

Instructions for use

## ***C. difficile* ELITe MGB® Kit**

---

Reactivos para la PCR de ADN en tiempo real



**REF** M800358

**UDI** 08033891486563

**CE** **IVD**

**HISTORIAL DE CAMBIOS**

Rev.	Información del cambio	Fecha (dd/mm/aa)
07	Ampliación del uso con el ELITE BeGenius Nuevo diseño de los gráficos y del contenido de las instrucciones de uso	22/11/24
06	ELITE InGenius - CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO: Actualización de la sección «Marcadores potencialmente interferentes» para incluir <i>Clostridium nexile</i> .	09/09/24
05	Adición de datos analíticos (verificación del LoD, equivalencia del pretratamiento de la matriz, marcadores y sustancias potencialmente interferentes) y método alternativo de pretratamiento de la muestra.	15/03/24
00-04	Desarrollo de un nuevo producto con los cambios consiguientes	-

---

## INDICE

---

<b>1 USO PREVISTO .....</b>	<b>4</b>
<b>2 EXPLICACIÓN DEL ENSAYO .....</b>	<b>4</b>
<b>3 PRINCIPIO DEL ENSAYO .....</b>	<b>4</b>
<b>4 DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO.....</b>	<b>5</b>
<b>5 MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO.....</b>	<b>5</b>
<b>6 MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO .....</b>	<b>5</b>
<b>7 OTROS PRODUCTOS NECESARIOS .....</b>	<b>5</b>
<b>8 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.....</b>	<b>6</b>
<b>9 MUESTRAS Y CONTROLES para el ELITE InGenius y el ELITE BeGenius.....</b>	<b>8</b>
<b>10 PROCEDIMIENTO CON EL ELITE InGenius .....</b>	<b>10</b>
<b>11 PROCEDIMIENTO CON EL ELITE BeGenius .....</b>	<b>15</b>
<b>12 Características de rendimiento del ELITE InGenius y del ELITE BeGenius .....</b>	<b>20</b>
<b>13 MUESTRAS Y CONTROLES PARA OTROS SISTEMAS .....</b>	<b>32</b>
<b>14 PROCEDIMIENTO CON OTROS SISTEMAS.....</b>	<b>35</b>
<b>15 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO CON OTROS SISTEMAS.....</b>	<b>40</b>
<b>16 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>53</b>
<b>17 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.....</b>	<b>53</b>
<b>18 PROBLEMAS Y SOLUCIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>19 SÍMBOLOS.....</b>	<b>58</b>
<b>20 AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA.....</b>	<b>59</b>
<b>Appendix A QUICK START GUIDE.....</b>	<b>60</b>

## 1 USO PREVISTO

El producto **C. difficile ELITE MGB® Kit** es un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* concebido para su uso por parte de profesionales sanitarios como en ensayo cualitativo múltiple de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real para la **detección de los genes de la toxina A y la toxina B de Clostridium difficile (C. difficile) toxinógena**, inclusive la cepa hipervirulenta epidémica NAP1/BI/027, en muestras de ADN extraídas de muestras de heces no formadas o líquidas.

El ensayo se ha validado con los instrumentos **ELITE InGenius®** y **ELITE BeGenius®**, que son sistemas automatizados e integrados para la extracción, la PCR en tiempo real y la interpretación de resultados utilizando muestras humanas de heces.

El ensayo también se ha validado con el **7500 Real-Time PCR System** cuando se utilizan muestras humana de heces.

El producto se utiliza como ayuda en el diagnóstico de infecciones por **C. difficile** toxinógena en entornos clínicos junto con los datos clínicos y otras pruebas analíticas del paciente.

Los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta todas las observaciones clínicas y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

## 2 EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

La infección por **C. difficile** toxinógena suele manifestarse como diarrea de leve a moderada, en ocasiones, con cólicos intestinales. En raros casos, los pacientes con una infección por **C. difficile** toxinógena pueden presentar síndrome abdominal agudo y colitis fulminante potencialmente mortal. Aproximadamente el 20 % de los pacientes hospitalizados contraen una infección por **C. difficile** toxinógena durante su estancia en el hospital y más del 30 % de dichos pacientes desarrollan diarrea. Así, la colitis por **C. difficile** toxinógena es una de las infecciones hospitalarias más habituales en la actualidad. Debe sospecharse de la existencia de un diagnóstico de colitis por **C. difficile** toxinógena en cualquier paciente con diarrea que haya recibido antibióticos durante los dos meses anteriores, así como en los casos en los que la diarrea aparezca 72 horas o más después de la hospitalización. La colonización se produce por vía fecal-oral. Las cepas patógenas de **C. difficile** toxinógena producen dos toxinas distintas. La toxina A es una enterotoxina, mientras que la toxina B es una citotoxina. Al parecer, tanto la toxina A como la toxina B intervienen en la patogenia de la colitis por **C. difficile** toxinógena en humanos.

El producto **C. difficile ELITE MGB Kit** es un ensayo triple de amplificación en tiempo real que se dirige a los genes de la toxina A y la toxina B de **C. difficile** toxinógena y a un Internal Control. Los ensayos basados en la amplificación en tiempo real reducen considerablemente el tiempo de laboratorio comparado con los análisis de cultivo estándar, lo que mejora la eficacia del procedimiento.

El producto **C. difficile ELITE MGB Kit** se dirige al gen (tcdA) de la toxina A y al gen (tcdB) de la toxina B, por lo que detecta todos los genotipos toxinógenos posibles (A+/B+; A+/B-; A-/B+).

## 3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

Este es un ensayo cualitativo de PCR en tiempo real que detecta **los genes de la toxina A y la toxina B de Clostridium difficile (C. difficile) toxinógena**, inclusive la cepa hipervirulenta epidémica NAP1/BI/027, aislada de muestras y amplificada utilizando el reactivo de ensayo **C. difficile PCR Mix**, que contiene cebadores y sondas con la tecnología ELITE MGB.

Las sondas ELITE MGB se activan cuando se hibridan con los productos de PCR relacionados. **ELITE InGenius** y el **ELITE BeGenius** controlan el aumento de fluorescencia y calculan los ciclos umbral (Ct) y las temperaturas de fusión (Tm).

Las sondas ELITE MGB y los fluoróforos se inactivan en el estado de espiral aleatoria («random-coiled») y monocatenario de la sonda. Los fluoróforos están activos en el dúplex de sonda/amplión, pues el inhibidor se encuentra separado espacialmente del fluoróforo.

Cabe reseñar además que el fluoróforo no se escinde durante la PCR y puede utilizarse para el análisis de la disociación y para calcular la temperatura de fusión.

## 4 DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto **C. difficile ELITE MGB Kit** incluye el reactivo de ensayo **C. difficile PCR Mix**, que es una mezcla de PCR optimizada y estabilizada que contiene los cebadores y las sondas específicos para:

- el **gen específico de la toxina A de C. difficile, detectado en el canal Toxin A**; la sonda se estabiliza con la tecnología MGB, se inactiva mediante el Eclipse Dark Quencher y se marca con el colorante AquaPhluor 525 (AP525).
- el **gen específico de la toxina B de C. difficile, detectado en el canal Toxin B**; la sonda se estabiliza con la tecnología MGB, se inactiva mediante el Eclipse Dark Quencher y se marca con el colorante FAM.
- El **Internal Control (IC)**, específico para la secuencia artificial **IC2**, detectado en el canal **IC**; la sonda se estabiliza con la tecnología MGB, se inactiva mediante el Eclipse Dark Quencher y se marca con el tinte AquaPhluor 642 (AP642).

La mezcla de reacción **C. difficile PCR Mix** también contiene solución tampón, cloruro de magnesio, nucleótidos-trifosfatos y la enzima ADN polimerasa con activación térmica («hot-start»).

El producto **C. difficile ELITE MGB Kit** contiene suficientes reactivos para realizar **96 análisis** en el **ELITE InGenius** o el **ELITE BeGenius**, cuando se utilizan 20 µL en cada reacción.

El producto contiene suficientes reactivos para realizar **100 análisis en otros sistemas**, cuando se utilizan 20 µL en cada reacción.

## 5 MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Tabla 1

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de peligros
<b>C. difficile PCR Mix</b> ref. M800358	Mezcla de reactivos para la PCR en tiempo real probeta con <b>tapón amarillo</b>	<b>4×540 µL</b>	-

## 6 MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Agitador vórtex
- Centrifugadora de sobremesa (aproximadamente 5000 rpm).
- Centrifugadora de sobremesa (aproximadamente 13.000 rpm).
- Mezcladora térmica.
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosoles o puntas estériles de desplazamiento positivo (0,5–10 µL, 2–20 µL, 5–50 µL, 50–200 µL, 200–1000 µL).
- Probetas estériles de 2,0 mL con tapón roscado (Sarstedt, Alemania, ref. 72.694.005).
- Agua de calidad para biología molecular.

## 7 OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

Este producto no incluye los reactivos para la extracción del ADN de la muestra, ni tampoco el Internal Control de extracción e inhibición, el Positive Control y el Negative Control de amplificación ni los consumibles.

Para la extracción automática de ácidos nucleicos, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados de las muestras, es necesario utilizar los siguientes productos:

Tabla 2

Instrumentos y software	Productos y reactivos
<p><b>ELITE InGenius</b> (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, ref. INT030).</p> <p><b>ELITE InGenius Software</b> versión 1.3.0.17 (o posterior).</p> <p><b>Cdiff ELITE_PC</b>, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Positive Control.</p> <p><b>Cdiff ELITE_NC</b>, Assay Protocol (protocolo de ensayo) para el análisis del Negative Control.</p> <p><b>Cdiff ELITE_ST_200_100</b>, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de muestras de heces.</p>	<p><b>ELITE InGenius SP200</b> (EG SpA, ref. INT032SP200)</p> <p><b>ELITE InGenius SP 200 Consumable Set</b> (EG SpA, ref. INT032CS).</p> <p><b>ELITE InGenius PCR Cassette</b> (EG SpA, ref. INT035PCR).</p> <p><b>ELITE InGenius Waste Box</b> (EG SpA, ref. F2102-000).</p> <p><b>300 µL Filter Tips Axygen</b> (Corning Life Sciences Inc., ref. TF-350-L-R-S), solo con el ELITE InGenius.</p> <p><b>1000 µL Filter Tips Tecan</b> (Tecan, Switzerland, ref. 30180118), solo con el ELITE BeGenius.</p> <p><b>CPE - Internal Control</b> (EG SpA, ref. CTCRPE).</p> <p><b>C. difficile – ELITE Positive Control</b> (EG SpA, ref. M800373)</p> <p><b>InhibitEX Buffer</b> (QIAGEN GmbH, Alemania, ref. 19593) o <b>S.T. A.R. buffer</b> (Roche Diagnostics GmbH, ref. 3 335 208), o un dispositivo equivalente.</p> <p><b>Minitip Flocked Swab®</b> (COPAN Italia S.p.A., Italia, ref. 518CS01) o un dispositivo equivalente.</p>
<p><b>ELITE BeGenius</b> (EG SpA, ref. INT040).</p> <p><b>ELITE BeGenius Software</b> versión 2.1.0 (o posterior).</p> <p><b>Cdiff ELITE_Be_PC</b>, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Positive Control.</p> <p><b>Cdiff ELITE_Be_NC</b>, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Negative Control.</p> <p><b>Cdiff ELITE_Be_ST_200_100</b>, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de muestras de heces.</p>	<p><b>MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL</b> (Life Technologies, ref. 4346906)</p> <p><b>NucliSENS® easyMAG® Reagents</b> (bioMérieux SA, ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135),</p> <p><b>InviMag Universal Kit/IG</b> (INVITEK, ref. 2450120100).</p> <p><b>ELITE GALAXY 300 Extraction Kit</b> (EG SpA, ref. INT021EX),</p> <p><b>CPE – Internal Control</b> (EG SpA., ref. CTCRPE)</p> <p><b>C. difficile – ELITE Positive Control</b> (EG SpA, ref. M800373)</p> <p><b>S.T.A.R. buffer</b> (Roche Diagnostics GmbH, ref. 3 335 208).</p>
<p><b>7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument</b> (ThermoFisher Scientific, ref. 4406985)</p> <p><b>NucliSENS® easyMAG®</b> (bioMérieux SA, ref. 200111)</p> <p><b>ELITE STAR</b> (EG SpA, ref. INT010)</p> <p><b>ELITE GALAXY</b> (EG SpA, ref. INT020)</p>	

## 8 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto está diseñado exclusivamente para uso *in vitro*.

### Advertencias y precauciones generales

Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si fueran infecciosas. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. Evitar salpicaduras o pulverizaciones. Las probetas, las puntas y el resto de materiales que entran en contacto con las muestras biológicas deben tratarse con hipoclorito de sodio (lejía) al 3 % durante al menos 30 minutos, o bien procesarse en autoclave durante una hora a 121 °C antes de su eliminación.

Manipular y eliminar todos los reactivos y materiales utilizados para realizar el ensayo como si fueran infecciosos. Evitar el contacto directo con los reactivos. Evitar salpicaduras o pulverizaciones. Los residuos deben tratarse y eliminarse conforme a las normas de seguridad aplicables. El material desechable combustible debe incinerarse. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben neutralizarse antes de eliminarlos. Evitar que los reactivos de extracción entren en contacto con hipoclorito de sodio (lejía).

Utilizar ropa de protección y guantes adecuados y protegerse los ojos y la cara.

No pipetear ninguna solución con la boca.

No comer, beber, fumar ni aplicarse cosméticos en el área de trabajo.

Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.

Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos conforme a las normas vigentes.

Leer atentamente todas las instrucciones incluidas antes de realizar el ensayo.

Durante la realización del ensayo, seguir las instrucciones proporcionadas con el producto.

No utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada.

Utilizar únicamente los reactivos incluidos en el producto y los recomendados por el fabricante.

No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

### Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular

Con el fin de evitar el riesgo de resultados incorrectos, sobre todo debido a la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o a la contaminación de estas con productos de la PCR, para los procedimientos de biología molecular se requiere personal debidamente formado y cualificado.

Cuando la sesión de amplificación se configura manualmente, es necesario disponer de áreas independientes para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación. No introducir nunca un producto de amplificación en el área asignada a la extracción/preparación de las reacciones de amplificación.

Cuando la sesión de amplificación se configura manualmente, es necesario disponer de batas de laboratorio, guantes y herramientas que se empleen exclusivamente para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación.

No llevar nunca batas de laboratorio, guantes ni herramientas del área asignada a la amplificación/detección de productos de amplificación al área asignada a la extracción/preparación de las reacciones de amplificación.

Es necesario disponer de batas, guantes e instrumentos específicos para las sesiones de trabajo.

Las muestras deben ser aptas y, en la medida de lo posible, estar destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben destinarse exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN.

Los reactivos deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. Las pipetas utilizadas para manipular los reactivos deben destinarse exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN.

Con el fin de evitar el riesgo de contaminación, los productos de extracción deben manipularse de manera que se reduzca al mínimo la dispersión hacia el entorno.

Los cartuchos PCR Cassette deben manipularse con cuidado y no deben abrirse nunca para evitar la dispersión del producto de PCR hacia el entorno, así como la contaminación de muestras y reactivos.

### Advertencias y precauciones específicas para los componentes:

Tabla 3

Componente	Temperatura de almacenamiento	Uso a partir de la primera apertura	Ciclos de congelación y descongelación	Estabilidad con carga (ELITE InGenius y ELITE BeGenius)
<b>Cdiff PCR Mix</b>	-20 °C o una temperatura inferior (protegido de la luz)	un mes	máximo cinco	Hasta cinco sesiones independientes* de tres horas cada una

\*Con congelación intermedia

## 9 MUESTRAS Y CONTROLES para el ELITE InGenius y el ELITE BeGenius

### 9.1 Muestras

Este producto está concebido para utilizarlo en uno de los instrumentos **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius** con las siguientes muestras clínicas, identificadas y manipuladas conforme a las directrices para laboratorios y obtenidas, transportadas y conservadas en las condiciones siguientes:

**Tabla 4**

Muestra	Requisitos de obtención	Condiciones transporte/almacenamiento			
		de +16 °C a +26 °C (temperatura ambiente)	de +2 °C a +8 °C	-20 °C ± 10 °C	-70 °C ± 15 °C
Heces naturales	recogidas sin conservantes	≤24 horas	≤48 horas	≤1 mes	>1 mes

Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Para el pretratamiento de las muestras con el producto InhibitEX Buffer (QIAGEN, Alemania, ref. 19593), seguir las instrucciones que se describen a continuación:

Procedimiento de pretratamiento comenzando a partir de heces naturales recogidas sin conservantes:

- Verter 1 mL de solución tampón InhibitEX Buffer en una probeta Sarstedt de 2 mL.
- Obtener una muestra de heces con un hisopo Minitip Flocked Swab con punto de rotura a 80 mm (Copan), recoger la muestra de diferentes porciones de heces y desechar el exceso apoyándolo contra la pared del recipiente.
- Insertar el hisopo en la probeta Sarstedt de 2 mL que contiene la solución tampón InhibitEX Buffer y girarlo al menos 10 veces, apoyándolo contra la pared.
- Desechar el hisopo y cerrar la probeta con el tapón.
- Mezclar mediante vórtex durante aproximadamente 60 segundos.
- Incubar en una mezcladora térmica a aproximadamente +80 °C y aproximadamente 800 rpm durante 10 minutos.
- Centrifugar a 10.000x RCF durante 15 segundos.
- Verter con cuidado 200 µL de sobrenadante de heces clarificadas en una «Extraction Tube» (Tubo de extracción), en el caso del instrumento ELITE InGenius, o en una probeta Sarstedt de 2 mL, en el caso del instrumento ELITE BeGenius, teniendo cuidado de no alterar el material fecal granulado.

Seguir las instrucciones descritas a continuación para el pretratamiento de las muestras con el producto S.T.A.R. Buffer (Roche Diagnostics GmbH, ref. 3 335 208):

Procedimiento de pretratamiento comenzando a partir de heces naturales recogidas sin conservantes:

- Preparar una probeta etiquetada de 1,5 mL para cada muestra de heces en bruto y distribuir 0,8 mL de tampón S.T.A.R. Buffer en una probeta.
- Mezclar la muestra de heces en bruto en un vórtex y, a continuación, utilizar una pipeta con una punta resistente a los aerosoles para verter aproximadamente 200 µL de la muestra de heces en bruto en la probeta de 1,5 mL que contiene el tampón S.T.A.R Buffer (en el caso de muestras de heces densas, utilizar para ello una punta de agujero ancho o una espátula de plástico según sea necesario).
- Tapar la probeta de forma segura y, después, mezclarla en un vórtex (de 20 a 30 segundos) para homogeneizar la mezcla.
- Centrifugar la solución homogeneizada a 13.000×g (RCF) durante 1 minuto para clarificar la muestra.

- Verter con cuidado 200 µL de sobrenadante de heces clarificadas en una «Extraction Tube» (Tubo de extracción), en el caso del instrumento ELITE InGenius, o en una probeta Sarstedt de 2 mL, en el caso del instrumento ELITE BeGenius.
- Conservar las heces clarificadas a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C durante un máximo de 7 horas antes de realizar la extracción.

