

Xpert[®] *C.difficile/Epi*

REF GXCDIFF/EPI-10

REF GXCDIFF/EPI-120

For Information Only - Not A Controlled Copy

Trademark, Patents and Copyright Statements

Cepheid[®], the Cepheid logo, GeneXpert[®] and Xpert[®] are trademarks of Cepheid.
Windows[®] is a trademark of Microsoft Corporation.

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

Copyright © Cepheid 2020. All rights reserved.

Declaraciones sobre marcas comerciales, patentes y derechos de propiedad intelectual

Cepheid[®], el logotipo de Cepheid, GeneXpert[®] y Xpert[®] son marcas comerciales de Cepheid.
Windows[®] es una marca comercial de Microsoft Corporation.

LA COMPRA DE ESTE PRODUCTO OTORGA AL COMPRADOR EL DERECHO INTRANSFERIBLE DE UTILIZARLO SEGÚN ESTE PROSPECTO. NO SE OTORGA NINGÚN OTRO DERECHO DE FORMA EXPRESA, IMPLÍCITA O POR ACCIÓN INNEGABLE. LA COMPRA DE ESTE PRODUCTO TAMPOCO OTORGA NINGÚN DERECHO DE REVENTA.

Copyright © Cepheid 2020. Reservados todos los derechos.



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
EE. UU.

Xpert[®] C.difficile/Epi

Para uso diagnóstico *in vitro*.



1 Nombre patentado

Xpert[®] C.difficile/Epi

2 Denominación común o habitual

Ensayo Xpert C.difficile/Epi

3 Indicaciones

El ensayo Cepheid Xpert[®] C. difficile/Epi es una prueba cualitativa de diagnóstico *in vitro* para la detección rápida de secuencias del gen de la toxina B y la identificación presuntiva de cepas 027/NAP1/BI toxinógenas de *Clostridium difficile* en muestras de heces informes (líquidas o blandas) recogidas de pacientes con sospecha de infección por *C. difficile* (ICD). La identificación presuntiva de cepas 027/NAP1/BI de *C. difficile* se lleva a cabo mediante la detección de secuencias del gen de la toxina binaria (CDT) y la eliminación de un solo par de bases en el nucleótido 117 del gen *tcdC*. El gen *tcdC* codifica para un regulador negativo en la producción de toxinas de *C. difficile*. La prueba se realiza en el sistema Cepheid GeneXpert Dx y utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real automatizada para detectar secuencias de genes de toxinas asociadas a *C. difficile* productor de toxinas. El ensayo Xpert C. difficile/Epi está concebido como una ayuda para el diagnóstico de la ICD. La detección de cepas 027/NAP1/BI de *C. difficile* mediante el ensayo Xpert C. difficile/Epi es presuntiva y tiene una finalidad exclusivamente epidemiológica; esto es, no está concebida para guiar o monitorizar el tratamiento de infecciones por *C. difficile*. El cultivo concomitante solo es necesario si se requiere la tipificación o recuperación adicionales de microorganismos.

4 Resumen y explicación

Clostridium difficile (*C. difficile*) es un bacilo anaerobio grampositivo formador de esporas que se asoció a enfermedades por primera vez en 1978.¹ La infección por *Clostridium difficile* (ICD) causa desde diarrea a colitis pseudomembranosa grave y potencialmente mortal.² La flora bacteriana colónica madura en un adulto sano es normalmente resistente a la colonización por *C. difficile*.³ Sin embargo, si se altera la flora normal del colon, se pierde la resistencia a la colonización. El factor de riesgo más habitual es la exposición a antibióticos.⁴ El factor de virulencia principal del *C. difficile* es la citotoxina B.⁵ Los genes que codifican para la toxina A (*tcdA*; la enterotoxina) y la toxina B (*tcdB*) forman parte del locus de patogenicidad (LocPa).^{6,7} La mayoría de las cepas patógenas son cepas positivas para la toxina A y la toxina B (A+B+), aunque se han identificado aislados variantes negativos para la toxina A y positivos para la toxina B (A-B+) como patógenos.⁸ Algunas cepas de *C. difficile* producen también una ADP ribosiltransferasa específica de actina, llamada CDT o toxina binaria. El locus de la toxina binaria contiene dos genes (*cdtA* y *cdtB*) y se localiza fuera del LocPa.⁹⁻¹¹

En los últimos años, ha habido brotes de ICD atribuidos a una serie de cepas «hipervirulentas» emergentes que incluyen cepas resistentes a la fluoroquinolona, pertenecientes al ribotipo PCR 027, NAP1 tipo PFGE y BI tipo REA.^{8,12} Las cepas de 027/NAP1/BI muestran una mayor producción de toxinas, que se atribuye a deleciones en el gen regulador *tcdC*, y se cree que producen más esporas, lo que aumenta su persistencia en el entorno.^{13,14} La identificación de un resultado 027/NAP1/BI presuntamente positivo o negativo podría ayudar en la identificación de posibles fuentes de un brote de 027/NAP1/BI.

