.

Wie bei allen diagnostischen Produkten besteht auch bei diesem Produkt ein Restrisiko von ungültigen oder fehlerhaften Ergebnissen. Dieses Restrisiko kann nicht eliminiert oder weiter minimiert werden. In manchen Fällen kann dieses Restrisiko zu falschen Entscheidungen mit potenziell gefährlichen Auswirkungen auf den Patienten beitragen. Dieses Restrisiko im Zusammenhang mit dem Verwendungszweck des Produkts wurde jedoch gegen den potenziellen Nutzen für den Patienten abgewogen und als akzeptabel eingestuft.

## 18 FEHLERBEHEBUNG

### ELITe InGenius und ELITe BeGenius

**Tabelle 60**

| Ungültige Positive Control-Reaktion |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mögliche Ursachen                   | Abhilfemaßnahmen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Einstellfehler des Geräts.          | Position von PCR Mix und Positive Control kontrollieren.<br>Volumina von PCR Mix und Positive Control kontrollieren.                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Abbau des PCR Mix.                  | Den PCR Mix nicht für mehr als 5 unabhängige Läufe verwenden (jeweils 3 Stunden im gekühlten Reagenzienblock oder in der Cooler Unit).<br>Den PCR Mix nicht für mehr als 5 aufeinander folgende Läufe verwenden (im gekühlten Reagenzienblock oder in der Cooler Unit).<br>Den PCR Mix nicht länger als 30 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahren.<br>Ein neues Aliquot des PCR Mix verwenden. |
| Abbau des Positive Control.         | Die Positive Control nicht für mehr als 4 unabhängige Läufe verwenden (jeweils 3 Stunden im Extraktionsbereich oder in der Cooler Unit).<br>Ein neues Aliquot des Positive Control verwenden.                                                                                                                                                                                                  |
| Gerätefehler.                       | Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

**Tabelle 61**

| <b>Ungültige Reaktion der Negativkontrolle</b>                                              |                                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Mögliche Ursachen</b>                                                                    | <b>Abhilfemaßnahmen</b>                                                                                                               |
| Einstellfehler des Geräts.                                                                  | Position von PCR Mix und Negative Control kontrollieren.<br>Volumina von PCR Mix und Negative Control kontrollieren.                  |
| Kontamination der Negative Control.                                                         | Die Negative Control nicht für mehr als 1 Lauf verwenden.<br>Ein neues Aliquot hochreines Wasser für die Molekularbiologie verwenden. |
| Kontamination der PCR Mix.                                                                  | Ein neues Aliquot des PCR Mix verwenden.                                                                                              |
| Kontamination des Extraktionsbereichs, der Racks, des Bestandsmanager oder der Cooler Unit. | Oberflächen mit wässrigen Reinigungsmitteln reinigen, Laborkittel waschen, verwendete Röhrchen und Spitzen austauschen.               |
| Gerätefehler.                                                                               | Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.                                                                               |

**Tabelle 62**

| <b>Ungültige Probenreaktion</b>               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Mögliche Ursachen</b>                      | <b>Abhilfemaßnahmen</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Einstellfehler des Geräts.                    | Position von PCR Mix, Internal Control und Probe kontrollieren.<br>Volumina von PCR Mix, Internal Control und Probe kontrollieren.                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Abbau des PCR Mix.                            | Den PCR Mix nicht für mehr als 5 unabhängige Läufe verwenden (jeweils 3 Stunden im Inventory Area (Inventarbereich) oder in der Cooler Unit).<br>Den PCR Mix nicht für mehr als 5 aufeinander folgende Läufe verwenden (im gekühlten Reagenzienblock oder in der Cooler Unit).<br>Den PCR Mix nicht länger als 30 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahren.<br>Ein neues Aliquot des PCR Mix verwenden. |
| Abbau der Vorlage für die Internal Control.   | Ein neues Aliquot der Internal Control verwenden.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Inhibition durch Störsubstanzen in der Probe. | Amplifikation der eluierten Probe mit einer 1:2-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „PCR Only“-Lauf (nur PCR) wiederholen.<br>Extraktion mit einer 1:2-Verdünnung der Probe in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „Extract + PCR“-Lauf (Extraktion + PCR) wiederholen.                                                                               |
| Gerätefehler.                                 | Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