**NOTA!**

El tampón S.T.A.R. Buffer debe conservarse a temperatura ambiente. Durante este tiempo, pueden formarse precipitados de color blanco. Así pues, antes de comenzar con el procedimiento de extracción, comprobar si se han formado precipitados y, en caso afirmativo, calentar la solución a una temperatura comprendida entre 30 °C y 40 °C en un baño María o en una estufa incubadora hasta que dichos precipitados se hayan disuelto.

Conservar los ácidos nucleicos purificados a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C si van a utilizarse el mismo día de la extracción, o a una temperatura inferior a -20 °C si van a conservarse durante más tiempo.

Para realizar el análisis de las muestras en el **ELITE InGenius** o el **ELITE BeGenius**, es necesario utilizar los siguientes Assay Protocols (protocolos de ensayo). Estos protocolos para diagnóstico *in vitro* se han validado específicamente con los productos ELITE MGB Kit y los instrumentos **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius** con las matrices indicadas.

**Tabla 5 Protocolos de ensayo para el producto C. difficile ELITE MGB Kit**

Muestra	Instrumento	Nombre del protocolo de ensayo	Informe	Características
Heces naturales recogidas sin conservantes	<b>ELITE InGenius</b>	<b>Cdiff ELITE_ST_200_100</b>	Positivo/ Negativo	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 10 µL Análisis de la fusión: opcional
	<b>ELITE BeGenius</b>	<b>Cdiff ELITE_Be_ST_200_100</b>		

Para todos los protocolos, es preciso verter 200 µL de muestra en la «Extraction Tube» (Tubo de extracción), en el caso del ELITE InGenius, o en una probeta Sarstedt de 2 mL, en el caso del ELITE BeGenius.

**NOTA!**

el pipeteado de las muestras en la «**Extraction Tube**» (Tubo de extracción) o en la **probeta Sarstedt de 2 mL** puede **desarrollar contaminación**. Así pues, utilizar pipetas apropiadas y seguir todas las recomendaciones indicadas en la sección 8 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES page 6

Los ácidos nucleicos purificados pueden dejarse a temperatura ambiente durante 16 horas o conservarse a -20 °C o a una temperatura inferior durante un máximo de un mes.

Consultar «Sustancias potencialmente interferentes» en la sección «[12 Características de rendimiento del ELITE InGenius y del ELITE BeGenius page 20](#)» para comprobar los datos relativos a tales sustancias.

## 9.2 Controles de PCR

Los resultados del control de la PCR deben generarse y aprobarse para cada lote de reactivo de reactivo de PCR.

- Para el Positive Control, utilizar el producto **C. difficile - ELITE Positive Control** (no incluido con este kit) con los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **Cdiff ELITE\_PC** o **Cdiff ELITE\_Be\_PC**.
- Para el Negative Control, utilizar agua para biología molecular (no incluida en este kit), junto con los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **Cdiff ELITE\_NC** o **Cdiff ELITE\_Be\_NC**.

**NOTA!**

El **ELITE InGenius** y el **ELITE BeGenius** permiten generar y guardar la validación del control de PCR para cada lote de reactivos de PCR. Los resultados del control de PCR caducan a los 15 días, después de los cuales es necesario volver a procesar el Positive Control y el Negative Control.

Los controles de PCR deben volver a procesarse si se produce alguna de las siguientes circunstancias:

- Se utiliza un nuevo lote de reactivos.
- Los resultados del análisis de control de calidad (consultar el apartado siguiente) están fuera de las especificaciones.
- Se realiza una operación importante de mantenimiento en uno de los instrumentos **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius**.

### 9.3 Controles de calidad

Se recomienda verificar la extracción y el procedimiento de PCR. Se pueden utilizar muestras archivadas o material de referencia certificado. Deben realizarse controles externos de acuerdo con las disposiciones de los organismos de acreditación locales, estatales o federales, según proceda.

Los controles externos para los ensayos de *Clostridium difficile* son proporcionados por diversos fabricantes (como Qnostics Ltd, Reino Unido, y ZeptoMetrix Corp., EE. UU.).

## 10 PROCEDIMIENTO CON EL ELITE InGenius

El procedimiento para utilizar el producto **C. difficile ELITE MGB Kit** con el **ELITE InGenius** comprende tres pasos:

**Tabla 6**

<b>PASO 1</b>	Verificación de la disponibilidad del sistema	
<b>PASO 2</b>	Configuración de la sesión	A) Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).
		B) Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).
		C) Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).
<b>PASO 3</b>	Evaluación y aprobación de los resultados	1) Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control
		2) Validación de los resultados de las muestras
		3) Generación del informe de los resultados de la muestra

### PASO 1. Verificación de la disponibilidad del sistema

Antes iniciar la sesión, es necesario realizar las siguientes tareas:

- Encender el **ELITE InGenius** e iniciar sesión en el modo «**CLOSED**».
- En el menú «Controls» (Controles) de la página «Home» (Inicio), verificar que los controles de PCR (**Positive Control, Negative Control**) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de mezcla **PCR Mix** que va a utilizarse. Si no se dispone de controles de PCR válidos para el lote de **PCR Mix**, procesar los controles de la PCR tal como se describe en los apartados siguientes.
- Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz para configurar la sesión y utilizando los Assay Protocols (protocolos de ensayo) proporcionados por EG SpA (consultar la sección «Muestras y controles»).

Si el Assay Protocol (protocolo de ensayo) deseado no está cargado en el sistema, contactar con el servicio de atención al cliente de ELITechGroup más cercano.

**PASO 2. Configuración de la sesión**

El producto **C. difficile ELITE MGB Kit** puede utilizarse con el **ELITE InGenius** para realizar las siguientes tareas:

- A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)
- B. Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
- C. Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

Todos los parámetros necesarios están incluidos en el protocolo de ensayo disponible en el instrumento y se cargan automáticamente al seleccionar el protocolo de ensayo.

**NOTA!**

El **ELITE InGenius** puede conectarse al «Laboratory Information System» (sistema de información de laboratorios, LIS), que permite descargar la información de la sesión. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

Antes de configurar una sesión:

Descongelar las probetas necesarias de **PCR Mix** a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para **24 análisis** en condiciones de uso óptimas (es decir, si se realizan al menos 5 análisis por sesión). Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.

**NOTA!**

Conservar **PCR Mix** en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

Para configurar uno de los tres tipos de sesión, realizar los pasos siguientes conforme a las instrucciones de la interfaz:

**Tabla 7**

	<b>A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)</b>	<b>B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)</b>	<b>C. Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)</b>
<b>1</b>	<b>Identificar las muestras</b> y, en caso necesario, descongelarlas a temperatura ambiente. Pretratar las muestras de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección «Muestras y controles». Para este ensayo, es necesario verter <b>200 µL de muestra pretratada</b> en una «Extraction Tube» (Tubo de extracción) previamente etiquetada.	<b>Descongelar los «Elution Tubes»</b> (Tubos de elución) que contienen los ácidos nucleicos extraídos a temperatura ambiente. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.	<b>Descongelar las probetas de Positive Control</b> a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Cada probeta es suficiente para 4 reacciones.
<b>2</b>	<b>Descongelar las probetas de CPE</b> necesarias a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones.	No aplicable	<b>Preparar el Negative Control</b> vertiendo al menos 50 µL de agua para biología molecular en una «Elution Tube» (Tubo de elución), que se incluye en el producto ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
<b>3</b>	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).

Tabla 7 (continued)

	<b>A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)</b>	<b>B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)</b>	<b>C. Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)</b>
4	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.
5	Para cada muestra, asignar un carril e introducir el «SampleID» o SID (ID de la muestra), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras.	Para cada muestra, asignar un carril e introducir el «SampleID» o SID (ID de la muestra), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras.	No aplicable
6	<b>Seleccionar el Assay Protocol</b> (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	<b>Seleccionar el Assay Protocol</b> (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	<b>Seleccionar el Assay Protocol</b> (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles». Introducir el número de lote y la fecha de caducidad del Positive Control y del agua para biología molecular.
7	Asegurarse de que el protocolo que se muestra en el área «Protocol» (Protocolo) sea «Extract + PCR» (Extracción + PCR).	Seleccionar «PCR Only» en la columna «Protocol» (Protocolo).	En la columna «Protocol» (Protocolo), asegurarse de que esté seleccionado «PCR Only» (Solo PCR).
8	En la columna «Sample Position» (Posición de la muestra), seleccionar la posición de carga «Extraction Tube» (Tubo de extracción) para la muestra.	Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» (Posición de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]).	Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» (Posición de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]).
9	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
10	<b>Cargar el CPE</b> y la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (lista de carga) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.	<b>Cargar la PCR Mix</b> en el «Inventory Block» (bloque de inventario) en función de la «Load List» (lista de carga) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.	<b>Cargar la PCR Mix</b> en el «Inventory Block» (bloque de inventario) en función de la «Load List» (lista de carga) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.
11	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
12	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) del «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) del «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) del «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
13	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
14	<b>Cargar el PCR Cassette</b> , los cartuchos de extracción ELITE InGenius SP 200, así como todos los consumibles necesarios y las muestras que deben extraerse.	<b>Cargar el PCR Cassette</b> y «Elution Tube» (Tubo de elución) con las muestras extraídas.	<b>Cargar el PCR Cassette</b> y las probetas de Positive Control y de Negative Control.

Tabla 7 (continued)

	A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)	B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)	C. Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
15	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
16	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.
17	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

Una vez finalizada la sesión, el **ELITE InGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

#### NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda de la muestra extraída en la «**Elution Tube**» (Tubo de elución) debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a  $-20 \pm 10$  °C durante un máximo de un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

#### NOTA!

Al finalizar la sesión, la **PCR Mix** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a  $-20$  °C o a una temperatura inferior, o bien mantenerse en el bloque refrigerado durante un máximo de 5 sesiones de trabajo de 3 horas cada una. Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

#### NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda del **Positive Control** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a  $-20$  °C o a una temperatura inferior. Evitar derramar el **Positive Control**. La parte que queda del **Negative Control** debe desecharse.

#### NOTA!

El producto **Positive Control** puede utilizarse para 4 sesiones independientes de 3 horas cada una.

#### NOTA!

Al finalizar la sesión, el **PCR Cassette** y el resto de consumibles deben eliminarse siguiendo las normativas gubernamentales y medioambientales. Evitar derramar los productos de reacción.

### PASO 3. Evaluación y aprobación de los resultados

El **ELITE InGenius** supervisa las señales de fluorescencia de la diana y del Internal Control para cada reacción y aplica automáticamente los parámetros del Assay Protocol (protocolo de ensayo) para generar las curvas de PCR que, después, se convierten en resultados.

Al finalizar la sesión, aparece automáticamente la pantalla «Results Display». En esta pantalla se muestran los resultados y la información de la sesión. Desde esta pantalla, es posible aprobar dichos resultados, así como imprimir o guardar los informes («Sample Report» o «Track Report»). Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

#### NOTA!

El **ELITE InGenius** puede conectarse al «Laboratory Information System» (sistema de información de laboratorios, LIS), que permite cargar los resultados de la sesión en el centro de datos del laboratorio. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

El instrumento **ELITE InGenius** genera los resultados con el producto **C. difficile ELITE MGB Kit** mediante el siguiente procedimiento:

1. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control.
2. Validación de los resultados de las muestras.
3. Generación del informe de los resultados de la muestra.

### Validación de los resultados de la amplificación del Positive Control y del Negative Control

El **ELITE InGenius Software** interpreta los resultados de la PCR para la diana de las reacciones del Positive Control y del Negative Control utilizando los parámetros de los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **ELITE\_PC** y **ELITE\_NC**. Los valores de Ct y Tm resultantes se utilizan para verificar el sistema (lote de reactivos e instrumento).

Los resultados del Positive Control y del Negative Control, específicos para el lote de reactivos de PCR, se guardan en la base de datos («Calibration»), por lo que el personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst») puede verlas siguiendo las instrucciones de la interfaz.

Los resultados del Positive Control y del Negative Control caducan **a los 15 días**.

El **ELITE InGenius Software** utiliza los resultados de la amplificación del Positive Control y del Negative Control para configurar los gráficos de control («Control Charts»), lo que permite controlar el rendimiento del paso de amplificación. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

#### NOTA!

Si el resultado del Positive Control o del Negative Control no cumple los criterios de aceptación, en la pantalla «Controls» (Controles) aparece el mensaje «Failed» (Error). En este caso, los resultados no pueden aprobarse y es necesario repetir las reacciones del Positive Control o del Negative Control.

#### NOTA!

Si el resultado del Positive Control o del Negative Control no es válido y se han incluido muestras en la misma sesión, las muestras pueden aprobarse, pero los resultados no se validan.. En este caso, es necesario repetir el procesamiento del control o los controles que han producido un error y el de todas las muestras.

### Validación de los resultados de la muestra

El **ELITE InGenius Software** interpreta los resultados de la PCR para la diana (canales **Toxin A** y **Toxin B**) y para el Internal Control (canal **IC**) con los parámetros del Assay Protocol (protocolo de ensayo) **Cdiff ELITE\_ST\_200\_100**.

Los resultados se muestran en la pantalla «Results Display» (Presentación de resultados).

Los resultados de la muestra pueden aprobarse cuando se cumplen las dos condiciones que se indican en la tabla siguiente.

**Tabla 8**

<b>1) Positive Control</b>	<b>Estado</b>
Control positivo de <i>C. difficile</i>	APROBADO
<b>2) Negative Control</b>	<b>Estado</b>
Control negativo de <i>C. difficile</i>	APROBADO

El **ELITE InGenius Software** interpreta automáticamente los resultados de las muestras utilizando los parámetros del Assay Protocol (protocolo de ensayo).

En la tabla siguiente se muestran los posibles mensajes de los resultados.

Para cada muestra el sistema indica una combinación de los mensajes siguientes y especifica si se ha detectado o no el ADN de los patógenos.

Tabla 9

Resultado de la sesión de la muestra	Interpretación
Cdiff: DNA Detected (Cdiff: ADN Detectado)	<b>Se ha detectado gen de la toxina A o gen de la toxina B de C. <i>difficile</i></b> en la muestra. La muestra es positiva para <i>C. difficile</i> y podría ser <b>toxinógena</b> .
Cdiff: DNA Not Detected or below LoD (Cdiff: ADN no detectado o por debajo del límite de detección)	<b>No se ha detectado gen de la toxina A ni gen de la toxina B de C. <i>difficile</i></b> en la muestra. La muestra es válida y negativa para <i>C. difficile</i> toxinógena, o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo.
Invalid-Retest Sample (No válido-Volver a probar muestra)	<b>Resultado no válido del ensayo</b> debido a un error en el control interno (extracción incorrecta, arrastre de inhibidores). Es necesario repetir el análisis.

Las muestras que el **ELITE InGenius Software** notifica como «Invalid - Retest Sample» no son aptas para la interpretación de resultados. En este caso, el ADN del Internal Control no ha podido detectarse correctamente debido a problemas en el paso de amplificación o de extracción (degradación del ADN, pérdida de este durante la extracción o arrastre de inhibidores en el eluido), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos.

Si el volumen del eluido es suficiente, la muestra extraída puede volver a analizarse con una sesión de amplificación en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Si se produce un segundo resultado no válido, la muestra debe volver a analizarse a partir del paso de la extracción utilizando una nueva alícuota en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR). (consultar la sección [18 PROBLEMAS Y SOLUCIONES page 54](#))

Las muestras que se notifican como «Cdiff DNA Not Detected or below LoD» (Cdiff: ADN no detectado o por debajo del límite de detección) son aptas para el análisis, pero no ha sido posible detectar ADN de *C. difficile* para los genes de la toxina A o de la toxina B. En este caso, no se puede descartar que el ADN de *C. difficile* para los genes de la toxina A o la toxina B esté presente en una concentración inferior al límite de detección del ensayo (consultar la sección [12 Características de rendimiento del ELITE InGenius y del ELITE BeGenius page 20](#)). También puede ocurrir que la muestra presente una *C. difficile* no toxinógena.

### NOTA!

Los resultados obtenidos con este ensayo deben interpretarse teniendo en cuenta todas las observaciones clínicas y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Los resultados de la muestra se guardan en la base de datos y, si son válidos, pueden ser aprobados en la pantalla «Results Display» (Presentación de resultados) por personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst»), siguiendo las instrucciones de la interfaz. La pantalla «Results Display» (Presentación de resultados) permite imprimir y guardar los resultados de la sesión de la muestra como «Sample Report» y como «Track Report».

### Generación del informe de los resultados de la muestra

Los resultados de la muestra se guardan en la base de datos y los informes pueden exportarse como «Sample Report» y como «Track Report».

El «Sample Report» muestra los detalles de los resultados ordenados por la muestra seleccionada (SID).

El «Track Report» muestra los detalles de los resultados ordenados por el carril seleccionado.

El personal autorizado puede imprimir y firmar el «Sample Report» y el «Track Report».

## 11 PROCEDIMIENTO CON EL ELITE BeGenius

El procedimiento para utilizar el producto **C. *difficile* ELITE MGB Kit** con el **ELITE BeGenius** comprende tres pasos:

Tabla 10

<b>PASO 1</b>	Verificación de la disponibilidad del sistema	
<b>PASO 2</b>	Configuración de la sesión	A) Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).
		B) Sesión con la muestra eluida, modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).
		C) Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).
<b>PASO 3</b>	Evaluación y aprobación de los resultados	1) Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control
		2) Validación de los resultados de las muestras
		3) Generación del informe de los resultados de la muestra

### PASO 1. Verificación de la disponibilidad del sistema

Antes iniciar la sesión, es necesario realizar las siguientes tareas:

- Encender el **ELITE BeGenius** e iniciar sesión en el modo «**CLOSED**».
- En el menú «Controls» (Controles) de la página «Home» (Inicio), verificar que los controles de PCR (**Positive Control y Negative Control**) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de **PCR Mix** que va a utilizarse. Si no se dispone de controles de PCR válidos para el lote de **PCR Mix**, procesar los controles de la PCR tal como se describe en los apartados siguientes.
- Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz para configurar la sesión y utilizando los Assay Protocols (protocolos de ensayo) proporcionados por EG SpA (consultar la sección «Muestras y controles»).

Si el Assay Protocol (protocolo de ensayo) deseado no está cargado en el sistema, contactar con el servicio de atención al cliente de ELITechGroup más cercano.

### PASO 2. Configuración de la sesión

El producto **C. difficile ELITE MGB Kit** puede utilizarse con el instrumento **ELITE BeGenius** para realizar las siguientes tareas:

- Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)
- Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
- Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

Todos los parámetros necesarios están incluidos en los Assay Protocols (protocolos de ensayo) disponibles en el instrumento y se cargan automáticamente al seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo).

#### NOTA!

El **ELITE BeGenius** puede conectarse al «Laboratory Information System» (sistema de información de laboratorios, LIS), que permite descargar la información de la sesión. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

#### Antes de configurar una sesión:

Descongelar las probetas necesarias de **PCR Mix** a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para **24 análisis** en condiciones de uso óptimas (es decir, si se realizan al menos 5 análisis por sesión). Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.