El diagnóstico de *C. difficile* se ha basado tradicionalmente en la detección de la toxina A o B. El procedimiento de cultivo (que requiere una gran cantidad de trabajo) seguido de pruebas de citotoxicidad celular en los aislados y el ensayo celular de citotoxicidad en muestras de heces se siguen considerando el método de referencia debido a su alta especificidad.^{15,16} Se han desarrollado varios enzoinmunoanálisis rápidos para la detección de las toxinas A y B. Sin embargo, estas pruebas tienen una menor sensibilidad y especificidad que el ensayo de citotoxicidad celular. Recientemente se han desarrollado métodos de PCR para la detección de las toxinas A y B; estos métodos muestran una alta sensibilidad y especificidad en comparación con la citotoxicidad celular y los inmunoanálisis.¹⁷

5 Principio del procedimiento

El GeneXpert Dx System automatiza e integra la purificación de muestras, la amplificación de ácidos nucleicos y la detección de la secuencia diana en muestras simples o complejas mediante ensayos de PCR en tiempo real y PCR-transcriptasa inversa en tiempo real (RT-PCR). (La RT-PCR en tiempo real se utiliza para ensayos que detectan ARN; el Xpert *C. difficile/Epi* Assay utiliza la PCR en tiempo real para detectar ADN.) El sistema está formado por un instrumento, ordenador personal y software precargado para realizar las pruebas y ver los resultados. El sistema requiere el uso de cartuchos desechables de un solo uso que contengan los reactivos para la PCR y alojen el proceso de la PCR. Al tratarse de cartuchos autónomos, se elimina la contaminación cruzada entre muestras. Para ver una descripción completa del sistema, consulte el *Manual del usuario del GeneXpert Dx System*.

El Xpert *C. difficile/Epi* Assay (donde *Epi* significa epidemiológico) incluye reactivos para la detección de *C. difficile* toxinógeno y para la detección presuntiva de secuencias encontradas en cepas 027/NAP1/BI. Se incluye además un control de procesamiento de muestras (CPM). El CPM está presente para controlar el procesamiento adecuado de las bacterias diana y monitorizar la presencia de inhibidores en la reacción PCR. El control de comprobación de sondas (CCS) verifica la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de PCR en el cartucho, la integridad de las sondas y la estabilidad de los colorantes.

El Cepheid Xpert *C. difficile/Epi* Assay es una prueba de diagnóstico *in vitro* automatizada y rápida para la detección cualitativa de *Clostridium difficile* productor de toxinas directamente a partir de muestras fecales informes (líquido o blandas) de pacientes con sospecha de infección por *Clostridium difficile* (ICD). El ensayo detecta el gen de la toxina B (*tcdB*), el gen de la toxina binaria (CDT), y la eliminación de un solo par de bases en el nucleótido 117 del gen que codifica para un regulador negativo de la producción de toxinas (*tcdCA117*). La presencia combinada de los genes que codifican la toxina B y la toxina binaria y la eliminación del *tcdCA117* se han asociado con una cepa hipervirulenta de *C. difficile* conocida como 027/NAP1/BI, que se ha relacionado con brotes patógenos graves en centros sanitarios de todo el mundo.^{12,13,15} El ensayo se realiza en el Cepheid GeneXpert Dx System.

6 Reactivos e instrumentos

6.1 Materiales suministrados



El kit del ensayo Xpert *C. difficile/Epi* (GXCDIFF/EPI-10) contiene reactivos suficientes para procesar 10 muestras de pacientes o de control de calidad. El kit del ensayo Xpert *C. difficile/Epi* (GXCDIFF/EPI-120) contiene reactivos suficientes para procesar 120 muestras de pacientes o de control de calidad.