**Tabelle 63**

| <b>Anomale Dissoziationskurve</b>                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Mögliche Ursachen</b>                                                                                                                                 | <b>Abhilfemaßnahmen</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Fehlen eines definierten Peaks.<br>Definierter Peak, T <sub>m</sub> -Wert unterscheidet sich jedoch von dem der anderen Proben und der Positive Control. | Kontrollieren, ob der Ct-Zielwert unter 30 liegt.<br>Große Menge an Amplifikationsprodukt am Ende der Reaktion kann die Schmelzkurvenanalyse beeinträchtigen.<br>Die Probenamplifikation wiederholen, um das Vorhandensein von Ziel-DNA mit einer möglichen Mutation zu bestätigen.<br>Die Ziel-DNA in der Probe sollte sequenziert werden, um die Mutation zu bestätigen. |

**Tabelle 64**

| <b>Fehler bei der Berechnung des Ct-Werts</b>                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Mögliche Ursachen</b>                                                                   | <b>Abhilfemaßnahmen</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Zu hohe Konzentration von Ziel-DNA in der Probe oder Probe mit anomalem Fluoreszenzsignal. | <p>Wenn im PCR-Diagramm eine signifikante Amplifikation zu beobachten ist, entsprechende Spur für die Probe auswählen und Ergebnis manuell als positiv bestätigen.</p> <p>Wenn im PCR-Diagramm keine Amplifikation zu beobachten ist, entsprechende Spur für die Probe auswählen und Ergebnis manuell als negativ bestätigen oder als ungültig belassen.</p> <p>Wenn ein Ct-Wert benötigt wird:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Amplifikation der eluierten Probe mit einer 1:10-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „PCR Only“-Lauf (nur PCR) wiederholen.</li> <li>- Extraktion der Probe mit einer 1:10-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „Extract + PCR“-Lauf (Extraktion + PCR) wiederholen.</li> </ul> |

**Tabelle 65**

| <b>Ungewöhnlich hoher Anteil positiver Ergebnisse innerhalb ein und desselben Laufs (Reaktionen mit ähnlich späten Ct-Werten)</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Mögliche Ursachen</b>                                                                                                          | <b>Abhilfemaßnahmen</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Kontamination von Probe zu Probe bei Präanalyseschritten.                                                                         | <p>Mikropipette nach dem Pipettieren jeder Probe mit frischer 3%iger Natriumhypochloritlösung (Bleiche) oder DNA/RNA-Cleaner reinigen.</p> <p>Keine Pasteur-Pipetten verwenden. Die Pipetten müssen entweder Direktverdrängungspipetten sein oder zusammen mit Aerosolfilterspitzen verwendet werden.</p> <p>Proben in die letzten Positionen der Geräte einsetzen, wie auf der Benutzeroberfläche angegeben. Die von der Software angegebene Ladefolge beachten.</p> |
| Kontamination der Laborumgebung.                                                                                                  | <p>Alle Oberflächen, die mit dem Bediener und den Proben (einschließlich Pipetten) in Kontakt kommen, mit frischer 3% iger Natriumhypochloritlösung (Bleiche) oder DNA/RNA-Cleaner reinigen.</p> <p>Einen UV-Dekontaminationszyklus durchführen.</p> <p>Ein neues Röhrchen mit PCR Mix und/oder KbE verwenden.</p>                                                                                                                                                    |