#### NOTA!

Conservar **PCR Mix** en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

Para configurar uno de los tres tipos de sesión, realizar los pasos siguientes conforme a las instrucciones de la interfaz:

**Tabla 11**

	<b>A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)</b>	<b>B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)</b>	<b>C. Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)</b>
1	<p><b>Identificar las muestras</b> y, en caso necesario, descongelar a temperatura ambiente.</p> <p>Pretratar las muestras de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección «Muestras y controles».</p> <p>Para este ensayo, es preciso verter <b>200 µL de muestra pretratada</b> en una probeta Sarstedt de 2 mL previamente etiquetada.</p>	<p>En caso necesario, <b>descongelar las «Elution Tubes»</b> (Tubos de elución) que contienen los ácidos nucleicos extraídos a temperatura ambiente. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.</p>	<p><b>Descongelar las probetas de Positive Control</b> a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 4 reacciones. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.</p>
2	<p><b>Descongelar las probetas de CPE</b> necesarias a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones.</p>	No aplicable	<p><b>Preparar el Negative Control</b> vertiendo al menos 50 µL de agua para biología molecular en el «Elution Tube» (Tubo de elución) que se incluye con el producto ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.</p>
3	<p>Seleccionar <b>«Perform Run» (Realizar ejecución)</b> en la pantalla «Home» (Inicio).</p>	<p>Seleccionar <b>«Perform Run» (Realizar ejecución)</b> en la pantalla «Home» (Inicio).</p>	<p>Seleccionar <b>«Perform Run» (Realizar ejecución)</b> en la pantalla «Home» (Inicio).</p>
4	<p>Extraer todas las gradillas de la «Cooler Unit» y colocarlas en la mesa de preparación.</p>	<p>Extraer las racks de los «Lanes» 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la «Cooler Unit» y colocarlas en la mesa de preparación.</p>	<p>Extraer las racks de los «Lanes» 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la «Cooler Unit» y colocarlas en la mesa de preparación.</p>
5	<p>Seleccionar el «Run Mode»: <b>«Extract + PCR» (Extracción + PCR)</b>.</p>	<p>Seleccionar el «Run Mode»: <b>«PCR Only» (Solo PCR)</b>.</p>	<p>Seleccionar el «Run Mode»: <b>«PCR Only» (Solo PCR)</b>.</p>
6	<p><b>Cargar las muestras</b> en la «Sample Rack» (rack de muestras). Cuando se cargan probetas secundarias «2 mL Tubes», utilizar los adaptadores azules para la «Sample Rack» (rack de muestras).</p>	<p><b>Cargar las muestras</b> en la «Elution Rack» (rejilla de elución).</p>	<p><b>Cargar las probetas de Positive Control y de Negative Control</b> en la «Elution Rack» (rejilla de elución).</p>
7	<p><b>Insertar la «Sample Rack»</b> (rack de muestras) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 5 (L5).</p> <p>En caso necesario, insertar el «SID» (ID de la muestra) para posición utilizada (si las probetas secundarias están cargadas, marchar la probeta de 2 mL («2 mL Tube»). Si las probetas secundarias no tienen códigos de barras, introducir manualmente el ID de las muestras.</p>	<p><b>Insertar la «Elution Rack»</b> (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3).</p> <p>En caso necesario, para cada «Position» (Posición), introducir el «SID» (ID de la muestra), la «Sample matrix» (matriz de la muestra), el «Extraction Kit» (kit de extracción) y el «Extracted Eluate Volume» (volumen de elución extraído).</p>	<p><b>Insertar la «Elution Rack»</b> (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3).</p> <p>En caso necesario, para cada «Position» introducir el «Reagent name» (nombre del reactivo), el «S/N» (número de serie) el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).</p>
8	<p>Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.</p>	<p>Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.</p>	<p>Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.</p>

Tabla 11 (continued)

	<b>A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)</b>	<b>B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)</b>	<b>C. Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)</b>
9	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.
10	Seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	Seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	Seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».
11	Hacer clic en «Next» (Siguiete) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiete) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiete) para continuar.
	<b>NOTA!</b> si se procesan más de 12 muestras, repetir el procedimiento a partir del punto 6.		-
12	Cargar las «Elution Tube» (tubo de elución) en la «Elution Rack» (rejilla de elución); las probetas de elución pueden etiquetarse con un código de barras para mejorar la rastreabilidad.	No aplicable	No aplicable
13	Insertar la «Elution Rack» (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). Si se procesan más de 12 muestras, repetir el procedimiento utilizando el «Lane 2» (L2).	No aplicable	No aplicable
14	Hacer clic en «Next» (Siguiete) para continuar.	No aplicable	No aplicable
15	<b>Cargar el CPE y la PCR Mix</b> en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).	<b>Cargar la PCR Mix</b> en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).	<b>Cargar la PCR Mix</b> en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).
16	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) en el Lane 2 (L2) de la «Cooler Unit» o, si está disponible, en el Lane 1 (L1). En caso necesario, para cada reactivo de PCR Mix o cada CPE, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) en el Lane 2 (L2) de la «Cooler Unit» o, si está disponible, en el Lane 1 (L1). En caso necesario, para cada PCR Mix o cada CPE, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) en el Lane 2 (L2) de la «Cooler Unit» o, si está disponible, en el Lane 1 (L1). En caso necesario, para cada PCR Mix o cada CPE, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).
17	Hacer clic en «Next» (Siguiete) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiete) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiete) para continuar.

Tabla 11 (continued)

	A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)	B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)	C. Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
18	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
19	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
20	Cargar la «PCR Rack» (gradilla de PCR) con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario).	Cargar la «PCR Rack» (gradilla de PCR) con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario).	Cargar la «PCR Rack» (gradilla de PCR) con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario).
21	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
22	Cargar la «Extraction Rack» (gradilla de extracción) con los cartuchos de extracción «ELITE InGenius SP 200» y los consumibles de extracción necesarios.	No aplicable	No aplicable
23	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.
24	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

Una vez finalizada la sesión, el **ELITE BeGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

### NOTA!

al finalizar la sesión, la parte que queda de la muestra extraída en el «**Elution Tube**» (Tubo de elución) debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a  $-20 \pm 10$  °C durante un máximo de un mes. Evitar cualquier derrame de la muestra extraída.

### NOTA!

Al finalizar la sesión, la **PCR Mix** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a  $-20$  °C o a una temperatura inferior, o bien mantenerse en el bloque refrigerado durante un máximo de 5 sesiones de trabajo de 3 horas cada una. Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

### NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda del **Positive Control** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a  $-20$  °C o a una temperatura inferior. Evitar derramar el Positive Control. La parte que queda del **Negative Control** debe eliminarse.

### NOTA!

El producto **Positive Control** puede utilizarse para 4 sesiones independientes de 3 horas cada una.

**NOTA!**

Al finalizar la sesión, el **PCR Cassette** y el resto de consumibles deben eliminarse siguiendo las normativas gubernamentales y medioambientales. Evitar derramar los productos de reacción.

**PASO 3. Evaluación y aprobación de los resultados**

El **ELITE BeGenius** supervisa las señales de fluorescencia de la diana y del Internal Control para cada reacción y aplica automáticamente los parámetros del Assay Protocol (protocolo de ensayo) para generar las curvas de PCR que, después, se convierten en resultados.

Al finalizar la sesión, aparece automáticamente la pantalla «Results Display», En esta pantalla se muestran los resultados y la información de la sesión. Desde esta pantalla, es posible aprobar dichos resultados, así como imprimir o guardar los informes («Sample Report» o «Track Report»). Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

**NOTA!**

El **ELITE BeGenius** puede conectarse al «Laboratory Information System» (sistema de información de laboratorios, LIS), que permite cargar los resultados de la sesión en el centro de datos del laboratorio. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

El instrumento **ELITE BeGenius** genera los resultados con el producto **C. difficile ELITE MGB Kit** mediante el siguiente procedimiento:

1. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control.
2. Validación de los resultados de las muestras.
3. Generación del informe de los resultados de la muestra.

**NOTA!**

Consultar el mismo apartado del **procedimiento con el ELITE InGenius** para obtener más información.

## 12 Características de rendimiento del ELITE InGenius y del ELITE BeGenius

### 12.1 Límite de detección

La sensibilidad analítica de este ensayo, como límite de detección (LoD) de la amplificación de ADN, permite detectar la presencia de unas 10 copias en 10 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

El límite de detección de este ensayo se analizó utilizando ADN plasmídico que contenía los productos de amplificación en una concentración inicial medida con un espectrofotómetro. El ADN plasmídico se diluyó hasta un título de unas 10 copias/10 µL en presencia de 20.000 copias de Internal Control (IC)/10 µL. Esta muestra se analizó en 18 duplicados llevando a cabo la amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. y utilizando dos instrumentos **ELITE InGenius** distintos.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

**Tabla 12**

Muestras	N	positivas	negativas	Media del Ct de la toxina A	Media del Ct de la toxina B
10 copias de ADN plasmídico + 20.000 copias de Internal Control	18	18	0	35,80	36,62

La LoD se verificó analizando en el ELITE InGenius muestras clínicas negativas de heces que se enriquecieron con materiales de referencia (ZeptoMetrix) a 500 ufc/mL. El análisis se realizó utilizando los procedimientos de pretratamiento tanto con el **InhibitEX Buffer** (QIAGEN) como con el **S.T.A.R. Buffer** (Roche Diagnostics GmbH).

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

**Tabla 13**

Muestra de heces	Título (ufc/mL)	N	Toxina B		Toxina A		tasa porcentual de positividad
			Positivas	Negativas	Positivas	Negativas	
Pretratamiento con el S.T.A.R Buffer	50-0	30	30	0	29	1	100 %
Pretratamiento con el Inhibitex Buffer	50-0	30	30	0	30	0	100 %

El valor del LoD de 500 ufc/mL se verificó analizando en el ELITE BeGenius muestras de heces naturales con material de referencia, y los resultados obtenidos confirmaron la concentración declarada.

## 12.2 Equivalencia de pretratamiento de la matriz

La equivalencia del pretratamiento pde la matriz entre el producto **InhibitEX Buffer** (QIAGEN) y el producto **S.T. A. R. buffer** (Roche Diagnostics GmbH) se verificó utilizando muestras de heces naturales supuestamente negativas recogidas de diferentes pacientes, y las mismas muestras enriquecidas con materiales de referencia (ZeptoMetrix) a una concentración de 3 veces el LoD.

Los resultados del porcentaje de concordancia negativa se muestran en la tabla siguiente.

**Tabla 14**

Muestra de heces negativa	N	Toxina B		Toxina A		% de concordancia negativa
		Positivas	Negativas	Positivas	Negativas	
Pretratamiento con el STAR Buffer	26	1	25	0	26	96,2 %
Pretratamiento con el Inhibitex Buffer	26	1	25	0	26	96,2 %

Los resultados del porcentaje de concordancia positiva se muestran en la tabla siguiente.

**Tabla 15**

Muestra de heces enriquecida	N	Toxina B		Toxina A		% de concordancia positiva
		Positivas	Negativas	Positivas	Negativas	
Pretratamiento con el STAR Buffer	25	25	0	25	0	100 %
Pretratamiento con el Inhibitex Buffer	25	25	0	25	0	100 %

### 12.3 Análisis con material de referencia certificado

El rendimiento del producto se evaluó utilizando el material de referencia calibrado «Clostridium difficile 017 Evaluation Panel» (Qnostics, Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados utilizando productos de ELITechGroup S.p.A. junto con el instrumento **ELITE InGenius**.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

**Tabla 16 Análisis con el «Clostridium difficile 017 Evaluation Panel»**

Muestra	Contenido de la muestra	Título nominal (ufc/mL)	Positivas/Duplicados
CD1421749	<i>C. difficile</i> A-B+	$8,0 \times 10^4$	2/2
CD1421759	<i>C. difficile</i> A-B+	$8,0 \times 10^5$	2/2
CD1421769	<i>C. difficile</i> A-B+	$8,0 \times 10^6$	2/2
CD142CS53	<i>C. sordellii</i> A-B-	$2,1 \times 10^5$	0/2

Todas las muestras se detectaron correctamente.

Se llevó a cabo otro análisis utilizando el material de referencia calibrado «Clostridium difficile 027 Evaluation Panel» (Qnostics, Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados utilizando productos de ELITechGroup S.p.A. junto con el instrumento **ELITE InGenius**. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

**Tabla 17 Análisis con el «Clostridium difficile 027 Evaluation Panel»**

Muestra	Contenido de la muestra	Título nominal (ufc/mL)	Positivas/Duplicados
CD1422737	<i>C. difficile</i> A+B+	$5,0 \times 10^3$	2/2
CD1422747	<i>C. difficile</i> A+B+	$5,0 \times 10^4$	2/2
CD1422757	<i>C. difficile</i> A+B+	$5,0 \times 10^5$	2/2
CD1422767	<i>C. difficile</i> A+B+	$5,0 \times 10^6$	2/2

Todas las muestras se detectaron correctamente.

El rendimiento del producto también se evaluó utilizando el material de referencia «QCMD 2013 Clostridium difficile EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido), un panel de diluciones de *C. difficile* que se encontraban dentro del límite de concentración. Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados utilizando productos de ELITechGroup S.p.A. junto con el instrumento **ELITE InGenius**.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

**Tabla 18 Análisis con el «QCMD 2013 Clostridium difficile EQA Panel»**

Muestra	Contenido de la muestra	Título nominal (ufc/mL)	Estado de la muestra	Pos./Dup.
CD13-01	<i>C. difficile</i> 027	$4,6 \times 10^5$	Detectado con frecuencia	2/2
CD13-02	<i>C. difficile</i> 017	$8,0 \times 10^6$	Detectado con frecuencia	2/2
CD13-03	Cd negativo	-	Negativas	0/2
CD13-04	<i>C. difficile</i> 027	$4,6 \times 10^6$	Detectada	2/2

**Tabla 18 Análisis con el «QCMD 2013 Clostridium difficile EQA Panel» (continued)**

Muestra	Contenido de la muestra	Título nominal (ufc/mL)	Estado de la muestra	Pos./Dup.
CD13-05	<i>C. difficile</i> 027	4,6×10 <sup>6</sup>	Detectado con frecuencia	2/2
CD13-06	<i>C. difficile</i> 017	8,0×10 <sup>5</sup>	Detectado con frecuencia	2/2
CD13-07	<i>C. difficile</i> 027	4,6×10 <sup>3</sup>	Detectada	2/2
CD13-08	<i>C. sordellii</i>	2,1×10 <sup>5</sup>	Negativas	0/2
CD13-09	<i>C. difficile</i> 027	4,6×10 <sup>5</sup>	Detectado con frecuencia	2/2
CD13-10	<i>C. difficile</i> 017	8,0×10 <sup>4</sup>	Detectada	2/2

Todas las muestras se detectaron correctamente.

#### 12.4 Reproducibilidad con material de referencia

La reproducibilidad de los valores Ct obtenidos con el producto C. difficile ELITE MGB Kit junto con el instrumento ELITE InGenius se evaluó analizando el material de referencia «NATrol™ C. difficile Verification Panel» (ZeptoMetrix, EE. UU.), que contenía los ribotipos 002, 017, 078 y 027.

La reproducibilidad se obtuvo analizando las muestras del panel en duplicados y en dos sesiones al día. Se analizaron tres lotes diferentes de producto en tres días distintos, en tres instrumentos distintos y con tres operadores distintos.

Los valores Ct de los genes de la toxina A y la toxina B se utilizaron para calcular el coeficiente de variación porcentual (%CV) con el fin de evaluar la reproducibilidad como imprecisión.

En la tabla siguiente se muestra un resumen de los resultados.

**Tabla 19**

Muestra	Gen de la toxina A				Gen de la toxina B			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
<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. sordellii</i>	0/12	-	-	-	0/12	-	-	-

La reproducibilidad de los valores Ct para las dos dianas mostró un %CV bajo que no superó el 2 %.

Además, la reproducibilidad de los valores relativos a la temperatura de fusión (Tm) y obtenidos utilizando productos de ELITechGroup S.p.A. junto con el instrumento ELITE InGenius se evaluó analizando el material de referencia «NATrol™ C. difficile Verification Panel» (ZeptoMetrix, EE. UU.).

La reproducibilidad se obtuvo analizando las muestras del panel en duplicados y en dos sesiones al día. Se analizaron tres lotes diferentes de producto en tres días distintos, en tres instrumentos distintos y con tres operadores distintos.

Los valores de Tm de los genes de la toxina A y la toxina B se utilizaron para calcular el %CV con el fin de evaluar la reproducibilidad como imprecisión.

En la tabla siguiente se muestra un resumen de los resultados.

Tabla 20

Muestra	Gen de la toxina A				Gen de la toxina B			
	N	Tm media	DE	%CV	N	Tm media	DE	%CV
<i>C. difficile</i> 002	12	64,78	0,16	0,25	12	60,73	0,22	0,37
<i>C. difficile</i> 017	12	64,59	0,10	0,15	12	60,58	0,29	0,48
<i>C. difficile</i> 078	12	64,55	0,09	0,14	12	60,57	0,28	0,47
<i>C. difficile</i> 027-1	12	64,73	0,17	0,26	12	62,98	0,22	0,35
<i>C. difficile</i> 027-2	12	64,68	0,12	0,19	12	63,12	0,23	0,37

La reproducibilidad de los valores de Tm para las dos dianas mostró un %CV bajo que no superó el 0,5 %.

Cabe reseñar que, si bien la Tm para el gen de la toxina A fue muy similar para todos los ribotipos de *C. difficile* analizados, la Tm para el gen de la toxina B mostró una división en dos grupos, uno que incluía los ribotipos 002, 017 y 078 de *C. difficile* y otro que contenía la cepa hipervirulenta del ribotipo 027 de *C. difficile*.

En la tabla siguiente se incluye un resumen del análisis agrupado.

Tabla 21

Muestra	Gen de la toxina A				Gen de la toxina B			
	N	Tm media	DE	%CV	N	Tm media	DE	%CV
<i>C. difficile</i> 002, 017, 078	60	64,67	0,15	0,24	36	60,63	0,27	0,45
<i>C. difficile</i> 027, cepa hipervirulenta					24	63,05	0,23	0,37

Este agrupamiento se debe a polimorfismos de dos nucleótidos en la región de hibridación de la sonda correspondiente al gen de la toxina B compartida por la cepa hipervirulenta de *C. difficile* ribotipo 027 (p. ej., cepa R 12087, SEQID HM062510; cepa UK1, SEQID KC292158; cepa CD196, SEQID FN538970) y otras cepas de *C. difficile* positivas para la toxina binaria de subtipo 2 (p. ej., cepa R9385, ribotipo 122, SEQID HM062502; cepa R10870, ribotipo 111, SEQID HM062497; cepa CH6230, ribotipo 251, SEQID HM062509; cepa J9965, SEQID HM062500).