Los kits contienen lo siguiente:

Cartuchos del ensayo Xpert <i>C. difficile/Epi</i> con tubos de reacción integrados	10	120
<ul style="list-style-type: none"> • Microesfera 1, microesfera 2 y microesfera 3 (liofilizadas) • Reactivo 1 • Reactivo 2 (hidróxido sódico) 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 de cada por cartucho • 3,0 ml por cartucho • 3,0 ml por cartucho 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 de cada por cartucho • 3,0 ml por cartucho • 3,0 ml por cartucho
Bolsa de reactivo del ensayo Xpert <i>C. difficile/Epi</i>	1 por kit	1 por kit
<ul style="list-style-type: none"> • Reactivo para muestras (tiocianato de guanidinio) 	<ul style="list-style-type: none"> • 10 x 2,0 ml por frasco 	<ul style="list-style-type: none"> • 120 x 2,0 ml por frasco
CD	1 por kit	1 por kit
<ul style="list-style-type: none"> • Archivo de definición del ensayo (Assay Definition File, ADF) • Instrucciones para importar el ADF en el software GX • Instrucciones de uso (prospecto) 		

Nota

Las fichas de datos de seguridad (SDS, Safety Data Sheets) están disponibles en www.cepheid.com o www.cepheidinternational.com, en la ficha de **ASISTENCIA (SUPPORT)**.

Nota

La albúmina sérica bovina (BSA) del interior de las microesferas de este producto se obtuvo y se fabricó exclusivamente a partir de plasma bovino originario de Estados Unidos. Los animales no fueron alimentados con proteínas de rumiantes ni con otras proteínas animales; los animales superaron las pruebas ante y post mórtem. Durante el procesamiento, no hubo mezcla del material con otros materiales de origen animal.

7 Materiales requeridos pero no suministrados

- Sistema GeneXpert Dx (el número de catálogo varía según la configuración): Instrumento GeneXpert, ordenador con software propietario GeneXpert versión 4.3 o posterior, lector portátil de códigos de barras y *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx*
- Impresora: Si se requiere una impresora, póngase en contacto con el servicio técnico de Cepheid para organizar la compra de una impresora recomendada.
- Agitadora vorticial
- Hisopo seco para la transferencia de la muestra de heces, dispositivo de recogida de muestras de Cepheid número de catálogo 900-0370 (cultivo Copan Venturi Transystem®, 139CFA) o el hisopo desechable de-un solo uso de Cepheid, número de catálogo SDPS-120 (Copan 138CS01.PH)
- Pipetas de transferencia desechables


8 Materiales disponibles pero no suministrados

KWIK-STIKs™ de MicroBioLogics, n.º de catálogo 0329 (*C. difficile* toxinógeno) como control positivo, y n.º de catálogo 0527 (*C. difficile* no toxinógeno) y n.º de catálogo 0331 (*C. sordelli*) como controles negativos


También hay disponibles cepas de *C. difficile* ATCC n.º 9689 (con *C. difficile* toxinógeno de tipo natural) y n.º BAA-1870 (NAP1/027 *C. difficile*) como controles positivos, y n.º 700057 (*C. difficile* no toxinógeno) como control negativo.

Además, pueden obtenerse cepas de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, División de Promoción de la Calidad Sanitaria (Centers for Disease Control and Prevention, Division of Healthcare Quality Promotion).