**Offene Plattform:****Tabelle 66**

| <b>Ziel-DNA in der Reaktion der Positive Control nicht erkannt</b> |                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Mögliche Ursachen</b>                                           | <b>Abhilfemaßnahmen</b>                                                                                                                                                                                                                                   |
| Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.    | <p>Beim Dispensieren von Reaktionen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen.</p> <p>Volumina des dispensierten PCR Mix überprüfen.</p> <p>Volumina der dispensierten Positivkontrolle überprüfen.</p> |
| Abbau des PCR Mix.                                                 | Ein neues Aliquot mit PCR Mix verwenden.                                                                                                                                                                                                                  |
| Abbau des Positive Control.                                        | Ein neues Aliquot des Positive Control verwenden.                                                                                                                                                                                                         |
| Einstellfehler des Geräts.                                         | <p>Positionseinstellungen für die Positive Control-Reaktion des Geräts überprüfen.</p> <p>Temperaturzyklus-Einstellungen des Geräts überprüfen.</p>                                                                                                       |

Tabelle 67

| Ziel-DNA in der Reaktion der Negative Control erkannt                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mögliche Ursachen                                                                         | Abhilfemaßnahmen                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.                           | Verschütten des Inhalts des Proben-Teströhrchens vermeiden. Zwischen einer Probe und der nächsten immer die Spitzen wechseln.<br>Beim Dispensieren von Proben, Negative Controls, Positive Controls in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen. |
| Fehler beim Einstellen des Geräts.                                                        | Positionseinstellungen für Proben, Negative Controls und Positive Controls auf dem Gerät überprüfen.                                                                                                                                                                                             |
| Mikrotiterplatte schlecht versiegelt.                                                     | Beim Versiegeln der Mikrotiterplatte vorsichtig vorgehen.                                                                                                                                                                                                                                        |
| Kontamination des hochreinen Wassers für die Molekularbiologie.                           | Ein neues Aliquot sterilen Wassers verwenden.                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Kontamination des PCR Mix.                                                                | Ein neues Aliquot mit PCR Mix verwenden.                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Kontamination des Bereichs für die Extraktion/ Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen. | Oberflächen und Geräte mit wässrigen Reinigungsmitteln reinigen, Laborkittel waschen, verwendete Teströhrchen und Spitzen austauschen.                                                                                                                                                           |

Tabelle 68

| Unregelmäßige oder hohe Hintergrundfluoreszenz in den Reaktionen |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mögliche Ursachen                                                | Abhilfemaßnahmen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Falsches Dispensieren oder unzureichendes Mischen der Probe.     | Beim Einmischen von Proben, Negative Controls und Positive Controls in das Reaktionsgemisch vorsichtig vorgehen und dabei dreimal pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Einstellfehler der Grundlinie.                                   | Bereich für die Grundlinienberechnung innerhalb von Zyklen einstellen, in denen sich die Hintergrundfluoreszenz bereits stabilisiert hat (die Daten unter „Results“ (Ergebnisse), „Component“ (Komponente) überprüfen) und die Zunahme des Fluoreszenzsignals noch nicht begonnen hat, z. B. von Zyklus 6 auf Zyklus 15.<br>Die automatische Grundlinienberechnung durch Aktivieren der Option „Auto Baseline“ verwenden. |

Tabelle 69

| Anomale Dissoziationskurve                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mögliche Ursachen                                                                                                                       | Abhilfemaßnahmen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Fehlen eines definierten Peaks.<br>Definierter Peak, der sich jedoch von dem der anderen Proben und der Positive Control unterscheidet. | Kontrollieren, ob der Ct-Wert des FAM-Detektors unter 30 liegt.<br>Große Menge an Amplifikationsprodukt am Ende der Reaktion kann die Schmelzkurvenanalyse beeinträchtigen.<br>Die Probenamplifikation wiederholen, um das Vorhandensein von Ziel-DNA mit einer möglichen Mutation zu bestätigen.<br>Die Ziel-DNA der Probe sollte sequenziert werden, um die Mutation zu bestätigen. |

## 19 SYMBOLE



Katalognummer.



Temperaturobergrenze.



Chargenbezeichnung.



Verfallsdatum (letzter Tag des Monats).



*In-vitro*-Diagnostikum.



Erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79/EG über *In-vitro*-Diagnostika.



Unique Device Identification, eindeutige Gerätekennung



Ausreichend für „N“ Tests



Gebrauchsanweisung beachten.



Inhalt.



Vor Sonneneinstrahlung schützen.



Hersteller.