Basándose en los resultados, puede definirse un valor de corte de Tm de 62,0 °C para identificar la supuesta presencia de la cepa hipervirulenta de *C. difficile* ribotipo 027, tal como se muestra en la tabla incluida a continuación.

Tabla 22

Valores de Tm del gen de la toxina B				
Otras cepas de <i>C. difficile</i>		Valor de corte de Tm	Supuestamente cepa hipervirulenta de <i>C. difficile</i> 027	
Tm media	Tm media + 4 DE		Tm media - 4 DE	Tm media
60,63	61,71	62,00	62,12	63,05

## 12.5 Marcadores potencialmente interferentes: Interferencia

La inhibición provocada por marcadores potencialmente interferentes se evaluó mediante el análisis de un panel de ácidos nucleicos purificados a una alta concentración (al menos  $10^5$  copias/reacción), inclusive los microorganismos siguientes: *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*.

Los ADN genómicos de cada microorganismo a alta concentración (al menos  $10^5$  copias/reacción) se enriquecieron con ADN genómico de *Clostridioides difficile* (Vircell Microbiologists, España, código MBC043), que se utilizó como material de referencia a una concentración de aproximadamente 3 veces el LoD (1500 ufc/mL) y, después, se añadieron 20.000 copias/reacción de la plantilla del Internal Control (CPE - Internal Control) para imitar las muestras clínicas extraídas.

También se analizaron muestras de referencia con las dianas de interés, pero sin los microorganismos potencialmente interferentes.

Cada microorganismo se analizó en 6 duplicados, que se colocaron en posiciones aleatorias en el ELiTe InGenius utilizando el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).

En las tablas siguientes se muestra un resumen de los resultados.

**Tabla 23**

Muestra	N		Ct medio			% de concordancia positiva	Resultado
	Toxina B	Toxina A	Toxina B	Toxina A	IC		
Referencia (Cdif)	6/6	6/6	37,29	37,08	24,41	100 %	Sin inhibición
Cdif + AH-BF-VC	6/6	6/6	36,97	36,57	24,27	100 %	Sin inhibición
Cdif + HP-SC-PS	6/6	6/6	37,33	37,42	23,92	100 %	Sin inhibición
Cdif + KP-Ecoli-SM	6/6	6/6	37,56	37,64	23,67	100 %	Sin inhibición
Cdif + AB-Bifido-CA	6/6	6/6	37,93	38,37	24,26	100 %	Sin inhibición
Cdif + CF-Cnex-PM	6/6	6/6	38,55	38,00	24,26	100 %	Sin inhibición
Cdif + PA-EC-GL	6/6	6/6	38,66	38,11	24,16	100 %	Sin inhibición
Cdiff+ EH	6/6	6/6	38,26	37,90	23,94	100 %	Sin inhibición
Cdiff+ CP	6/6	6/6	38,03	38,29	23,97	100 %	Sin inhibición
Cdiff-Adeno	6/6	6/6	37,81	37,49	23,64	100 %	Sin inhibición
Cdiff-Entero	6/6	6/6	37,62	37,86	23,03	100 %	Sin inhibición
Cdiff-Astro	6/6	6/6	37,58	37,34	24,11	100 %	Sin inhibición
Cdiff-Noro	6/6	6/6	37,75	37,90	24,22	100 %	Sin inhibición
Cdiff-Sapo	6/6	6/6	37,21	36,92	23,92	100 %	Sin inhibición
Cdiff-Rota	6/6	6/6	37,74	37,45	22,90	100 %	Sin inhibición
Cdiff-Cnex	6/6	6/6	37,59	36,77	24,03	100 %	Sin inhibición

Ninguno de los microorganismos potencialmente interferentes analizados mostró inhibición de la amplificación de la diana de *C. difficile* cuando se utilizó el producto **C. difficile ELiTe MGB Kit**.

## 12.6 Marcadores potencialmente interferentes: reactividad cruzada

La ausencia de reactividad cruzada con los microorganismos potencialmente interferentes también se verificó analizando un panel de ácidos nucleicos purificados a partir de microorganismos diferentes tal como se indica en la sección «Marcadores potencialmente interferentes: interferencia» de este documento.

A los ADN genómicos de cada microorganismo a alta concentración (al menos  $10^5$  copias/reacción) se les añadieron 20.000 copias/reacción de la plantilla del Internal Control (CPE - Internal Control) para imitar las muestras clínicas extraídas.

También se analizaron muestras de referencia con las dianas de interés, pero sin los microorganismos potencialmente interferentes.

Cada microorganismo se analizó en 6 duplicados, que se colocaron en posiciones aleatorias en el ELITE InGenius utilizando el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).

En las tablas siguientes se muestra un resumen de los resultados.

**Tabla 24**

Muestra	Positivas/Duplicados		Ct medio del IC	% de concordancia negativa	Resultado
	Toxina A	Toxina B			
Referencia	0/6	0/6	24,55	100 %	Sin reactividad cruzada
AH-BF-VC	0/6	0/6	23,77	100 %	Sin reactividad cruzada
HP-SC-PS	0/6	0/6	23,72	100 %	Sin reactividad cruzada
KP-Ecoli-SM	0/6	0/6	23,85	100 %	Sin reactividad cruzada
AB-Bifido-CA	0/6	0/6	25,58	100 %	Sin reactividad cruzada
CF-Cnex-PM	0/6	0/6	25,50	100 %	Sin reactividad cruzada
PA-EC-GL	0/6	0/6	23,90	100 %	Sin reactividad cruzada
CP-EH-Enteroc	0/6	0/6	23,77	100 %	Sin reactividad cruzada
Adeno-Astro-Noro	0/6	0/6	23,87	100 %	Sin reactividad cruzada
Rota-Sapo	0/6	0/6	23,84	100 %	Sin reactividad cruzada
<i>C. nexile</i>	0/6	6/6	23,74	0 %	reactividad cruzada

Ninguno de los marcadores potencialmente interferentes mostró reactividad cruzada para la diana de *C. difficile* cuando se utilizó el producto C. difficile ELITE MGB Kit, con la excepción de la cepa VPI C48-37 de *Clostridium nexile*, que mostró reactividad cruzada con la reacción de amplificación para el gen de la toxina B.

## 12.7 Sustancias potencialmente interferentes

El efecto de las sustancias potencialmente interferentes se evaluó analizando las sustancias endógenas o exógenas que pueden encontrarse en las muestras de heces naturales (matriz más difícil), dentro de los límites clínicamente pertinentes. En concreto, se analizaron las sustancias exógenas y endógenas que se incluyen en la tabla siguiente, conforme a lo estipulado en la directriz EP37 Ed1E del CLSI,

Tabla 25

Sustancia interferente	Principio activo/Producto	ID	Concentración
Enemas	Aceite de vaselina	VAS	20 mg/mL
Lubricante espermicida	Nonoxinol -9	NON	1,2% v/v
Fármacos antidiarreicos	Subsalicilato de bismuto	BISM	0,87 mg/mL
	Hidrocloruro de loperamida	LOP	0,005 mg/mL
Laxantes	Bisacodilo	BISA	0,25 mg/mL
Antibióticos	Azitromicina	AZI	10 µg/mL
	Vancomicina	VAN	0,12 mg/mL
	Metronidazol	MET	0,12 mg/mL
	Ampicilina	AMP	0,08 mg/mL
	Cefpodoxima	CEF	4,5 µg/mL
	Ciprofloxacino	CIP	5 µg/mL
Antinflamatorios	Hidrocortisona	HYD	3 mg/mL
Antiácidos	Carbonato cálcico	CAL	0,5 mg/mL
	Ácido algínico	ALG	0,01 mg/mL
	Hidróxido de aluminio	ALU	0,03 mg/mL
	Trisilicato de magnesio	MAG	0,01 mg/mL
Sangre	Hemoglobina, inmunoglobulinas, ácidos nucleicos, etc.	WB	5% v/v
Componentes fecales	Mucina	MUC	3 mg/mL
	Ácido hexadecanoico	PAL	0,85 mg/mL
	Ácido esteárico	STE	0,85 mg/mL

Las sustancias potencialmente interferentes se analizaron en 6 grupos de 3 sustancias. Se analizaron por separado muestras de mucina, cefpodoxima, ciprofloxacino, hidrocortisona y sangre.

El material de referencia «Clostridioides difficile NAP1» (ZeptoMetrix) se enriqueció en muestras de heces naturales a una concentración de aproximadamente 3 veces el LoD.

También se analizaron muestras de referencia con las dianas de interés, pero sin las sustancias potencialmente interferentes.

Cada microorganismo se analizó en 6 duplicados, que se colocaron en posiciones aleatorias en el **ELITE InGenius** utilizando el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

En las tablas siguientes se muestra un resumen de los resultados.

Tabla 26

Muestra	Positivas/ Duplicados		Ct medio			% de concordancia positiva		Resultado
	Toxina B	Toxina A	Toxina B	Toxina A	IC	Toxina B	Toxina A	
Referencia (Cdiff)	6/6	6/6	34,68	34,53	25,35	100 %	100 %	Sin inhibición
Cdiff+ VAN+MET+AMP	6/6	6/6	36,43	36,53	25,54	100 %	100 %	Sin inhibición
Cdiff+LOP+BISA+AZI	6/6	6/6	36,31	36,27	25,46	100 %	100 %	Sin inhibición
Cdiff+ ALG+ALU+MAG	6/6	6/6	36,41	36,48	25,72	100 %	100 %	Sin inhibición
Cdiff+ WB	6/6	6/6	35,64	35,41	25,72	100 %	100 %	Sin inhibición
Cdiff+VAS+NON+BISM	6/6	6/6	34,75	34,31	25,36	100 %	100 %	Sin inhibición
C.dif+CAL+PAL+STE	6/6	6/6	35,95	36,20	25,70	100 %	100 %	Sin inhibición
C.dif+MUC	6/6	6/6	36,96	37,24	25,70	100 %	100 %	Sin inhibición
Cdiff+ CEF	6/6	6/6	35,14	34,93	25,69	100 %	100 %	Sin inhibición
Cdiff+ CIP	6/6	6/6	34,96	34,54	25,79	100 %	100 %	Sin inhibición
Cdiff+ HYD	6/6	6/6	34,85	34,26	25,86	100 %	100 %	Sin inhibición

Ninguna de las sustancias potencialmente interferentes analizadas mostró inhibición de la amplificación de la diana de *C. difficile* cuando se utilizó el producto **C. difficile ELITE MGB Kit**.

## 12.8 Sustancias potencialmente interferentes: reactividad cruzada

La ausencia de reactividad cruzada con sustancias potencialmente interferentes también se verificó analizando las sustancias endógenas o exógenas que pueden encontrarse en las muestras de heces naturales (matriz más difícil) dentro de los límites clínicamente pertinentes, tal como se indica en la sección «Sustancias potencialmente interferentes» de este documento.

Las sustancias potencialmente interferentes se analizaron en 6 grupos de 3 sustancias. Se analizaron por separado muestras de mucina y de sangre.

A cada muestra se le añadieron 20.000 copias/reacción de la plantilla del Internal Control (CPE - Internal Control) con el fin de imitar las muestras clínicas extraídas.

También se analizó una muestra de referencia sin las sustancias potencialmente interferentes.

Cada muestra se extrajo y amplificó en 6 duplicados, que se colocaron en posiciones aleatorias en el instrumento ELITE InGenius utilizando el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Cada microorganismo se analizó en 6 duplicados, que se colocaron en posiciones aleatorias en el ELITE InGenius utilizando el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

En las tablas siguientes se muestra un resumen de los resultados.

Tabla 27

Muestra	Positivas/Duplicados		Ct medio del IC	% de concordancia negativa	Resultado
	Toxina A	Toxina B			
Referencia	0/6	0/6	25,91	100 %	Sin reactividad cruzada

Tabla 27 (continued)

LOB+BISA+AZI	0/6	0/6	25,69	100 %	Sin reactividad cruzada
VAN+MET+AMP	0/6	0/6	25,58	100 %	Sin reactividad cruzada
ALG+ALU+MAG	0/6	0/6	25,79	100 %	Sin reactividad cruzada
CEF+CIP+HYD	0/6	0/6	25,77	100 %	Sin reactividad cruzada
WB	0/6	0/6	25,50	100 %	Sin reactividad cruzada
VAS+NON+BISM	0/6	0/6	25,88	100 %	Sin reactividad cruzada
CAL+PAL+STE	0/6	0/6	25,64	100 %	Sin reactividad cruzada
MUC	0/6	0/6	25,63	100 %	Sin reactividad cruzada

Ninguna de las sustancias potencialmente interferentes analizadas mostró reactividad cruzada para la diana de *C. difficile* cuando se utilizó el producto **C. difficile ELITE MGB Kit**.

## 12.9 Repetibilidad

La repetibilidad del ensayo se evaluó en el ELITE InGenius y el ELITE BeGenius analizando un panel de muestras de heces naturales negativas o enriquecidas con material de referencia de *C. difficile* (Zeptomatrix).

En las tablas siguientes se incluye un ejemplo de repetibilidad dentro de las sesiones (en un día).

Tabla 28 Repetibilidad dentro de las sesiones en el ELITE InGenius (día 1)

Muestra	N	Toxina B			Toxina A			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Neg	8	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	8	36,14	0,35	0,96	35,74	0,57	1,59	100 %
10 veces el LoD	8	33,68	0,33	0,99	33,05	0,39	1,19	100 %

Tabla 29 Repetibilidad dentro de las sesiones en el ELITE BeGenius (día 1)

Muestra	N	Toxina B			Toxina A			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Neg	8	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	8	36,84	0,37	1,01	36,31	0,51	1,41	100 %
10 veces el LoD	8	34,12	0,44	1,29	33,17	0,45	1,35	100 %

En las tablas siguientes se incluye un ejemplo de repetibilidad entre sesiones (en dos días).

**Tabla 30 Repetibilidad entre sesiones con el ELITE InGenius**

Muestra	N	Toxina B			Toxina A			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Neg	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	16	36,11	0,35	0,96	35,75	0,44	1,22	100 %
10 veces el LoD	16	33,51	0,31	0,93	32,88	0,41	1,24	100 %

**Tabla 31 Repetibilidad entre sesiones con el ELITE BeGenius**

Muestra	N	Toxina B			Toxina A			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Neg	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	16	36,73	0,39	1,06	36,03	0,61	1,70	100 %
10 veces el LoD	16	33,97	0,39	1,16	33,02	0,47	1,44	100 %

En la prueba de repetibilidad, el producto C. difficile ELITE MGB Kit detectó todas las muestras tal como se esperaba y presentó una variación máxima de los valores de Ct de la diana como un %CV inferior al 5 %.

## 12.10 Reproducibilidad

La reproducibilidad del ensayo se evaluó en el ELITE InGenius y el ELITE BeGenius analizando un panel de muestras de heces naturales negativas o enriquecidas con material de referencia de *C. difficile* (Zeptomatrix).

En las tablas siguientes se incluyen los resultados de la prueba de reproducibilidad entre lotes (en dos lotes).

**Tabla 32 Reproducibilidad entre lotes en el ELITE InGenius**

Muestra	N	Toxina B			Toxina A			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Neg	8	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	8	36,22	0,67	1,85	35,24	0,28	0,78	100 %
10 veces el LoD	8	33,86	0,27	0,81	32,72	0,34	1,05	100 %

**Tabla 33 Reproducibilidad entre lotes en el ELITE BeGenius**

Muestra	N	Toxina B			Toxina A			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Neg	8	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	8	36,47	0,61	1,69	34,63	0,44	1,28	100 %
10 veces el LoD	8	33,92	0,24	0,72	32,20	0,23	0,72	100 %

En las tablas siguientes se incluye un ejemplo de la reproducibilidad entre instrumentos (en dos instrumentos).

**Tabla 34 Reproducibilidad entre instrumentos en el ELITE InGenius**

Muestra	N	Toxina B			Toxina A			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Neg	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	16	35,74	0,27	0,75	34,92	0,34	0,96	100 %
10 veces el LoD	16	33,41	0,69	2,05	32,47	0,59	1,82	100 %

**Tabla 35 Reproducibilidad entre instrumentos en el ELITE BeGenius**

Muestra	N	Toxina B			Toxina A			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Neg	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	16	36,26	0,46	1,27	34,74	0,63	1,81	100 %
10 veces el LoD	16	33,55	0,35	1,03	32,04	0,36	1,13	100 %

En la prueba de reproducibilidad, el producto C. difficile ELITE MGB Kit detectó todas las muestras tal como se esperaba y presentó una variación máxima de los valores de Ct de la diana como un %CV inferior al 5 %.

### 12.11 Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras negativas, se evaluó analizando en el ELITE InGenius muestras clínicas de heces certificadas como negativas para ADN de *C. difficile*.

Como el ELITE BeGenius presenta un rendimiento analítico equivalente al del ELITE InGenius, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Así pues, la especificidad diagnóstica del ensayo obtenida con el ELITE InGenius también es aplicable al ELITE BeGenius.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

**Tabla 36**

Heces negativas	N	Positivas	Negativas	% de especificidad diagnóstica
<i>C. difficile</i>	45	1	44	97,8 %

El valor de corte del IC se ha establecido a 32 tanto para el ELITE InGenius como para el ELITE BeGenius.

### 12.12 Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó en el ELITE InGenius analizando muestras clínicas de heces certificadas como positivas para ADN de *C. difficile*.

Como el ELITE BeGenius presenta un rendimiento analítico equivalente al del ELITE InGenius, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Por lo tanto, la sensibilidad diagnóstica del ensayo obtenida con el ELITE InGenius también es aplicable al ELITE BeGenius.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 37

Heces positivas	N	Positivas	Negativas	% de sensibilidad diagnóstica
C. difficile	30	30	0	100 %

**NOTA!**

Los datos y resultados completos de los análisis realizados para evaluar las características de rendimiento del producto con las matrices y los instrumentos correspondientes se incluyen en la documentación técnica del producto C. difficile ELITe MGB Kit, FTP M800358.

**13 MUESTRAS Y CONTROLES PARA OTROS SISTEMAS****13.1 Muestras**

Este producto debe utilizarse con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: heces líquidas o no formadas.

Las muestras de heces concebidas para la extracción de ADN deben recogerse siguiendo los procedimientos estándar para la recogida y manipulación de heces, así como identificarse conforme a las directrices para laboratorios. La muestra de heces en bruto debe precintarse en un recipiente estéril con tapón de rosca que evite un vertido accidental del contenido, así como transportarse siguiendo todas las normativas pertinentes aplicables al transporte de agentes etiológicos. Conservar las muestras refrigeradas (a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C) durante un máximo de 48 horas antes del procesamiento. Si la clarificación de las heces no puede realizarse en las 48 horas siguientes a la recogida, conservar las muestras a una temperatura igual o inferior a -70 °C.