9 Advertencias y precauciones

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Para uso exclusivo con receta.
- Los resultados de los ensayos Xpert *C. difficile/Epi* NO están indicados como guía para el tratamiento de infecciones por *C. difficile*.²¹
-  Trate todas las muestras biológicas, incluidos los cartuchos y los reactivos usados, como posibles agentes transmisores de infecciones. Con frecuencia es imposible saber qué muestras podrían ser infecciosas, por lo que todas las muestras biológicas deben tratarse tomando las precauciones habituales. Las directrices para la manipulación de las muestras están disponibles en los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention)¹⁹ y el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute)²⁰ de Estados Unidos.
- Siga los procedimientos de seguridad de su centro para trabajar con productos químicos y manipular muestras biológicas.
- Si el ensayo Xpert *C. difficile/Epi* se realiza fuera del tiempo de conservación y de los intervalos de temperatura de almacenamiento recomendados, es posible que se obtengan resultados erróneos o no válidos.
- No se ha establecido la eficacia diagnóstica en pacientes <2 años.
- El ensayo Xpert *C. difficile/Epi* no proporciona resultados de sensibilidad. Se requiere una alícuota independiente de la muestra y tiempo adicional para realizar el cultivo y la prueba de sensibilidad.
- No sustituya los reactivos del ensayo Xpert *C. difficile/Epi* por otros reactivos.
- No abra la tapa del cartucho del ensayo Xpert *C. difficile/Epi* excepto cuando vaya a añadir la muestra y los reactivos, o a repetir la prueba.
- No utilice cartuchos que se hayan caído después de extraerlos del empaquetado.
- No utilice cartuchos con tubos de reacción dañados.
- Cada cartucho de un solo uso del ensayo Xpert *C. difficile/Epi* se utiliza para procesar una prueba. No vuelva a utilizar los cartuchos usados.
- Las muestras biológicas, los dispositivos de transferencia y los cartuchos usados deben ser considerados capaces de transmitir agentes infecciosos, y requieren las precauciones habituales. Siga los procedimientos de eliminación de desechos de su centro para la eliminación adecuada de los cartuchos usados y los reactivos no utilizados. Estos materiales pueden presentar características propias de los residuos químicos peligrosos, que requieren procedimientos específicos de eliminación de carácter nacional o regional. Si las normativas nacionales o regionales no proporcionan instrucciones claras en cuanto a los procedimientos de eliminación adecuados, las muestras biológicas y los cartuchos usados deben desecharse de conformidad con las directrices de la OMS [Organización Mundial de la Salud] relativas a la manipulación y eliminación de desechos médicos.

10 Peligros químicos^{23,24}

- Pictograma de peligro del SGA de la ONU: 
- Palabra de advertencia: ATENCIÓN
- **Declaraciones de peligro del SGA de la ONU**
 - Nocivo en caso de ingestión.
 - Provoca irritación cutánea.
 - Provoca irritación ocular grave.
- **Declaraciones de precaución del SGA de la ONU**
 - **Prevención**
 - Lavarse concienzudamente tras la manipulación.
 - No comer, beber ni fumar durante su utilización.
 - Evitar su liberación al medio ambiente.
 - Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
 - **Respuesta**
 - EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.
 - Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.
 - Se necesita un tratamiento específico (ver información adicional de medidas de primeros auxilios).
 - En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.
 - EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
 - Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.
 - EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico si se encuentra mal.
 - Enjuagarse la boca.
 - **Almacenamiento/eliminación**
 - Eliminar el contenido/el recipiente en conformidad con los reglamentos locales, regionales, nacionales e internacionales.

11 Conservación y manipulación



- Conserve el kit del ensayo Xpert *C. difficile/Epi* a una temperatura entre 2 °C y 28 °C.
- No utilice los reactivos ni los cartuchos después de la fecha de caducidad indicada.
- No abra la tapa del cartucho hasta el momento de realizar la prueba.
- No utilice ningún reactivo que presente turbidez o un cambio de color.

12 Recogida y transporte de muestras

1. Recoja la muestra de heces informe en un recipiente limpio. Siga las directrices de su centro para la recogida de muestras para las pruebas de *C. difficile*.
2. Etiquételo con la ID de la muestra y envíelo al laboratorio.



3. Conserve la muestra a una temperatura entre 2 °C y 8 °C. La muestra es estable un máximo de 5 días cuando se conserva entre 2 °C y 8 °C. Las muestras también pueden mantenerse a temperatura ambiente (20 °C a 30 °C) durante un máximo de 24 horas.

13 Procedimiento

13.1 Preparación del cartucho

Importante Inicie la prueba antes de que transcurran 30 minutos desde que se añadió la muestra al cartucho.

Para añadir la muestra al cartucho:

1. Extraiga el cartucho y el reactivo para muestras del envase.
2. Coloque brevemente un hisopo en la muestra de heces informe. No es necesario saturar el hisopo completamente.
3. Introduzca el hisopo en el vial que contiene el reactivo para muestras.

Nota Utilice una gasa estéril para reducir al mínimo los riesgos de contaminación.

4. Sujete el hisopo por el vástago cerca del borde del vial, levante el hisopo unos milímetros del fondo del tubo y presione el vástago contra el borde del vial para romperlo. Asegúrese de que el hisopo sea lo suficiente corto para que la tapa pueda cerrarse bien.
5. Cierre la tapa y agite en el mezclador vortex a alta velocidad durante 10 segundos.
6. Abra la tapa del cartucho. Con una pipeta de transferencia limpia (no suministrada), transfiera todo el contenido del reactivo para muestras a la cámara de muestras del cartucho del ensayo Xpert C. *difficile/Epi*.
7. Cierre la tapa del cartucho.