## 20 ANWENDERHINWEISE

Jeder schwerwiegende Zwischenfall, der im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten ist, muss dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedsstaates, in dem der Anwender und/oder der Patient ansässig ist, gemeldet werden. Um den Hersteller dieses Geräts zu informieren, verwenden Sie bitte die folgende E-Mail-Adresse: [egspa.vigilance@elitechgroup.com](mailto:egspa.vigilance@elitechgroup.com).

## 21 HINWEIS FÜR DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ

Dieses Produkt enthält Reagenzien, die von Thermo Fisher Scientific hergestellt wurden und im Rahmen von Lizenzvereinbarungen zwischen ELITechGroup S. p. A. und deren Tochtergesellschaften und Thermo Fisher Scientific vertrieben werden. Im Kaufpreis dieses Produkts eingeschlossen sind eingeschränkte, nicht übertragbare Rechte zum Gebrauch nur dieser Produktmenge ausschließlich für Aktivitäten des Käufers mit direktem humandiagnostischem Bezug. Informationen zum Kauf einer Lizenz für dieses Produkt zu anderen als den oben genannten Zwecken sind erhältlich bei Licensing Department, Thermo Fisher Scientific. E-Mail: [outlicensing@thermofisher.com](mailto:outlicensing@thermofisher.com).

ELITe MGB® Nachweisreagenzien sind durch eines oder mehrere der US-Patente mit den Nummern 7319022, 7348146, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8163910, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 und der EP-Patente mit den Nummern 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 sowie durch anhängige Patentanmeldungen geschützt.

Die ELITe InGenius®- und die ELITe BeGenius®-Technologie sind durch Patente und Patentanmeldungen geschützt.

Diese eingeschränkte Lizenz erlaubt der Person oder Einrichtung, der das Produkt zur Verfügung gestellt wurde, das Produkt und die bei Verwendung des Produkts erzeugten Daten ausschließlich für die Humandiagnostik zu verwenden. Weder die ELITechGroup S. p. A. noch deren Lizenzgeber gewähren weitere, ausdrückliche oder stillschweigende Lizenzen für andere Zwecke.

## Appendix A C. difficile ELITE MGB Kit zur Verwendung mit Plattformen der Genius-Reihe®



### VORSICHT

Dieses Dokument ist eine vereinfachte Version der offiziellen Gebrauchsanweisung. Bitte lesen Sie vor dem Gebrauch das vollständige Dokument: [www.elitechgroup.com](http://www.elitechgroup.com)

### Verwendungszweck

Das Produkt **C. difficile ELITE MGB® Kit** ist ein In-vitro-Diagnostikum, das für die Anwendung durch medizinisches Fachpersonal als qualitativer Multiplex-Nukleinsäure-Echtzeit-PCR-Assay für den **Nachweis des Toxin-A-Gens und Toxin B-Gens von toxischem Clostridium difficile** (alias *Clostridioides difficile*, **C. difficile**), einschließlich des hypervirulenten epidemischen NAP1/BI/027-Stamms, in DNA-Proben, die aus ungeformten oder flüssigen Stuhlproben extrahiert wurden, bestimmt ist.

Dieser Assay ist in Verbindung mit den Geräten **ELITE InGenius®** und **ELITE BeGenius®**, automatisierten und integrierten Systemen zur Extraktion, Real-Time-PCR und Ergebnisinterpretation mit humanen Stuhlproben validiert.

Der Assay ist außerdem in Verbindung mit dem **7500 Real-Time PCR System** für die Verwendung mit humanen Stuhlproben validiert.

Das Produkt ist in Kombination mit den klinischen Daten und weiteren Laborbefunden des Patienten zur Verwendung als Hilfsmittel bei der Diagnose von toxischen **C. difficile**-Infektionen im Gesundheitswesen bestimmt.

Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen alle relevanten klinischen Beobachtungen und Laborbefunde herangezogen werden.