Preparar una probeta etiquetada de 1,5 mL para cada muestra de heces en bruto y distribuir 0,8 mL de tampón S. T.A.R. Buffer en la probeta. Mezclar la muestra de heces en bruto en un vórtex y, a continuación, utilizar una pipeta con una punta resistente a los aerosoles para verter aproximadamente 200 µL de la muestra de heces en bruto en la

probeta de 1,5 mL que contiene el tampón S.T.A.R Buffer (en el caso de muestras de heces densas, utilizar para ello una punta de agujero ancho o una espátula de plástico según sea necesario). Tapar la probeta de forma segura y, después, mezclarla en vórtex (durante 20 a 30 segundos). Centrifugar la solución homogeneizada a 13.000×g (RCF) durante un minuto para clarificar la muestra. Transferir con cuidado de 400 a 650 µL del sobrenadante de heces clarificadas a una probeta secundaria etiquetada, teniendo cuidado de no alterar el material de heces caprinas. Consultar las instrucciones de uso del kit de extracción para identificar los volúmenes y las probetas secundarias compatibles con los sistemas de extracción. Conservar las heces clarificadas a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C durante un máximo de 7 horas antes de realizar la extracción.

**NOTA!**

El tampón S.T.A.R. Buffer debe conservarse a temperatura ambiente. Durante este tiempo, pueden formarse precipitados de color blanco. Así pues, antes de comenzar con el procedimiento de extracción, comprobar si se han formado precipitados y, en caso afirmativo, calentar la solución a una temperatura comprendida entre 30 °C y 40 °C en un baño María o en una estufa incubadora hasta que dichos precipitados se hayan disuelto.

**NOTA!**

Para procesar muestras de heces clarificadas con el **sistema ELITe STAR** y la **versión 3.4.13 del software** (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción **UUNI\_E100\_S200\_ELI**, que utiliza 200 µL de muestra y eluye el extracto en 100 µL (la elución se desarrolla realmente en 115 µL, de los cuales se recuperan 100 µL). Después de verterlo en la probeta secundaria, cargar las muestras clarificadas en el **ELITe STAR**. Para cada muestra se necesita siempre un volumen mínimo de 400 a 600 µL. Añadir **50 µL de CPE - Internal Control** y **750 µL de agua para biología molecular** en una **probeta con portador de proteina**, tal como se indica en las instrucciones de uso del kit de extracción. Para obtener información sobre el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit.

Conservar los ácidos nucleicos purificados a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C si van a utilizarse el mismo día de la extracción, o a una temperatura inferior a -20 °C si van a conservarse durante más tiempo.

### NOTA!

Para procesar muestras de heces clarificadas con el **sistema ELITE GALAXY** y la **versión 1.3.1 del software** (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción **xNA Extraction (Universal)**, que utiliza 300 µL de muestra y eluye el extracto en 100 µL (la elución se desarrolla realmente en 110 µL, de los cuales se recuperan 100 µL). Después de verterlo en la probeta secundaria, cargar las muestras clarificadas en el **ELITE GALAXY**. Para cada muestra se necesita siempre un volumen mínimo de 400 a 650 µL, según la clase de probeta utilizada. Añadir **2,5 µL/muestra de CPE - Internal Control** y **7,5 µL/muestra de agua para biología molecular** en una **solución portadora + IC**, tal como se indica en las instrucciones de uso del kit de extracción. Para obtener información sobre el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit.

Conservar los ácidos nucleicos purificados a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C si van a utilizarse el mismo día de la extracción, o a una temperatura inferior a -20 °C si van a conservarse durante más tiempo.

### NOTA!

Para procesar muestras de heces clarificadas con el **NucliSENS® easyMAG®**, verter 20 µL de cada muestra de heces clarificadas en el recipiente de muestras desechable del **NucliSENS easyMAG** (8 muestras por recipiente y hasta tres recipientes por serie), tal como se establece en la lista de trabajo del instrumento.

Configurar una solicitud de extracción en el sistema **NucliSENS easyMAG**, tal como se indica a continuación:

- Matriz: heces.
- Protocolo: Genérico 2.0.1.
- Volumen (mL): 0,02 mL.
- Eluido (µL): 110 µL;
- Tipo: primaria.

Crear una nueva serie de extracción que tenga un nombre de archivo unívoco y reconocible (p. ej., «año-mes-día-Extract01»), a continuación, añadir con cuidado las solicitudes de extracción a la sesión el orden en el que se colocaron en el recipiente desechable y, después, comenzar el proceso de lisis de 10 minutos.

Durante el proceso de lisis de 10 minutos, preparar la suspensión de sílice magnético para 8 muestras mezclando **550 µL de NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**, **545 µL de agua para biología molecular** y **5 µL de Internal Control de C. difficile**. Para cada muestra, utilizar la pipeta BioHit o una pipeta manual para distribuir 125 µL de la suspensión de sílice magnético al producto NucliSENS easyMAG Strip for Premix. Utilizar la pipeta BioHit para verter 100 µL de la suspensión de sílice magnético en cada muestra en el recipiente de muestras desechable de 8 pocillos, mezclar bien pipeteando arriba y abajo tres veces y, después, iniciar el procedimiento de extracción automática. Una vez completado el proceso y con el fin de evitar la contaminación de las muestras con el sílice magnético, retirar los ácidos nucleicos aislados del recipiente desechable en los 30 minutos siguientes a la finalización de la extracción.

## 13.2 Sustancias interferentes

Se ha demostrado que la presencia de sangre humana, mucina, grasas fecales o fármacos con o sin receta no interfiere en la detección de **C. difficile** toxinógena cuando se utiliza el producto **C. difficile ELITE MGB® Kit** junto con el sistema **NucliSENS® easyMAG®**.

**Tabla 38**

Sustancia potencialmente interferente	Ingrediente activo	¿Interfiere?
Antifúngico/Antiprurito vaginal	Nistatina	No
Crema/Pomadas/Supositorios	Hidrocortisona, 1 %	No
Crema antihemorroidales/Pomadas	Fenilefrina, 0,25 %	No

Tabla 38 (continued)

Sustancia potencialmente interferente	Ingrediente activo	¿Interfiere?
Antiácidos	Carbonato cálcico	No
Enema	Aceite mineral	No
Lubricante espermicida	Nonoxynol 9	No
Fármacos antidiarreicos	Hidrocloruro de loperamida	No
Fármacos antidiarreicos	Subsalicilato de bismuto	No
Laxantes	Senósidos	No
Antibióticos (orales o inyectables)	Metronidazol (oral)	No
	Ciprofloxacina (Oral)	No
	Azitromicina (oral)	No
	Vancomicina (oral)	No
	Zosyn (inyectable)	No
Antinflamatorios no esteroideos	Naproxeno sódico	No
Antinflamatorios esteroideos	Prednisona	No
Toallitas húmedas	Cloruro de benzalconio al 0,40 %	No
Toallitas húmedas	Alcohol isopropílico, 70 %	No
Grasa fecal (ácido hexadecanoico)	Ácido hexadecanoico	No
Grasa fecal (ácido esteárico)	Ácido esteárico	No
Sangre	Glucosa, hormonas, encimas, iones, hierro, etc.	No
Mucosidad	Inmunoglobulinas, lisozimas, polímeros, etc.	No

No se dispone de datos sobre la inhibición provocada por fármacos antivíricos, antibióticos, quimioterápicos o inmunosupresores.

Una alta cantidad de ADN genómico humano en el ADN extraído de la muestra puede inhibir la reacción de amplificación.

### 13.3 Controles de amplificación

Cada sesión de amplificación debe validarse con una reacción del Negative Control y una del Positive Control.

Para el Negative Control, utilizar agua para biología molecular (no incluida).

Para el Positive Control, utilizar el producto **C. difficile - ELITE Positive Control** ref. M800373 (no incluido).

### 13.4 Controles de calidad

Se recomienda validar el procedimiento entero de análisis de cada sesión de extracción y amplificación procesando una muestra con resultado negativo y una con resultado positivo o un material de referencia calibrado.

## 14 PROCEDIMIENTO CON OTROS SISTEMAS

### Configuración de la sesión de amplificación en tiempo real

Debe realizarse en el área de amplificación/detección de los productos de amplificación.

Antes de iniciar la sesión, seguir las recomendaciones del fabricante incluidas en la documentación del instrumento y, además:

- Encender el ordenador, encender el termociclador de tiempo real, ejecutar el software dedicado y abrir una sesión de «cuantificación absoluta».
- Si se utiliza el **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** de Applied Biosystems® o el **7500 Fast Real-Time PCR System** de Applied Biosystems®, seleccionar «Run mode: Fast 7500».
- Si se utiliza el **7500 Real-Time PCR System** Applied Biosystems®, se selecciona automáticamente «Run mode: Standard 7500».
- Crear un nuevo «detector» o establecer el «detector» apropiado en el menú «Tool» seleccionando el gestor de detectores.
  - Establecer el «detector» para la sonda del gen de la toxina A con el «reporter» = «VIC» (AP525 es similar a VIC) y el inactivador («quencher») y llamarlo «Toxina A».
  - Establecer el «detector» para la sonda del gen de la toxina B con el «reporter» = «FAM» y el inactivador («quencher») = «none» (no fluorescente) y llamarlo «Toxina B».
  - Establecer el «detector» para la sonda del Internal Control con el «reporter» = «Cy5» (AP642 es similar al Cy5) y el inactivador («quencher») = «none» (no - fluorescente) y llamarlo «IC».
- Ir al menú «View» (Vista), seleccionar «Well Inspector» (Inspector de pocillos) y, para cada pocillo en uso en la microplaca, establecer el «detector» (tipo de fluorescencia que debe medirse), la «referencia pasiva» = "ROX" (AP593 es similar al ROX) para la normalización de la fluorescencia medida y el tipo de reacción (muestra, Negative Control de amplificación y Positive Control de amplificación). Añadir esta información a la **hoja de trabajo** que se incluye al final de estas instrucciones de uso o imprimir la configuración de la microplaca. La **hoja de trabajo** debe seguirse estrictamente al verter la mezcla de reacción y las muestras en los pocillos.

Consultar a continuación un ejemplo de la forma en la que puede organizarse un análisis cualitativo de 12 muestras.

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

**Legenda:** S1 a S12: muestras que deben analizarse; NC: Negative Control de amplificación. PC: Positive Control de amplificación.

Siguiendo las indicaciones de la documentación del instrumento, utilizar el software dedicado y elegir «Instrument (Instrumento) > Thermal Cycler Protocol (Protocolo del termociclador) > Thermal Profile (Perfil térmico)» para definir los parámetros del **ciclo térmico**:

- Añadir un **paso de extensión a 72 °C** a la fase de amplificación (opción «Add Step»).

**NOTA!**

La adquisición de la fluorescencia con la opción «Instrument (Instrumento) > Thermal Cycler Protocol (Protocolo del termociclador) > Settings (Configuración) > Data Collection» (Recopilación de datos) debe establecerse durante el paso de hibridación a 56 °C.

- Modificar el tiempo tal como se indica en la tabla «Ciclo térmico» incluida a continuación.
- Establecer el número de ciclos a **45**.
- Establecer el volumen de reacción a **30 µL**.
- Opcional: Añadir la fase de disociación (opción «Add Dissociation Stage») y establecer una temperatura comprendida entre 40 °C y 80 °C.

**Tabla 39**

Parámetros del ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Tiempo
Descontaminación	50 °C	2 min
Desnaturalización inicial	93 °C	2 min
Amplificación y detección (45 ciclos)	93 °C	10 s
	56 °C (recopilación de datos)	30 s
	72 °C	15 s
Disociación (opcional)	95 °C	15 s
	40 °C	1 min
	80 °C	15 s
	60 °C	15 s

**Configuración de la amplificación**

Esta tarea debe realizarse en la extracción/preparación del área de la reacción de amplificación.

Antes iniciar la sesión, es necesario realizar la siguientes tareas:

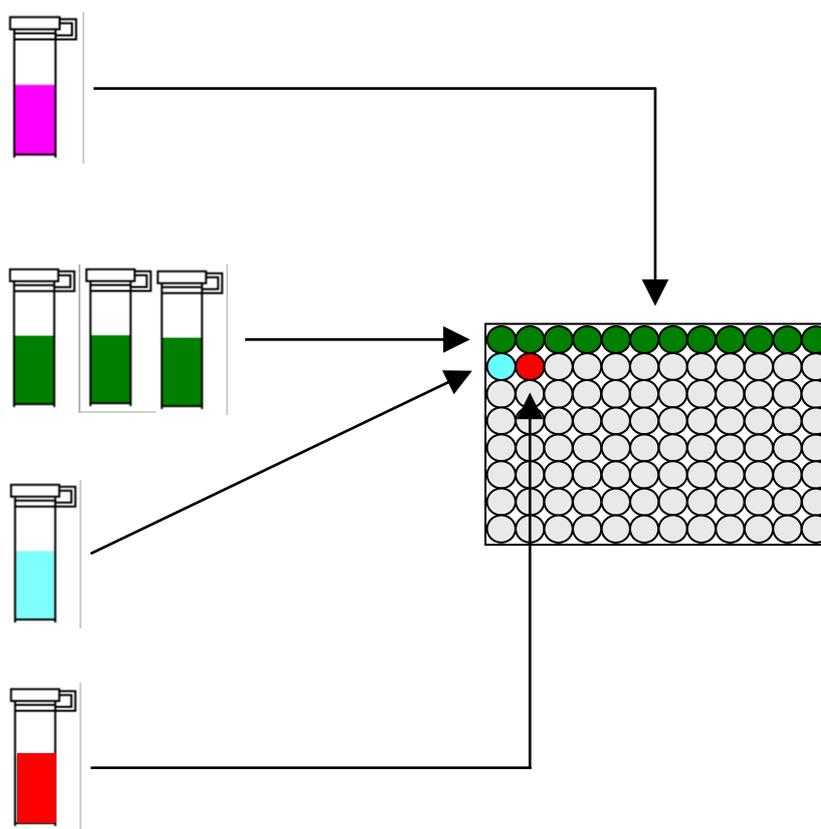
- Descongelar las probetas que contienen las muestras procesadas que van a analizarse. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo.
  - Descongelar las probetas de **C. difficile PCR Mix** necesarias para la sesión, recordando que cada una de ellas es suficiente para preparar **25 reacciones**. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo durante un máximo de cuatro horas.
  - Descongelar una probeta de **C. difficile Positive Control** (no incluida). Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo durante un máximo de cuatro horas.
  - Tomar la **microplaca de amplificación** que se utilizará durante la sesión, manipulándola con guantes sin talco y teniendo cuidado de no dañar los pocillos.
1. Distribuir de forma precisa **20 µL** del producto **C. difficile PCR Mix** en la parte inferior de los pocillos de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Evitar la formación de burbujas.

**NOTA!**

Si no se utiliza toda la mezcla de reacción, conservar el volumen que queda en un lugar protegido de la luz a -20 °C durante un máximo de un mes. Congelar y descongelar la mezcla de reacción un máximo de **cinco veces**.

2. Añadir a la mezcla de reacción **10 µL** de la primera mezcla procesada en el pocillo designado, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Proceder de la misma forma con el resto de muestras extraídas.
3. Añadir a la mezcla de reacción **10 µL** de **agua para biología molecular** (no incluida) en el pocillo del Negative Control, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**.
4. Añadir a la mezcla de reacción **10 µL** de **C. difficile Positive Control** en el pocillo designado a tal efecto, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**.
5. Sellar con precisión la **microplaca de amplificación** con la **placa adhesiva de amplificación**.
6. Si se dispone de una centrifugadora con un adaptador de placas, centrifugar la **microplaca de amplificación** para recoger la mezcla de reacción en la parte inferior de los pocillos.
7. Transferir la **microplaca de amplificación** al termociclador de tiempo real en el área de amplificación/detección de productos de amplificación e iniciar el ciclo térmico para la amplificación. Guardar los ajustes de la sesión con un nombre de archivo unívoco y reconocible (p. ej., «año-mes-día-C. difficile-EGSpA»).

La siguiente figura muestra la configuración de la reacción de amplificación.



1. **Añadir 20 µL de PCR Mix a cada pocillo**
2. **Añadir 10 µL de ADN extraídos**
3. **Añadir 10 µL de Negative Control**
4. **Añadir 10 µL de Positive Control**

### NOTA!

Si la preparación de la reacción de amplificación se realiza con el instrumento **ELITE GALAXY**, cargar la microplaca de elución, la mezcla Q-PCR Mix y la microplaca de amplificación tal como se indica en las instrucciones de uso del instrumento, siguiendo los pasos indicados en la interfaz.

**NOTA!**

Al finalizar el ciclo térmico, la **microplaca de amplificación** que contiene los productos de reacción debe extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Para evitar un derrame de los productos de reacción, **la placa adhesiva de sellado óptico no debe retirarse de la microplaca de amplificación.**

**Análisis cualitativo de los resultados**

El software del instrumento debe analizar los valores registrados de la fluorescencia emitida durante las reacciones de amplificación con la sonda del gen de la toxina A (detector VIC «Toxin A»), con la sonda del gen de la toxina B (detector FAM «Toxin B») y con la sonda del Internal Control (detector Cy5 «IC»).

Antes de iniciar el análisis, seguir las recomendaciones del fabricante incluidas en la documentación del proyecto y, además:

- Establecer los **ajustes de análisis** para todos los detectores **Auto Baseline** y **Manual Ct** utilizando el menú «Results (Resultados) > Amplification plot (Gráfico de amplificación) > delta Rn vs. Cycle (Diferencia Rn frente a ciclo)», con el **umbral** («Threshold») establecido a **0,05**. Pulsar el botón «**Analyze**» (Analizar) y **guardar** los resultados.

Los valores de la fluorescencia emitida por las sondas específicas durante la reacción de amplificación y el valor **umbral** de fluorescencia permiten determinar el **ciclo umbral (Ct)**. El valor Ct es el ciclo en el que la fluorescencia ha alcanzado el valor **umbral** y es proporcional a la cantidad diana inicial.

En la reacción de amplificación del **Positive Control**, los valores **Ct** de los detectores de la toxina A y la toxina B, en el menú «Results (Resultados) > Report (Informe)», se utilizan para validar la amplificación y la detección, tal como se describe en la tabla siguiente:

**Tabla 40**

Reacción del Positive Control Detector VIC de la toxina A	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct <35	POSITIVO	CORRECTA

**Tabla 41**

Reacción del Positive Control Detector FAM de la toxina B	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct <35	POSITIVO	CORRECTA

Si el resultado de la amplificación del Positive Control es Ct  $\geq$ 35 o Ct undetermined para los detectores de la toxina A o de la toxina B, significa que el ADN diana no se ha detectado. Esto significa que se han producido problemas durante el paso de amplificación o de detección (distribución incorrecta de la mezcla de reacción o de los controles positivos, degradación de la mezcla de reacción o de los controles positivos, configuración incorrecta de la posición del Positive Control, configuración incorrecta del ciclo térmico), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos. La sesión entera no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

En la reacción de amplificación del **Negative Control**, los valores Ct de los detectores de la toxina A, de la toxina B y del IC, en el menú «Results (Resultados) > Report (Informe)», se utilizan para validar la amplificación y la detección, tal como se describe en la tabla siguiente:

**Tabla 42**

Reacción del Negative Control Detector VIC de la toxina A	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct no determinado o Ct $\geq$ 40	NEGATIVO	CORRECTA

Tabla 43

Reacción del Negative Control Detector FAM de la toxina B	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct no determinado o Ct $\geq 40$	NEGATIVO	CORRECTA

Tabla 44

Reacción del Negative Control Detector Cy5 del IC	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct no determinado o Ct $\geq 34$	NEGATIVO	CORRECTA

Si el resultado de la amplificación del **Negative Control** es **Ct <40** para los detectores de la toxina A y la toxina B, o **Ct <34** para el detector del IC, significa que el ADN diana no se ha detectado correctamente. Esto significa que se han producido problemas durante el paso de amplificación (contaminación), lo que puede dar lugar a resultados falsos positivos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

En cada reacción de amplificación de la **muestra**, los valores **Ct** de los detectores de la toxina A o la toxina B se utilizan para detectar el ADN diana, mientras que el valor de **Ct** del Internal Control se utiliza para validar la extracción, la amplificación y la detección.