### Amplifizierte Sequenz

| Sequenz       | Gen                                   | Fluorophor | Kanal   |
|---------------|---------------------------------------|------------|---------|
| Zielsequenz 1 | C. difficile Toxin-A-spezifisches Gen | AP525      | Toxin A |
| Zielsequenz 2 | C. difficile Toxin-B-spezifisches Gen | FAM        | Toxin B |
| Zielsequenz 3 | IC2                                   | AP642      | IC      |

### Validierte Matrix

- Nativer Stuhl, der ohne Konservierungsmittel gesammelt wurde

## Kit-Inhalt und zugehörige Produkte

| C. difficile ELITE MGB Kit<br>(M800358)                                                                                                                   |                  | C. difficile – ELITE Positive Control<br>(M800373)                                                                                                               |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
|  X 4                                                                     |                  |  X 2                                                                            |                  |
| <b>C. difficile-PCR Mix</b><br>4 Röhrchen mit 540 µl<br>24 Reaktionen pro Röhrchen<br>96 Reaktionen pro Kit<br>5 Einfrier- und Auftau-Zyklen pro Röhrchen |                  | <b>C. difficile Positive Control</b><br>2 Röhrchen mit 160 µl<br>4 Reaktionen pro Röhrchen<br>8 Reaktionen pro Kit<br>4 Einfrier- und Auftau-Zyklen pro Röhrchen |                  |
| Maximale Haltbarkeitsdauer:                                                                                                                               | <b>24 Monate</b> | Maximale Haltbarkeitsdauer                                                                                                                                       | <b>24 Monate</b> |
| Umgebungstemperatur bei Lagerung                                                                                                                          | <b>≤ -20°C</b>   | Umgebungstemperatur bei Lagerung                                                                                                                                 | <b>≤ -20°C</b>   |

## Weitere benötigte, nicht im Kit enthaltene Produkte

|                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>ELITE InGenius-Gerät: INT030.</li> <li>ELITE BeGenius-Gerät: INT040.</li> <li>ELITE InGenius SP 200: INT032SP200.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>CPE – Internal Control: CTCRCPE</li> <li>ELITE InGenius und ELITE BeGenius Verbrauchsmaterialien (siehe ELITE InGenius und ELITE BeGenius Gebrauchsanweisung)</li> </ul> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## ELITE InGenius- und ELITE BeGenius-Protokoll

|                                                                                                                        |                           |                                                                                                                                                   |                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Probenvolumen</li> <li>CPE-Volumen</li> <li>Gesamtes Elutionsvolumen</li> </ul> | 200 µl<br>10 µl<br>100 µl | <ul style="list-style-type: none"> <li>PCR-Eingangsvolumen für die Elution</li> <li>Volumen PCR-Mix</li> <li>Häufigkeit der Kontrollen</li> </ul> | 20 µl<br>20 µl<br>15 Tage |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|

## Leistungsdaten für ELITE InGenius und ELITE BeGenius

| Matrix        | Nachweisgrenze | Sensitivität     | Spezifität        |
|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| Nativer Stuhl | 500 KbE/ml     | 100 %<br>(30/30) | 97,8 %<br>(44/45) |

## Probenvorbereitung

Dieses Produkt ist für die Verwendung auf dem **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** mit den folgenden klinischen Proben, die gemäß den Laborrichtlinien identifiziert und unter den folgenden Bedingungen entnommen, transportiert und aufbewahrt wurden, bestimmt:

Tabelle 70

| Probe         | Anforderungen an die Entnahme       | Transport-/Lagerbedingungen      |              |             |             |
|---------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------------|-------------|-------------|
|               |                                     | +16 / +26 °C<br>(Raumtemperatur) | +2 – +8 °C*  | -20 ± 10 °C | -70 ± 15 °C |
| Nativer Stuhl | ohne Konservierungsmittel entnommen | ≤ 24 Stunden                     | ≤ 48 Stunden | ≤ 1 Monat   | > 1 Monat   |

## ELITe InGenius-Verfahren

Der Benutzer wird von der ELITe InGenius-Software zur Vorbereitung des Laufs Schritt für Schritt durch die grafische Benutzeroberfläche geführt. Alle Schritte: Extraktion, Real-Time-PCR und Ergebnisinterpretation werden automatisch durchgeführt. Es stehen zwei Betriebsmodi zur Verfügung: vollständiger Lauf „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) und „PCR Only“ (Nur PCR).