### NOTA!

Comprobar con el software del instrumento, utilizando «Results (Resultados) > Amplification plot (Gráfico de amplificación) > delta Rn vs Cycle» (Diferencia RN frente a ciclo), que el **Ct** se haya determinado mediante un aumento rápido y regular de la fluorescencia, y no mediante picos o un aumento del fondo (fondo irregular o alto).

Los valores **Ct** de las reacciones de amplificación de cada **muestra**, en el menú «Results (Resultados) > Report (Informe)», se utilizan tal como se describe en la siguiente tabla:

Tabla 45

Reacción de la muestra			Resultado del ensayo
Detector VIC de la toxina A	Detector FAM de la toxina B	Detector Cy5 del IC	
Undetermined o Ct $\geq 40$	Undetermined o Ct $\geq 40$	Ct <34	Negativas
		Undetermined o Ct $\geq 34$	No válida
Determined, Ct < 40	Undetermined o Ct $\geq 40$	No aplicable	Positivas
Undetermined o Ct $\geq 40$	Determined, Ct < 40	No aplicable	Positivas
Determined, Ct < 40	Determined, Ct < 40	No aplicable	Positivas

Tabla 46

Resultado del ensayo	Interpretación de los resultados
Negativas	<b>No se ha detectado gen de la toxina A ni gen de la toxina B de <i>C. difficile</i></b> en la muestra. La muestra es negativa para <i>C. difficile</i> toxinógena o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo.
No válida	<b>Resultado no válido del ensayo.</b> Repetir la sesión de extracción de la misma muestra o realizar una nueva extracción a partir de una nueva muestra.
Positivas	<b>Se ha detectado gen de la toxina A o gen de la toxina B de <i>C. difficile</i></b> en la muestra. La muestra es positiva para <i>C. difficile</i> y podría ser <b>toxinógena</b> .

La presencia del gen de la toxina A o del gen de la toxina B, o bien de ambos marcadores, es un indicio de la presencia de *C. difficile* toxinógena.

Si el resultado de la reacción de amplificación de la muestra es **Ct undetermined** o **Ct ≥40** para los detectores de la toxina A y la toxina B y **Ct undetermined** o **Ct ≥34** para el detector del Internal Control, significa que ha sido imposible detectar correctamente las dianas y el ADN del Internal Control. En este caso, se han producido problemas durante el paso de amplificación (amplificación ineficaz o ausencia de amplificación) o durante el paso de extracción (degradación del ADN, pérdida de este durante la extracción o arrastre de inhibidores en el ADN extraído), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y a falsos negativos. En este caso, la muestra no es apta; la sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de extracción de la muestra o de una nueva muestra del mismo paciente.

Si el resultado de la amplificación de la muestra es **Ct undetermined** o **Ct ≥40** para los detectores de la toxina A o la toxina B y **Ct <34** para el detector del Internal Control, significa que no se ha detectado ADN de *C. difficile* toxinógena en la muestra procesada. Se supone que la muestra es negativa. No obstante, puede que el número de microorganismos de la muestra se encuentre por debajo del límite de detección del producto (consulte el apartado «Características de rendimiento»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

### NOTA!

Cuando se detecta ADN de la toxina A o la toxina B en la muestra, el detector del Internal Control puede ser **Ct undetermined** o **Ct ≥34**. De hecho, la alta eficacia de la amplificación del ADN del gen de la toxina A y la toxina B puede competir con la baja eficacia de la amplificación del Internal Control. En este caso, la muestra es apta y el resultado positivo del ensayo es válido.

## 15 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO CON OTROS SISTEMAS

### 15.1 Rendimiento clínico

Las características de rendimiento del producto **C. difficile ELITE MGB Kit** cuando se utilizaron muestras de heces y el sistema **ELITE STAR** se determinaron analizando un panel de muestras clínicas evaluadas previamente utilizando el análisis de un cultivo de citotoxicidad de *C. difficile* como método de referencia. Se analizaron un total de 82 muestras fecales, 30 positivas y 52 negativas. Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

Tabla 47

C. difficile ELITE MGB Kit	Método de referencia		
	Resultado positivo para toxina de <i>C. difficile</i>	Resultado negativo para toxina de <i>C. difficile</i>	Total
Positivas para <i>C. difficile</i> toxinógena	29	4	33
Negativas para <i>C. difficile</i> toxinógena	1	48	49

Tabla 47 (continued)

C. difficile ELITE MGB Kit	Método de referencia		
	Resultado positivo para toxina de C. difficile	Resultado negativo para toxina de C. difficile	Total
Muestras totales válidas para el análisis	30	52	82
Sensibilidad diagnóstica (porcentaje de concordancia positiva)	97 %	-	
Especificidad diagnóstica (porcentaje de concordancia negativa)	-	92 %	

Comparado con el método de referencia, el producto **C. difficile ELITE MGB Kit** identificó el 97 % de las muestras positivas para *C. difficile* toxinógena y el 92 % de las muestras negativas. El ensayo no confirmó como positiva una muestra que dio un resultado positivo en el análisis del cultivo. El ensayo identificó como positivas 4 muestras que dieron un resultado negativo en el análisis del cultivo. El análisis de la curva de fusión confirmó 4 muestras como positivas verdaderas para *C. difficile* toxinógena.

El resultado diferente del resto se evaluó mediante un análisis molecular independiente (sistema Xpert® C. difficile, Cepheid). El resultado final se muestra en la tabla siguiente.

Tabla 48

C. difficile ELITE MGB Kit	Métodos de referencia		
	Resultado positivo para toxina de C. difficile	Resultado negativo para toxina de C. difficile	Total
Positivas para <i>C. difficile</i> toxinógena	33	0	33
Negativas para <i>C. difficile</i> toxinógena	0	49	49
Muestras totales válidas para el análisis	33	49	82
Sensibilidad diagnóstica (porcentaje de concordancia positiva)	100 %	-	
Especificidad diagnóstica (porcentaje de concordancia negativa)	-	100 %	

Las características de rendimiento del producto **C. difficile ELITE MGB Kit** cuando se utilizaron muestras de heces y el sistema **ELITE GALAXY** se determinaron analizando un panel de muestras clínicas evaluadas previamente utilizando el análisis de un cultivo de citotoxicidad como método de referencia. Se analizaron un total de 82 muestras fecales de *C. difficile*, 30 positivas y 52 negativas. Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

Tabla 49

C. difficile ELITE MGB Kit	Método de referencia		
	Resultado positivo para toxina de C. difficile	Resultado negativo para toxina de C. difficile	Total
Positivas para <i>C. difficile</i> toxinógena	28	4	32
Negativas para <i>C. difficile</i> toxinógena	2	48	50
Muestras totales válidas para el análisis	30	52	82

Tabla 49 (continued)

C. difficile ELITE MGB Kit	Método de referencia		Total
	Resultado positivo para toxina de C. difficile	Resultado negativo para toxina de C. difficile	
Sensibilidad diagnóstica (porcentaje de concordancia positiva)	93 %	-	
Especificidad diagnóstica (porcentaje de concordancia negativa)	-	92 %	

Comparado con el método de referencia, el producto **C. difficile ELITE MGB Kit** identificó el 93 % de las muestras positivas para *C. difficile* toxinógena y el 92 % de las muestras negativas. El ensayo no confirmó como positivas 2 muestras que dieron un resultado positivo en el análisis del cultivo. El ensayo identificó como positivas 4 muestras que dieron un resultado negativo en el análisis del cultivo. El análisis de la curva de fusión confirmó 4 muestras como positivas verdaderas para *C. difficile* toxinógena.

El resultado diferente del resto se evaluó mediante un análisis molecular independiente (sistema Xpert® C. difficile, Cepheid). Los resultados finales se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 50

C. difficile ELITE MGB Kit	Métodos de referencia		Total
	Resultado positivo para toxina de C. difficile	Resultado negativo para toxina de C. difficile	
Positivas para <i>C. difficile</i> toxinógena	32	0	32
Negativas para <i>C. difficile</i> toxinógena	1	49	50
Muestras totales válidas para el análisis	33	49	82
Sensibilidad diagnóstica (porcentaje de concordancia positiva)	100 %	-	
Especificidad diagnóstica (porcentaje de concordancia negativa)	-	100 %	

Las características de rendimiento del producto **C. difficile ELITE MGB Kit** se determinaron mediante un estudio de investigación prospectivo que comparó los resultados obtenidos con el producto **C. difficile ELITE MGB Kit** cuando se utilizó con el NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux) y el 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems), utilizando el análisis de un cultivo de citotoxicidad como método de referencia.

A continuación, se analizaron un total de 100 muestras fecales positivas y negativas para *C. difficile*, que se evaluaron mediante el análisis de un cultivo y, después, se analizaron con el producto **C. difficile ELITE MGB Kit**. Comparado con el método de referencia, el producto **C. difficile ELITE MGB Kit** identificó el 100 % de las muestras positivas para *C. difficile* toxinógena y el 86 % de las muestras negativas..

Tabla 51

C. difficile ELITE MGB Kit	Método de referencia		Total
	Resultado positivo para toxina de C. difficile	Resultado negativo para toxina de C. difficile	
Positivas para <i>C. difficile</i> toxinógena	50	7	57
Negativas para <i>C. difficile</i> toxinógena	0	43	43
Muestras totales válidas para el análisis	50	50	100

Tabla 51 (continued)

C. difficile ELITE MGB Kit	Método de referencia		Total
	Resultado positivo para toxina de C. difficile	Resultado negativo para toxina de C. difficile	
Sensibilidad diagnóstica (porcentaje de concordancia positiva)	100 %	-	
Especificidad diagnóstica (porcentaje de concordancia negativa)	-	86 %	

Comparado con el método de referencia, el producto **C. difficile ELITE MGB Kit** identificó el 100 % de las muestras positivas para *C. difficile* toxinógena y el 86 % de las muestras negativas. El ensayo identificó como positivas 7 muestras que dieron un resultado negativo en el análisis del cultivo.

Se realizaron análisis de las discrepancias mediante PCR utilizando cebadores específicos del gen de la toxina B, pero no relacionados con los del producto **C. difficile ELITE MGB Kit**. Los resultados finales se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 52

C. difficile ELITE MGB Kit	Métodos de referencia		Total
	Resultado positivo para toxina de C. difficile	Resultado negativo para toxina de C. difficile	
Positivas para <i>C. difficile</i> toxinógena	50	5	55
Negativas para <i>C. difficile</i> toxinógena	0	45	45
Muestras totales válidas para el análisis	50	50	100
Sensibilidad diagnóstica (porcentaje de concordancia positiva)	100 %	-	
Especificidad diagnóstica (porcentaje de concordancia negativa)	-	90 %	

## 15.2 Rendimiento no clínico

### 15.2.1 Límite de detección

El límite de detección (LoD) del producto **C. difficile ELITE MGB Kit** se calculó mediante un análisis estadístico de regresión Probit.. El LoD de cada cepa se calculó como la concentración a la que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

El LoD del producto **C. difficile ELITE MGB Kit** cuando se utilizaron muestras de heces clarificadas y el sistema **ELITE STAR** se determinó utilizando dos cepas de *C. difficile* toxinógena.

Los materiales de referencia que contenían *C. difficile* 027 o *C. difficile* 017 (Qnostics Ltd, Reino Unido) se diluyeron en muestras de heces clarificadas negativas. Se analizaron múltiples diluciones de 1000 ufc/mL a 1 ufc/mL realizando el procedimiento entero de análisis, extracción y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los valores del LoD expresados en ufc/mL se indican a continuación.

Tabla 53 Límite de detección para muestras de heces clarificadas y el sistema ELITE STAR

Cepa	ufc/mL
<i>C. difficile</i> 027, toxina A+B+, toxinotipo III	187
<i>C. difficile</i> 017, toxina A-B+, toxinotipo VIII	278

El LoD del producto **C. difficile ELITE MGB Kit** cuando se utilizaron muestras de heces clarificadas y el sistema **ELITE GALAXY** se determinó utilizando dos cepas de *C. difficile* toxinógena.

Los materiales de referencia que contenían *C. difficile* 027 o *C. difficile* 017 (Qnostics Ltd, Reino Unido) se diluyeron en muestras de heces clarificadas negativas. Se analizaron múltiples diluciones de 178 ufc/mL a 1,78 ufc/mL realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, configuración de la PCR y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

El LoD como valor expresado en ufc/mL se indica a continuación.

**Tabla 54 Límite de detección para muestras de heces clarificadas y el sistema ELITE GALAXY**

Cepa	ufc/mL
<i>C. difficile</i> 027, toxina A+B+, toxinotipo III	88
<i>C. difficile</i> 017, toxina A-B+, toxinotipo VIII	84

El LoD del producto **C. difficile ELITE MGB Kit** cuando se utilizaron muestras de heces clarificadas y el sistema **NucliSENS® easyMAG®** se determinó utilizando dos cepas *C. difficile* toxinógena.

Se cuantificaron cultivos recién preparados de la cepa VPI 10463 y la cepa 4118 de *C. difficile* y se diluyeron en muestras de heces clarificadas negativas. Se analizaron múltiples diluciones realizando el procedimiento entero de análisis, extracción y amplificación con productos de bioMérieux y de ELITechGroup S.p.A.

Después de la determinación, el LoD de cada cepa se verificó a continuación analizando 20 duplicados a la concentración declarada. El LoD como valor expresado en ufc/mL se indica a continuación.

**Tabla 55 Límite de detección para muestras de heces clarificadas y el sistema NucliSENS® easyMAG®**

Cepa	ufc/mL
ATCC 43255, cepa VPI 10463, toxinotipo 0	1,121
ATCC BAA-1870, cepa 4118, toxinotipo III	3,750

### 15.2.2 Sensibilidad analítica: reproducibilidad con material de referencia calibrado

La reproducibilidad de los resultados del ensayo comparados con los resultados obtenidos utilizando otros ensayos en laboratorios diferentes se comprobó analizando el panel de eficacia.

Se realizó un análisis utilizando como material de referencia el producto **QCMD 2012 C. difficile DNA EQA Panel** (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se analizó realizando la extracción con el sistema **ELITE STAR** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

**Tabla 56 Análisis con el panel de eficacia y el sistema ELITE STAR**

Muestra	Tipo	ufc/mL	Resultado
CD12-01	<i>C. difficile</i> 027	$4,6 \times 10^4$	POS
CD12-02	<i>C. sordellii</i>	-	NEG
CD12-03	<i>C. difficile</i> 027	$4,6 \times 10^3$	POS
CD12-04	<i>C. difficile</i> 027	$4,6 \times 10^5$	POS
CD12-05	<i>C. difficile</i> 027	$4,6 \times 10^5$	POS
CD12-06	Negativas	-	NEG

**Tabla 56 Análisis con el panel de eficacia y el sistema ELITE STAR (continued)**

Muestra	Tipo	ufc/mL	Resultado
CD12-07	<i>C. difficile</i> 027	4,6×10 <sup>6</sup>	POS
CD12-08	<i>C. difficile</i> 017	8×10 <sup>6</sup>	POS
CD12-09	<i>C. difficile</i> 017	8×10 <sup>4</sup>	POS
CD12-10	<i>C. difficile</i> 017	8×10 <sup>5</sup>	POS

Todas las muestras se detectaron correctamente.

Se realizaron análisis adicionales utilizando como material de referencia el producto **QCMD 2012 C. difficile DNA EQA Panel** (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se analizó realizando la extracción y la configuración de la PCR con el **sistema ELITE GALAXY** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

**Tabla 57 Análisis con el panel de eficacia y el sistema ELITE GALAXY**

Muestra	Tipo	ufc/mL	Resultado
CD12-01	<i>C. difficile</i> 027	4,6×10 <sup>4</sup>	POS
CD12-02	<i>C. sordellii</i>	-	NEG
CD12-03	<i>C. difficile</i> 027	4,6×10 <sup>3</sup>	POS
CD12-04	<i>C. difficile</i> 027	4,6×10 <sup>5</sup>	POS
CD12-05	<i>C. difficile</i> 027	4,6×10 <sup>5</sup>	POS
CD12-06	Negativas	-	NEG
CD12-07	<i>C. difficile</i> 027	4,6×10 <sup>6</sup>	POS
CD12-08	<i>C. difficile</i> 017	8×10 <sup>6</sup>	POS
CD12-09	<i>C. difficile</i> 017	8×10 <sup>4</sup>	POS
CD12-10	<i>C. difficile</i> 017	8×10 <sup>5</sup>	POS

Todas las muestras se detectaron correctamente.

El último análisis se realizó utilizando como material de referencia el producto **QCMD 2013 C. difficile DNA EQA Panel** (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se analizó realizando la extracción con el sistema NucliSENS® easyMAG® y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

**Tabla 58 Análisis con materiales de referencia calibrados y el sistema NucliSENS® easyMAG®**

Muestra	Tipo	ufc/mL	Pos./Dup.	Resultado
CD13-01	<i>C. difficile</i> 027	4,6×10 <sup>5</sup>	2/2	POS
CD13-02	<i>C. difficile</i> 017	8×10 <sup>6</sup>	2/2	POS
CD13-03	Negativas	-	0/2	NEG
CD13-04	<i>C. difficile</i> 027	4,6×10 <sup>4</sup>	2/2	POS
CD13-05	<i>C. difficile</i> 027	4,6×10 <sup>6</sup>	2/2	POS

**Tabla 58 Análisis con materiales de referencia calibrados y el sistema NucliSENS® easyMAG® (continued)**

Muestra	Tipo	ufc/mL	Pos./Dup.	Resultado
CD13-06	<i>C. difficile</i> 017	8×10 <sup>5</sup>	2/2	POS
CD13-07	<i>C. difficile</i> 027	4,6×10 <sup>3</sup>	2/2	POS
CD13-08	<i>C. sordellii</i>	2,1×10 <sup>5</sup>	0/2	NEG
CD13-09	<i>C. difficile</i> 027	4,6×10 <sup>5</sup>	2/2	POS
CD13-10	<i>C. difficile</i> 017	8×10 <sup>4</sup>	2/2	POS

Todas las muestras se detectaron correctamente.

### 15.2.3 Eficacia de detección del genotipo (inclusividad)

El rendimiento del producto **C. difficile ELITe MGB Kit** identificó correctamente 30 aislados de *C. difficile* toxinógena que representan la diversidad genética global, inclusive siete toxinotipos diferentes (0, III, V, VIII, X, XII y XXII), y trece ribotipos de PCR distintos (001, 002, 010, 012, 014, 017, 020, 027, 036, 056, 087, 110 y 154). Todas las cepas se obtuvieron y cuantificaron mediante ATCC, EE. UU, con la excepción de la cepa CCUG 8864 de *C. difficile* (toxinotipo X, A-/B+, donada amablemente por Thermo-Fisher Diagnostics). Todas las cepas analizadas se añadieron a las muestras de heces clarificadas negativas a un nivel cercano al límite de detección y se analizaron con el producto **C. difficile ELITe MGB Kit** y el sistema NucliSENS® easyMAG®. Todas las cepas dieron un resultado positivo.

**Tabla 59**

ATCC	Cepa	Cepa aislada	Toxina A/B	Toxinotipo	Ribotipo de PCR
9689	90556-M6S	(tipo de cepa)	A+B+	0	001
17857	870, N4	Desconocido	A+B+	0	001
43255	VPI 10463	Herida abdominal	A+B+	0	087
43594	W1194	Heces humanas, Bélgica	A+B+	0	005
43596	545	Heces humanas, Bélgica	A+B+	0	012
43597	Desconocido	Heces humanas, Bélgica	A+B+	0	014
43598	1470 (F)	Heces humanas, Bélgica	A-B+	VIII	017
43599	2022	Heces humanas, Bélgica	A+B+	0	001
43600	2149	Heces humanas, Bélgica	A+B+	0	014
51695	BDMS 18 AN	Desconocido	A+B+	0	001
700792	14797-2	Heces femeninas, Michigan, 1977	A+B+	0	005
BAA-1382	630	Cepa clínica aislada, Suiza, 1982	A+B+	0	012
BAA-1803	Desconocido	Cepa clínica aislada, Quest	A+B+	IIIc	027
BAA-1804	Desconocido	Cepa clínica aislada, Quest	A+B+	0	053
BAA-1805	Desconocido	Cepa clínica aislada, Quest	A+B+	IIIb	027
BAA-1806	Desconocido	Cepa clínica aislada, Quest	A+B+	0	220

Tabla 59 (continued)

ATCC	Cepa	Cepa aislada	Toxina A/B	Toxinotipo	Ribotipo de PCR
BAA-1808	Desconocido	Cepa clínica aislada, Quest	A+B+	0	020
BAA-1811	Desconocido	Cepa clínica aislada, Quest	A+B+	0	057
BAA-1812	Desconocido	Cepa clínica aislada, Quest	A+B+	XII	024
BAA-1813	Desconocido	Cepa clínica aislada, Quest	A+B+	0	002
BAA-1814	Desconocido	Cepa clínica aislada, Quest	A+B+	XXII	251
BAA-1870	4118	Muestra humana, Maine, 2004 (cepa hipervirulenta NAP1/BI/027)	A+B+	IIIb	027
BAA-1871	4111	Muestra humana, Nueva Jersey	A+B+	0	001
BAA-1872	4206	Muestra humana, Maine	A+B+	0	207
BAA-1873	5283	Muestra humana, Nueva York	A+B+	0	053
BAA-1874	4205	Muestra humana, Oregón	A+B+	0	002
BAA-1875	5325	Muestra humana, Georgia	A+B+	V	078
BAA-2155	LBM 0801058	Heces humanas, Albuquerque, NM, EE. UU.	A+B+	XXII	251
BAA-2156	LBM 0801040	Heces humanas, Cambridge, Reino Unido 2007	A+B+	0	118
-	CCUG 8864	Prof. M. Delmee, C. U. Louvain, Bruselas	A-B+	X	036

#### 15.2.4 Reactividad cruzada e interferencias

La especificidad analítica del producto **C. difficile ELITE MGB Kit** se evaluó para ver la reactividad cruzada analizando especies de *C. difficile* no toxinógena, especies filogenéticamente relacionadas con *C. difficile* y otros microorganismos patógenos que suelen estar presentes en la microflora gastrointestinal normal. Las especies analizadas fueron microorganismos bacterianos y fúngicos (analizados a concentraciones de  $1 \times 10^6$  ufc en la medida de lo posible), parásitos víricos e intracelulares (analizados a concentraciones de  $1 \times 10^5$  ufp o uic). Asimismo, se analizó ADN genómico humano (a una concentración de  $1 \times 10^6$  células). Cuando se utilizó el producto **C. difficile ELITE MGB Kit** junto con el sistema NucliSENS® easyMAG®, ninguno de los microorganismos analizados (130) presentó reactividad cruzada, a excepción de *Clostridium nexile*, que presentó reactividad cruzada con la reacción de amplificación para el gen de la toxina B.

Se observó *C. nexile* en aproximadamente un 3 % de las muestras clínicas analizadas. *C. nexile* no expresa la toxina B, pero hay suficiente homología de secuencia para producir una señal en el ensayo. Así, la especificidad analítica global fue del 99 % (129/130).

La especificidad analítica del producto **C. difficile ELITE MGB Kit** también se evaluó para determinar la interferencia microbiana analizando la misma especie utilizada para determinar la reactividad cruzada. Los microorganismos se analizaron tal como se ha descrito anteriormente en el análisis de reactividad cruzada, pero también se enriquecieron individualmente con cada una de las dos cepas distintas de *C. difficile* toxinógena (ATCC 43255, cepa VPI 10463, toxinotipo 0 o ATCC BAA-1870, cepa 4118, toxinotipo III) a un nivel cercano al límite de detección. Ninguno de los microorganismos analizados utilizando el producto **C. difficile ELITE MGB Kit** junto con el sistema NucliSENS® easyMAG® presentó interferencia microbiana.

Tabla 60

Géneros y especies	Ref.	Proveedor	Cantidad	¿Interfiere?
<i>Abiotrophia defectiva</i>	49176	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	15309	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Aeromonas hydrophila</i>	7966	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Alcaligenes faecalis subsp. faecalis</i>	15554	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Anaerococcus tetradius</i>	35098	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Bacillus cereus</i>	13472	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Bacteroides caccae</i>	43185	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Bacteroides merdae</i>	43184	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Bacteroides stercoris</i>	43183	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	15703	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Bifidobacterium longum</i>	15707	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Campylobacter coli</i>	BAA-370	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i>	33292	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Candida albicans</i>	10231	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Cedecea davisae</i>	33431	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Chlamydia trachomatis</i>	8017775	Zeptomatrix	1×10 <sup>5</sup>	No
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	25405	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Citrobacter freundii</i>	8090	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Citrobacter koseri</i>	27028	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Citrobacter sedlakii</i>	51115	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium beijerinckii</i>	8260	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium bifermentans</i>	638	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium bolteae</i>	BAA-613	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium butyricum</i>	19398	ATCC	1,5×10 <sup>5</sup>	No
<i>Clostridium chauvoei</i>	11957	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium difficile</i> (non toxinógena)	43593	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium difficile</i> (non toxinógena)	43601	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium difficile</i> (non toxinógena)	43602	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium difficile</i> (non toxinógena)	43603	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium difficile</i> (non toxinógena)	700057	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium difficile</i> (non toxinógena)	BAA-1801	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium difficile</i> (non toxinógena)	BAA-1807	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No

Tabla 60 (continued)

Géneros y especies	Ref.	Proveedor	Cantidad	¿Interfiere?
<i>Clostridium difficile</i> (non toxinógena)	BAA-1809	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium difficile</i> (non toxinógena)	BAA-1810	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium difficile</i> toxintipo XIa, A-/B-	R11402	Thermo-Fisher Diagnostics	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium difficile</i> toxintipo XIb, A-/B-	IS58	Thermo-Fisher Diagnostics	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium fallax</i>	19400	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium haemolyticum</i>	9650	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium histolyticum</i>	19401	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium innocuum</i>	14501	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium methylpentosum</i>	43829	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium nexile</i>	27757	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	Sí
<i>Clostridium novyi</i>	19402	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium paraputrificum</i>	25780	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium perfringens</i>	13124	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium ramosum</i>	25582	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium scindens</i>	35704	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium septicum</i>	12464	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium sordellii</i>	9714	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium sphenoides</i>	19403	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium spiroforme</i>	29899	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium sporogenes</i>	15579	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium symbiosum</i>	14940	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium tertium</i>	14573	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Clostridium tetani</i>	19406	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Collinsella aerofaciens</i>	25986	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Corynebacterium genitalium</i>	33798	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Desulfovibrio piger</i>	29098	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Edwardsiella tarda</i>	15947	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Eggerthella lenta</i>	25559	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Enterobacter aerogenes</i>	51697	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Enterococcus casseliflavus</i> (vanC2)	25788	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No

Tabla 60 (continued)

Géneros y especies	Ref.	Proveedor	Cantidad	¿Interfiere?
<i>Enterococcus cecorum</i>	43198	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Enterococcus dispar</i>	51266	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Enterococcus faecalis (vanB)</i>	51299	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Enterococcus faecium (vanA)</i>	700221	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Enterococcus gallinarum (vanC)</i>	700425	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Enterococcus hirae</i>	10541	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Enterococcus raffinosus</i>	49427	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Escherichia coli</i>	35218	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Escherichia fergusonii</i>	35469	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Escherichia hermannii</i>	33650	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Flavonifractor plautii</i>	49531	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Fusobacterium varium</i>	8501	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Gardnerella vaginalis</i>	14019	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Hafnia alvei</i>	13337	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Helicobacter fennelliae</i>	35683	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Helicobacter pylori</i>	43504	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
Homo sapiens, células humanas	-	Seattle Children Hospital Research Institute	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8724	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subespecie <i>pneumoniae</i>	13883	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Lactobacillus reuteri</i>	23272	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Lactococcus lactis</i>	11454	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Leminorela grimontii</i>	33999	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Listeria grayi</i>	19120	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Listeria innocua</i>	33090	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Listeria monocytogenes</i>	13932	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	27337	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	14029	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	25260	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No

Tabla 60 (continued)

Géneros y especies	Ref.	Proveedor	Cantidad	¿Interfiere?
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Proteus penneri</i>	35198	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Providencia alcalifaciens</i>	9886	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Providencia rettgeri</i>	9250	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Providencia stuartii</i>	33672	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Ruminococcus bromii</i>	27255	ATCC	1,75×10 <sup>5</sup>	No
<i>Salmonella choleraesuis</i> (typhimurium)	14028	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>Arizonae</i>	13314	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>Enterica</i>	700720	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Serratia liquefaciens</i>	27592	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Serratia marcescens</i>	274	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Shigella boydii</i>	9207	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Shigella dysenteriae</i>	11835	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Shigella sonnei</i>	25931	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Staphylococcus aureus</i>	BAA-1556	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	13637	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12973	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	43078	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Streptococcus uberis</i>	19436	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Trabulsiella guamensis</i>	49490	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Veillonella parvula</i>	10790	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Vibrio cholerae</i>	25870	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17802	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Yersinia bercovieri</i>	43970	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
<i>Yersinia rohdei</i>	43380	ATCC	1×10 <sup>6</sup>	No
Adenovirus	VR-1516	ATCC	1×10 <sup>5</sup>	No
Virus de Coxsackie	VR-28	ATCC	1×10 <sup>5</sup>	No
Citomegalovirus	VR-1590	ATCC	1×10 <sup>5</sup>	No
Virus ECHO	VR-41	ATCC	1×10 <sup>5</sup>	No

Tabla 60 (continued)

Géneros y especies	Ref.	Proveedor	Cantidad	¿Interfiere?
Enterovirus	VR-836	ATCC	1×10 <sup>5</sup>	No
Norovirus tipo I	0810086CF	ZeptoMetrix	1×10 <sup>5</sup>	No
Rotavirus	VR-2018	ATCC	1×10 <sup>5</sup>	No

### 15.2.5 Reproducibilidad

Un panel de 7 miembros formado por una muestra negativa de heces clarificadas y concentraciones diferentes de dos cepas de *C. difficile* toxinógena (ATCC 43255 y BAA-1870) se analizó en tres duplicados con dos operadores. Para cada cepa de *C. difficile*, el panel incluyó una muestra por debajo del LoD (se espera que produzca una tasa de positividad de entre el 20 % y el 80 %), un positivo bajo (en el LoD, se espera que produzca una tasa de positividad del 95 %) y un positivo moderado (tres veces el LoD, se espera que tenga una tasa de positividad del 100 %). Cada uno de los dos operadores realizó una sesión al día durante 12 días en tres lotes de reactivos y en un centro (7 muestras × 3 duplicados × 12 días × 2 sesiones). Cada muestra se analizó realizando la extracción con el sistema NucliSENS® easyMAG® y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

El miembro del panel negativo presentó resultados negativos en el 100 % de los casos, la muestra por debajo del LoD tuvo una tasa de positividad del 78 %, la muestra positiva baja, una tasa de positividad del 98 % y el miembro del panel positivo, una tasa de positividad del 100 %.

Tabla 61 Reproducibilidad día a día

Tipo de muestra	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	% de concordancia total
Negativas	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 %)
Por debajo del LoD	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 %)
Positiva baja	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 %)
Positiva moderada	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 %)

Tabla 62 Reproducibilidad lote a lote

Tipo de muestra	Lote 1	Lote 2	Lote 3	% de concordancia total
Negativas	30/30	27/27	15/15	72/72 (100 %)
Por debajo del LoD	50/60	38/54	25/30	113/144 (78 %)
Positiva baja	57/60	54/54	30/30	141/144 (98 %)
Positiva moderada	60/60	54/54	30/30	144/144 (100 %)

### 15.2.6 Arrastre/Contaminación cruzada

Se realizó un estudio analítico para evaluar el potencial de contaminación cruzada entre muestras de alta concentración ( $5 \times 10^8$  ufc/mL) de *C. difficile* y muestras negativas utilizando el producto **C. *difficile* ELITE MGB® Kit** junto con el sistema NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux) y el 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems). Dos operarios realizaron cinco sesiones de 24 muestras de extracción (11 muestras con un título alto de *C. difficile*, 11 muestras negativas, 1 muestra de Positive Control y 1 muestra de Negative Control por sesión) en un patrón de damero (muestras con una alta concentración de *C. difficile* interrumpidas por muestras completamente negativas). A continuación, las muestras procesadas se amplificaron en cinco series independientes utilizando dos patrones de damero diferentes. El análisis de contaminación cruzada obtuvo un resultado de cero falsos positivos a partir de 55 muestras negativas para *C. difficile*.

#### NOTA!

Los datos y resultados completos de los análisis realizados para evaluar las características de rendimiento del producto se incluyen en la sección 7 de la documentación técnica del producto **C. *difficile* ELITE MGB Kit**, FTP M800358.

## 16 BIBLIOGRAFÍA

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 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Utilizar este producto únicamente con las siguientes muestras clínicas. muestras de heces humanas no formadas o líquidas.

Los resultados obtenidos con este producto dependen de que las muestras se identifiquen, recojan, transporten, conserven y procesen de forma apropiada. Por lo tanto, con el fin de evitar resultados incorrectos, es necesario prestar especial atención durante estos pasos y seguir estrictamente las instrucciones incluidas con los productos.

Debido a su alta sensibilidad analítica, el método de PCR en tiempo real utilizado en este producto puede desarrollar contaminación con las muestras clínicas positivas, los controles positivos y los propios productos de la PCR. Una contaminación cruzada puede dar lugar a resultados falsos positivos. El formato del producto está diseñado para limitar la posibilidad de una contaminación cruzada. No obstante, esta solo puede evitarse procediendo conforme a las prácticas correctas de laboratorio y siguiendo estas instrucciones de uso.

Para utilizar este producto y con el fin de evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario y otras personas, se requiere personal cualificado y con la formación necesaria para procesar muestras biológicas potencialmente infecciosas o productos químicos clasificados como peligrosos.

Con el fin de evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario y otras personas, este producto requiere el uso de un equipo de protección individual y áreas que sean adecuadas para procesar muestras biológicas potencialmente infecciosas o productos químicos clasificados como peligrosos.

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, este producto requiere el uso de un equipo de protección individual e instrumentos especiales expresamente destinados a la configuración de la sesión de trabajo de que se trate.

Con el fin de evitar resultados incorrectos, este producto debe ser manipulado por profesionales debidamente formados y cualificados en técnicas de biología molecular, como la extracción, la PCR y la detección de ácidos nucleicos.

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, es necesario disponer de áreas independientes para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación.

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, este producto requiere el uso de ropa de trabajo e instrumentos especiales para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación.

Debido a las diferencias inherentes que existen entre las distintas tecnologías, se recomienda a los usuarios realizar estudios de relación entre los diversos métodos para evaluar dichas diferencias antes de pasar a una nueva tecnología.

Un resultado positivo obtenido con este producto no indica la presencia de *C. difficile* toxinógena viable, pero sí es un indicio de una posible presencia de *C. difficile* toxinógena. Por lo tanto, un resultado positivo no indica necesariamente el fracaso de la intervención de erradicación, pues puede mantenerse ADN no viable.

Un resultado negativo obtenido con este producto significa que el ADN del gen de la toxina A o la toxina B no se ha detectado en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de *C. difficile* toxinógena presente un título inferior al límite de detección del producto (consultar el apartado «Características de rendimiento»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

En el caso de producirse una infección simultánea, la sensibilidad de una diana puede verse afectada por la amplificación de una segunda diana (consultar la sección «Características de rendimiento»).

En ocasiones, los resultados obtenidos con este producto pueden ser no válidos debido a un error del Internal Control. En este caso, la muestra debe volver a analizarse, comenzando por la extracción, lo que puede implicar retrasos en la obtención de los resultados finales.

Del mismo modo, los posibles polimorfismos, así como las inserciones o supresiones existentes en la región del ADN diana cubierto por los cebadores y las sondas del producto, pueden afectar negativamente a la detección del ADN diana.

Como con cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, los resultados obtenidos con este producto deben interpretarse en combinación con los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Como en cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, este producto presenta un riesgo residual de obtener resultados no válidos o erróneos. Este riesgo residual no se puede eliminar ni reducir aún más. En determinadas situaciones, el riesgo residual puede hacer que se tomen decisiones incorrectas, con consecuencias potencialmente graves para el paciente. No obstante, este riesgo residual asociado al uso previsto del producto se ha ponderado con los beneficios potenciales para el paciente y se ha evaluado como aceptable.

## 18 PROBLEMAS Y SOLUCIONES

### ELITE InGenius y ELITE BeGenius

Tabla 63

Reacción no válida del Positive Control	
Posibles causas	Soluciones
Error de configuración del instrumento.	Revisar la posición de la PCR Mix y del Positive Control. Comprobar los volúmenes de la PCR Mix y del Positive Control.
Degradación de la PCR Mix.	No utilizar la PCR Mix durante más de 5 sesiones independientes: 3 horas en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No utilizar la PCR Mix para más de 5 sesiones consecutivas: en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No dejar la PCR Mix a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.