### Vor der Analyse

|                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1.</b> ELITe InGenius einschalten.<br>Mit dem Benutzernamen und Passwort anmelden.<br>Den Modus „ <b>CLOSED</b> “ (Geschlossen) wählen. | <b>2.</b> Kontrollen überprüfen: <b>Positive Control</b> sowie Negative Control im Menü „Controls“ (Kontrollen).<br>Hinweis: Beide müssen ausgeführt und genehmigt worden sein und dürfen nicht abgelaufen sein. | <b>3.</b> Den PCR Mix und die <b>CTRCPE</b> -Röhrchen auftauen.<br>Vorsichtig vortexen.<br>5 Sek. herunterzentrifugieren. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### Verfahren 1 – Vollständiger Lauf: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) (z. B. Proben)

|                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                      |                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1.</b> Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen                                                                                     | <b>2.</b> Die Extraktionsvolumina überprüfen: Eingang: „200 µL“, Elutionsvolumen: „100 µL“                                                           | <b>3.</b> Die Proben-Barcodes mit dem tragbaren Barcodeleser scannen oder die Proben-ID eingeben |
| <b>4.</b> Das gewünschte Assay-Protokoll auswählen: C.diff ELITe_ST_200_100                                                                                 | <b>5.</b> Die Methode „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) und die „Sample Position“ (Probenposition) auswählen: Extraction Tube (Extraktionsröhrchen) | <b>6.</b> Den PCR Mix und die Internal-Control in den Inventory Block (Bestandsmanager) laden    |
| <b>7.</b> Folgendes laden: PCR Cassette, Extraktionskartusche, Elution tube (Elutionsröhrchen), Spitzenkassette, Extraction Tube (Extraktionsröhrchen)-Rack | <b>8.</b> Tür schließen. Analyselauf starten                                                                                                         | <b>9.</b> Ergebnisse anzeigen, genehmigen und speichern                                          |

### HINWEIS!

Wird der Modus „Extract Only“ (nur Extraktion) benötigt, zum Verfahren das Benutzerhandbuch des Geräts beachten.

**Verfahren 2: „PCR Only“ (Nur PCR) (z. B. Eluate, Kontrollen)**

|                                                                                                                   |                                                                                                                            |                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen                                                  | 2. Die Extraktionsvolumina überprüfen: Eingang: „200 µL“, Elutionsvolumen: „100 µL“                                        | 3. Die Proben-Barcodes mit dem tragbaren Barcodeleser scannen oder die Proben-ID eingeben |
| 4. Das gewünschte Assay-Protokoll auswählen: C. diff ELITE_ST_200_100 oder C. diff ELITE_PC oder C. diff ELITE_NC | 5. Die Methode „PCR Only“ (Nur PCR) und die „Sample Position“ (Probenposition) „Elution Tube“ (Elutionsröhrchen) auswählen | 6. Den PCR Mix in den „Inventory Block“ (Bestandsmanager) laden                           |
| 7. Folgendes laden: PCR Cassette-Rack und Elution tube (Elutionsröhrchen)-Rack mit der extrahierten Nukleinsäure  | 8. Tür schließen. Analyselauf starten                                                                                      | 9. Ergebnisse anzeigen, genehmigen und speichern                                          |

**ELITE BeGenius-Verfahren**

Der Benutzer wird von der ELITE BeGenius-Software zur Vorbereitung des Laufs Schritt für Schritt durch die grafische Benutzeroberfläche geführt. Alle Schritte: Extraktion, Real-Time-PCR und Ergebnisinterpretation werden automatisch durchgeführt. Es stehen zwei Betriebsmodi zur Verfügung: vollständiger Lauf „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) und „PCR Only“ (Nur PCR).

**Vor der Analyse**

|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. ELITE BeGenius einschalten.<br>Mit dem Benutzernamen und Passwort anmelden.<br>Den Modus „CLOSED“ (Geschlossen) wählen. | 2. Kontrollen überprüfen: <b>Positive Control</b> sowie <b>Negative Control</b> im Menü „Controls“ (Kontrollen).<br>Hinweis: Beide müssen ausgeführt und genehmigt worden sein und dürfen nicht abgelaufen sein. | 3. <b>PCR Mix</b> und <b>CTRCPE</b> -Röhrchen auftauen.<br>Vorsichtig vortexen.<br>5 Sek. herunterzentrifugieren. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**Verfahren 1 – Vollständiger Lauf: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) (z. B. Proben)**

|                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Auf dem Touchscreen „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen und anschließend auf den Laufmodus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) klicken.                                                        | 2. Das Sample Rack (Probenständer) mit den barcodierten Proben in die Cooler Unit einsetzen. Der Barcode-Scan ist bereits aktiv                                                                     | 3. Die Extraktionsvolumina überprüfen: Eingang: „200 µL“, Elutionsvolumen: „100 µL“                                                    |
| 4. Das gewünschte Assay-Protokoll auswählen: C.diff ELITE_Be_ST_200_100<br><b>Hinweis:</b> Bei Durchführung einer zweiten Extraktion die Schritte 2 bis 4 wiederholen                                   | 5. Die Etiketten ausdrucken, um die leeren Elution Tubes (Elutionsröhrchen) mit einem Barcode zu versehen. Die Röhrchen in das Elution Rack (Elutionsablage) laden und in die Cooler Unit einsetzen | 6. Den PCR Mix und die Internal Control in das „Reagent/Elution Rack“ (Reagenz-/Elutionsablage) laden und in die Cooler Unit einsetzen |
| 7. Das „PCR Rack“ mit der „PCR Cassette“ und den „Extraction Basket“ (Korb) mit den „ELITE InGenius SP 200“ Extraktionskartuschen und die für die Extraktion erforderlichen Verbrauchsmaterialien laden | 8. Tür schließen. Analyselauf starten                                                                                                                                                               | 9. Ergebnisse anzeigen, genehmigen und speichern                                                                                       |

**HINWEIS!**

Wird der Modus „Extract Only“ (nur Extraktion) benötigt, zum Verfahren das Benutzerhandbuch des Geräts beachten.

**Verfahren 2: „PCR Only“ (Nur PCR) (z. B. Eluate, Kontrollen)**

|                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1.</b> Auf dem Touchscreen „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen und anschließend auf den Run mode „PCR Only“ (Nur PCR) klicken | <b>2.</b> Die barcodierten Röhrchen mit der extrahierten Nukleinsäure oder den Kontrollen in das Elution Rack (Elutionsablage) laden und in die Cooler Unit einsetzen | <b>3.</b> Bei Kontrollen: Für jede „Position“ unter „Reagent name“ den Reagenznamen, unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.<br>Bei Eluaten: Für jede „Position“ die Proben-ID („Sample ID“), die Probenmatrix („Sample Matrix“), das Extraktionskit („Extraction Kit“) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted eluate vol.“) eingeben. |
| <b>4.</b> Das gewünschte Assay-Protokoll auswählen: C.diff ELITE_Be_ST_200_100 oder C.diff ELITE_Be_PC oder C.diff ELITE_Be_NC          | <b>5.</b> Den PCR-Mix in das „Reagent/ Elution Rack“ (Reagenz-/ Elutionsablage) laden und in die Cooler Unit einsetzen                                                | <b>6.</b> „PCR Rack“ mit „PCR Cassette“ laden                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>7.</b> Tür schließen. Analyselauf starten                                                                                            | <b>8.</b> Ergebnisse anzeigen, genehmigen und speichern                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |



ELITechGroup S.p.A.  
C.so Svizzera, 185, 10149 Torino ITALIEN  
Tel. +39-011 976 191  
Fax +39-011 936 76 11  
E-Mail: [emd.support@elitechgroup.com](mailto:emd.support@elitechgroup.com)  
Website: [www.elitechgroup.com](http://www.elitechgroup.com)