Tabla 63 (continued)

Reacción no válida del Positive Control	
Posibles causas	Soluciones
Degradación de la Positive Control.	No utilizar el Positive Control para más de 4 sesiones independientes: 3 horas cada una en el área de extracción o en la «Cooler Unit» (unidad de refrigeración). Utilizar una nueva alícuota de la Positive Control.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Tabla 64

Reacción no válida del Negative Control	
Posibles causas	Soluciones
Error de configuración del instrumento.	Revisar la posición de la PCR Mix y del Negative Control. Comprobar los volúmenes de la PCR Mix y del Negative Control.
Contaminación del Negative Control.	No utilizar el Negative Control para más de una sesión. Utilizar una nueva alícuota de agua para biología molecular.
Contaminación del PCR Mix.	Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.
Contaminación del área de extracción, de las gradillas, del «Inventory Block» (administrador de inventarios) o de la «Cooler Unit» (unidad de refrigeración).	Limpiar las superficies con detergentes acuosos, lavar las batas y sustituir los probetas y las puntas que se hayan utilizado.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Tabla 65

Reacción no válida de la muestra	
Posibles causas	Soluciones
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la posición de la PCR Mix, la del Internal Control y la de la muestra. Comprobar el volumen de la PCR Mix, el del Internal Control y el de la muestra.
Degradación de la PCR Mix.	No utilizar la PCR Mix para más de 5 sesiones independientes: 3 horas cada una en la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No utilizar la PCR Mix para más de 5 sesiones consecutivas: en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No dejar la PCR Mix a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.
Degradación de la plantilla del Internal Control.	Utilizar una nueva alícuota del Internal Control.
Inhibición debida a la presencia de sustancias interferentes en la muestra.	Repetir la amplificación con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Repetir la extracción con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra en una sesión realizada en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Tabla 66

Curva de disociación anómala	
Posibles causas	Soluciones
Ausencia de un valor máximo definido. Pico definido, pero Tm diferente de la de otras muestras y de la presentada por el Positive Control.	Verificar que el Ct de la diana sea inferior a 30. Una alta cantidad de producto de amplificación al final de la reacción puede interferir con el análisis de la curva de fusión. Repetir la amplificación de la muestra para confirmar la presencia de la diana con una posible mutación. La diana de la muestra debe secuenciarse para confirmar la mutación.

Tabla 67

Error en el cálculo del Ct	
Posibles causas	Soluciones
Concentración demasiado alta de la diana en la muestra o muestra con una señal de fluorescencia anómala.	Si se observa una amplificación importante en el gráfico de la PCR, seleccionar el carril relativo a la muestra y aprobar manualmente el resultado como positivo. Si no se observa ninguna amplificación en el gráfico de la PCR, seleccionar el carril («Track») relativo a la muestra y aprobar manualmente el resultado como negativo, o bien dejarlo como no válido. Si se requiere un valor Ct: - Repetir la amplificación de la muestra eluida con una dilución de 1:10 en agua para biología molecular de la muestra en una sesión realizada en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). - Repetir la extracción de la muestra con una dilución de 1:10 en agua para biología molecular en una sesión realizada en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Tabla 68

Tasa anormalmente alta de resultados positivos dentro de la misma sesión (reacciones con valores de Ct tardíos similares)	
Posibles causas	Soluciones
Contaminación entre muestras durante los pasos preanalíticos.	Limpiar la micropipeta con una solución reciente de hipoclorito de sodio (lejía) al 3 % o un limpiador de ADN/ARN después de pipetear cada muestra. No utilizar pipetas de Pasteur. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Introducir las muestras en las últimas posiciones de los instrumentos, tal como se indica en la interfaz. Seguir la secuencia de carga indicada por el software.
Contaminación medioambiental en el laboratorio	Limpiar todas las superficies que están en contacto con el operador y las muestras (inclusive las pipetas) con solución de hipoclorito de sodio (lejía) al 3 % reciente o limpiador de ADN/ARN. Realizar un ciclo de descontaminación con radiación UV. Utilizar una nueva probeta de la PCR Mix o del CPE.

Plataforma abierta:

Tabla 69

ADN diana no detectado en la reacción del Positive Control	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	Distribuir con cuidado las reacciones en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo. Revisar los volúmenes de la PCR Mix distribuida. Comprobar los volúmenes del Positive Control distribuido.
Degradación de la PCR Mix (mezcla de PCR).	Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.
Degradación de la Positive Control.	Utilizar una nueva alícuota de la Positive Control.
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la configuración de las posiciones para las reacciones del Positive Control en el instrumento. Comprobar la configuración del ciclo térmico en el instrumento.

Tabla 70

ADN diana detectado en la reacción del Negative Control	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	Evitar derramar el contenido de la probeta de la muestra. Cambiar siempre las puntas entre una muestra y otra. Distribuir con cuidado las muestras, los Negative Control y los Positive Control en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo..
Error al configurar el instrumento	Comprobar la configuración de las posiciones de las muestras, de los Negative Control, de los Positive Control o de los calibradores en el instrumento.
Sellado incorrecto de la microplaca.	Proceder con cuidado al sellar la microplaca.
Contaminación del agua para biología molecular.	Utilizar una nueva alícuota de agua estéril.
Contaminación de la PCR Mix.	Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.
Contaminación del área de extracción/preparación para las reacciones de amplificación.	Limpiar las superficies y los instrumentos con detergentes acuosos, lavar las batas de laboratorio y sustituir las probetas y las puntas utilizadas.

Tabla 71

Fluorescencia de fondo irregular o alto en las reacciones	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta o mezcla insuficiente de la muestra.	Mezclar con cuidado las muestras, los Negative Control y los Positive Control en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.
Error de configuración del punto de referencia.	Configurar el rango de cálculo de referencia entre los ciclos en los que la fluorescencia de fondo ya se ha estabilizado (comprobar los datos de «Results» o «Component») y la fluorescencia de la señal aún no ha empezado a aumentar, p. ej., del ciclo 6 al ciclo 15. Utilizar el cálculo automático del punto de referencia configurando la opción «Auto Baseline».

Tabla 72

Curva de disociación anómala	
Posibles causas	Soluciones
Ausencia de un valor máximo definido. Pico definido, pero diferente del de otras muestras y del presentado por los calibradores o el Positive Control.	Verificar que el valor de Ct del detector FAM sea inferior a 30. Una alta cantidad de producto de amplificación al final de la reacción puede interferir con el análisis de la curva de fusión. Repetir la amplificación de la muestra para confirmar la presencia del ADN diana con una posible mutación. El ADN diana de la muestra debe secuenciarse para confirmar la mutación.

## 19 SÍMBOLOS



Número de catálogo.



Límite superior de temperatura.



Código de lote.



Fecha de caducidad (último día del mes).



Producto sanitario para diagnóstico in vitro.



Cumple los requisitos de la Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro.



Identificador único del producto



Contenido suficiente para «N» análisis.



Atención: Consultar las instrucciones de uso.



Contenido.



Manténgase fuera de la luz del sol



Fabricante.

## 20 AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

Este producto contiene reactivos fabricados por Thermo Fisher Scientific, que se venden conforme a acuerdos de licencia entre ELITechGroup S.p.A. y sus afiliadas y Thermo Fisher Scientific. El precio de compra de este producto incluye derechos limitados y no transferibles para utilizar únicamente esta cantidad de producto exclusivamente para las actividades del comprador directamente relacionadas con el diagnóstico humano. Para obtener información sobre cómo adquirir una licencia para este producto con fines distintos de los indicados anteriormente, contactar con del departamento de licencias de Thermo Fisher Scientific. Correo electrónico: [outlicensing@thermofisher.com](mailto:outlicensing@thermofisher.com).

ELITe MGB® detection reagents are covered by one or more of U. S. Patent numbers 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, and EP patent numbers 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 as well as applications that are currently pending.

ELITe InGenius® y las tecnologías ELITe BeGenius® están cubiertos por patentes y solicitudes de patentes.

Esta licencia limitada permite a la persona o a la entidad a la que se ha suministrado este producto utilizar este y los datos generados con el uso del producto exclusivamente para diagnóstico humano. Ni ELITechGroup S.p.A. ni sus licenciarios conceden ninguna otra licencia, ni expresa ni implícita, para ningún otro propósito.

## Appendix A C. difficile ELITE MGB Kit utilizado junto con las plataformas de la serie Genius®



### ATENCIÓN

Este documento es una versión simplificada de las instrucciones de uso oficiales. Consulte el documento completo antes de utilizar el producto visitando el enlace [www.elitech-group.com](http://www.elitech-group.com).

### Uso previsto

El producto **C. difficile ELITE MGB® Kit** es un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* concebido para su uso por parte de profesionales sanitarios como en ensayo cualitativo múltiple de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real para la **detección de los genes de la toxina A y la toxina B de Clostridium difficile (C. difficile) toxinógena**, inclusive la cepa hipervirulenta epidémica NAP1/BI/027, en muestras de ADN extraídas de muestras de heces no formadas o líquidas.

El ensayo se ha validado con los instrumentos **ELITE InGenius®** y **ELITE BeGenius®**, que son sistemas automatizados e integrados para la extracción, la PCR en tiempo real y la interpretación de resultados utilizando muestras humanas de heces.

El ensayo también se ha validado con el **7500 Real-Time PCR System** cuando se utilizan muestras humana de heces.

El producto se utiliza como ayuda en el diagnóstico de infecciones por **C. difficile** toxinógena en entornos clínicos junto con los datos clínicos y otras pruebas analíticas del paciente.

Los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta todas las observaciones clínicas y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

### Secuencia amplificada

Secuencia	Gen	Fluoróforo	Canal
Diana 1	Gen específico de la toxina A de <i>C. difficile</i>	AP525	Toxina A
Diana 2	Gen específico de la toxina B de <i>C. difficile</i>	FAM	Toxina B
Diana 3	IC2	AP642	IC

### Matriz validada

- Heces naturales recogidas sin conservantes

## Contenido del kit y productos relacionados

C. difficile ELITE MGB Kit (M800358)		C. difficile - ELITE Positive Control (M800373)	
 X 4		 X 2	
<b>C. difficile PCR Mix</b> 4 probetas de 540 µL 24 reacciones por probeta 96 reacciones por kit 5 ciclos de congelación/descongelación por cada probeta		<b>C. difficile Positive Control</b> 2 probetas de 160 µL 4 reacciones por probeta 8 reacciones por kit 4 ciclos de congelación/descongelación por cada probeta	
Período de estabilidad máximo:	<b>24 meses</b>	Período de estabilidad máximo:	<b>24 meses</b>
Temperatura de almacenamiento	<b>≤-20 °C</b>	Temperatura de almacenamiento	<b>≤-20 °C</b>

## Otros productos necesarios no proporcionados con el kit

<ul style="list-style-type: none"> <li>Instrumento ELITE InGenius: INT030.</li> <li>Instrumento ELITE BeGenius: INT040.</li> <li>ELITE InGenius SP 200: INT032SP200.</li> <li>ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS.</li> <li>ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR.</li> <li>ELITE InGenius Waste Box: F2102-000.</li> <li>300 µL Filter Tips Axigen: TF-350-L-R-S.</li> <li>1000 µL Filter Tips Tecan: 30180118.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CPE - Internal Control: CTCPE</li> <li>InhibitEX Buffer (QIAGEN GmbH, Alemania, ref. 19593) o S. T. A. R. Buffer (Roche Diagnostics GmbH, ref. 3 335 208), o un dispositivo equivalente.</li> <li>Minitip Flocked Swab® (COPAN Italia S.p.A., Italia, ref. 518CS01) o un dispositivo equivalente.</li> </ul>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## Protocolo del ELITE InGenius y del ELITE BeGenius

<ul style="list-style-type: none"> <li>Volumen de la muestra</li> <li>Volumen del CPE</li> <li>Volumen total de elución:</li> </ul>	200 µL 10 µL 100 µL	<ul style="list-style-type: none"> <li>Volumen inicial de PCR del eluido</li> <li>Volumen de la PCR Mix</li> <li>Frecuencia de los controles</li> </ul>	10 µL 20 µL 15 días
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------

## Rendimiento del ELITE InGenius y de ELITE BeGenius

Matriz	Límite de detección	Sensibilidad	Especificidad
Heces naturales	500 ufc/ml	100 % (30/30)	97,8 % (44/45)

## Preparación de la muestra

Este producto está concebido para utilizarlo en uno de los instrumentos **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius** con las siguientes muestras clínicas, identificadas conforme a las directrices para laboratorios y obtenidas, transportadas y conservadas en las condiciones siguientes:

**Tabla 73**

Muestra	Requisitos de obtención	Condiciones transporte/almacenamiento			
		de +16 C a +26 °C (temperatura ambiente)	de +2 °C a +8 °C	-20 °C ± 10 °C	-70 °C ± 15 °C
Heces naturales	recogidas sin conservantes	≤24 horas	≤48 horas	≤1 mes	>1 mes

## Procedimientos con el ELITE InGenius

La interfaz del ELITE InGenius guía al usuario paso a paso durante la configuración de la sesión. Todos los pasos, a saber, la extracción, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados, se realizan automáticamente. Existen dos modos operativos, a saber, sesión completa «Extract + PCR» (Extracción + PCR) y «PCR only» (Solo PCR).

### Antes del análisis

1. Encender el ELITE InGenius. Iniciar sesión con el nombre de usuario y la contraseña correspondientes. Seleccionar el modo « <b>CLOSED</b> »	2. Verificar los controles: <b>Positive Control</b> y <b>Negative Control</b> en el menú «Controls» (Controles). Nota: los dos tienen que haberse procesado y aprobado y no deben estar caducados.	3. Descongelar las probetas de <b>PCR Mix</b> y de <b>CTRCPE</b> . Agitar suavemente en un vórtex. Centrifugar durante 5 segundos.
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### Procedimiento 1. Serie completa: «Extract + PCR» (Extracción + PCR); p. ej., muestras

1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil.	2. Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL»; «Elution» (Elución): «100 µL»	3. Escanear los códigos de barras de las muestras con el lector de códigos de barras manual, o bien introducir directamente el ID de la muestra.
4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo): C.diff ELITE_ST_200_100	5. Seleccionar el método «Extract + PCR» (Extracción + PCR) y la posición de la muestra: «Extraction Tube» (Tubo de extracción)	6. Cargar la he PCR Mix y el Internal Control en el «Inventory Block» (administrador de inventarios).
7. Cargar: Cargar el PCR Cassette, el cartucho de extracción, la «Elution Tube» (Tubo de elución), el cartucho de puntas y las gradillas del «Extraction Tube» (Tubo de extracción).	8. Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	9. Consultar, aprobar y almacenar los resultados.

### NOTA!

si necesita utilizar el modo de procesamiento «Extract Only» (Solo extracción) consulte las instrucciones de uso del instrumento para saber cómo realizar el procedimiento.

**Procedimiento 2. «PCR Only» (Solo PCR); p. ej., eluidos, controles**

1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil.	2. Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL»; «Elution» (Elución): «100 µL»	3. Escanear los códigos de barras de las muestras con el lector de códigos de barras manual, o bien introducir directamente el ID de la muestra.
4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo): C. diff ELITE_ST_200_100 o C. diff ELITE_PC o C. diff ELITE_NC	5. Seleccionar el método «PCR Only» (Solo PCR) y establecer la posición de la muestra «Elution Tube» (Tubo de elución).	6. Cargar la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios).
7. Cargar: El PCR Cassette y la rejilla de la «Elution Tube» (Tubo de elución) con el ácido nucleico extraído.	8. Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	9. Consultar, aprobar y almacenar los resultados.

**Procedimientos con el ELITE BeGenius**

La interfaz del ELITE BeGenius guía al usuario paso a paso durante la configuración de la sesión. Todos los pasos, a saber, la extracción, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados, se realizan automáticamente. Existen dos modos operativos, a saber, sesión completa «Extract + PCR» (Extracción + PCR) y «PCR only» (Solo PCR).

**Antes del análisis**

1. Encender el ELITE BeGenius. Iniciar sesión con el nombre de usuario y la contraseña correspondientes. Seleccionar el modo « <b>CLOSED</b> »	2. Verificar los controles: <b>Positive Control</b> y <b>Negative Control</b> en el menú «Controls» (Controles). Nota: los dos tienen que haberse procesado y aprobado y no deben estar caducados.	3. Descongelar las probetas de <b>PCR Mix</b> y de <b>CTRCPE</b> . Agitar suavemente en un vórtex. Centrifugar durante 5 segundos.
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Procedimiento 1. Serie completa: «Extract + PCR» (Extracción + PCR); p. ej., muestras**

1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil y, a continuación, hacer clic en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).	2. Insertar la «Sample Rack» (Rack de muestras) con las muestras dotadas de códigos de barras en la «Cooling Unit» (unidad de refrigeración). El escaneo de códigos de barras ya está activo.	3. Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL», «Eluate» (Eluido): «100 µL»
4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo): C. diff ELITE_Be_ST_200_100 <b>Nota:</b> Si es necesario llevar a cabo una segunda extracción, repetir los pasos del 2 al 4.	5. Imprimir las etiquetas para incluir el código de barras correspondiente en las probetas de elución vacías. Cargar las probetas en la «Elution Rack» (rejilla de elución) e insertarla en la «Cooler Unit».	6. Cargar el PCR Mix y el Internal Control en la «Reagent Rack/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) e insertarla en la «Cooler Unit»
7. Cargar la «PCR Rack» (rejilla de PCR) con el «PCR Cassette» y la «Extraction Basket» (cesta de extracción), con los cartuchos de extracción «ELITE InGenius SP 200» y los consumibles que se necesitan para la extracción.	8. Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	9. Consultar, aprobar y almacenar los resultados.

**NOTA!**

si necesita utilizar el modo de procesamiento «Extract Only» (Solo extracción) consulte las instrucciones de uso del instrumento para saber cómo realizar el procedimiento.

**Procedimiento 2. «PCR Only» (Solo PCR); p. ej., eluidos, controles**

<p><b>1.</b> Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil y, a continuación, hacer clic en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).</p>	<p><b>2.</b> Cargar el ácido nucleico extraído o las probetas con códigos de barras de los controles en la «Elution Rack» (rejilla de elución) e insertarla en la «Cooler Unit».</p>	<p><b>3.</b> Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL», «Eluate» (Eluido): «100 µL»</p>
<p><b>4.</b> Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo): C.diff ELITE_Be_ST_200_100 o C.diff ELITE_Be_PC o C.diff ELITE_Be_NC</p>	<p><b>5.</b> Cargar la mezcla PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) e insertarla en la «Cooler Unit».</p>	<p><b>6.</b> Cargar la «PCR Rack» (rejilla de PCR) con el «PCR Cassette»</p>
<p><b>7.</b> Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.</p>	<p><b>8.</b> Consultar, aprobar y almacenar los resultados.</p>	

ELITechGroup S.p.A.  
C.so Svizzera, 185, 10149 Turín, Italia  
Teléfono: +39-011 976 191

Fax: +39-011 936 76 11

Correo electrónico: [emd.support@elitechgroup.com](mailto:emd.support@elitechgroup.com)

Página web: [www.elitechgroup.com](http://www.elitechgroup.com)