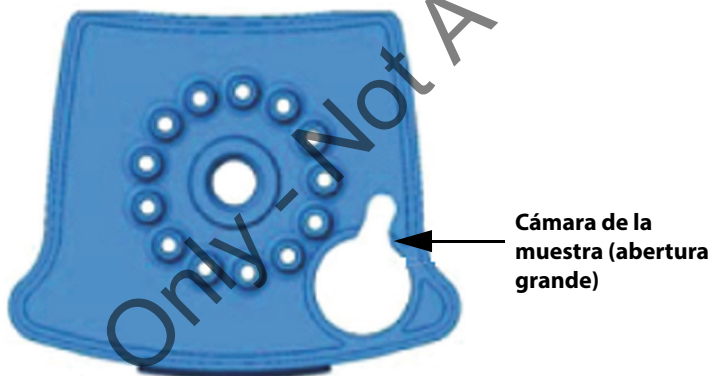


Figura 1. Cartucho del Xpert C. *difficile/Epi* (vista superior).

13.2 Inicio de la prueba

Importante Antes de iniciar la prueba, asegúrese de que se ha importado en el software GeneXpert el archivo de definición del ensayo Xpert C. *difficile/Epi*.

Este apartado enumera los pasos predeterminados para utilizar el sistema del instrumento GeneXpert. Para obtener instrucciones detalladas, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx*.

Nota Los pasos que debe seguir pueden ser diferentes si el administrador del sistema cambió el flujo de trabajo predeterminado del sistema.

1. Encienda el instrumento GeneXpert Dx y, a continuación, encienda el ordenador. El software GeneXpert se iniciará automáticamente o podría ser necesario hacer doble clic en el icono de acceso directo del software GeneXpert Dx en el escritorio de Windows®.
2. Inicie una sesión en el software del sistema GeneXpert Dx con su nombre de usuario y su contraseña.
3. En la ventana del sistema GeneXpert Dx, haga clic en **Crear prueba (Create Test)**. Se abre la ventana **Crear prueba (Create Test)**.
4. Escanee la Id. paciente (Patient ID) (opcional). Si escribe la Id. paciente (Patient ID), asegúrese de escribirla correctamente. La ID del paciente (Patient ID) se asocia a los resultados de la prueba y se muestra en la ventana **Ver resultados (View Results)**.

5. Escanee o escriba la Id. muestra (Sample ID). Si escribe la Id. muestra (Sample ID), asegúrese de escribirla correctamente. La ID de la muestra (Sample ID) se asocia a los resultados de la prueba, y se muestra en la ventana **Ver resultados (View Results)**.
6. Escanee el código de barras del cartucho del ensayo Xpert *C. difficile/Epi*. El software utiliza la información del código de barras para rellenar automáticamente los cuadros de los campos siguientes: Seleccionar ensayo (Select Assay), Id. del lote (Reagent Lot ID), N° de serie del cartucho (Cartridge SN) y Fecha de caducidad (Expiration Date).

Nota Si no es posible leer el código de barras del cartucho del ensayo Xpert *C. difficile/Epi*, repita la prueba con un cartucho nuevo.

7. Haga clic en **Iniciar prueba (Start Test)**. En el cuadro de diálogo que aparece, teclee su contraseña.
8. Abra la puerta del módulo del instrumento que tiene la luz verde intermitente y cargue el cartucho.
9. Cierre la puerta. La prueba se inicia y la luz verde deja de parpadear. Una vez finalizada la prueba, la luz se apaga.
10. Espere hasta que el sistema desbloquee la puerta del módulo antes de abrirla y retirar el cartucho.
11. Elimine los cartuchos usados en un recipiente de residuos de muestras adecuado, de acuerdo con las prácticas habituales de su centro.

CONTROL

14 Visualización e impresión de los resultados

Para obtener instrucciones detalladas para ver e imprimir los resultados, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx*.

15 Control de calidad

Cada prueba incluye un control de procesamiento de muestras (SPC) y un control de comprobación de la sonda (PCC).

Control de procesamiento de muestras (SPC): garantiza que la muestra se ha procesado correctamente. El SPC contiene esporas de *Bacillus globigii* en forma de una torta de esporas secas que se incluye en cada cartucho para verificar el procesamiento adecuado de las bacterias de la muestra. El SPC confirma que se ha producido la lisis de las bacterias y esporas de *C. difficile*, si los microorganismos están presentes, y verifica que el procesamiento de la muestra es adecuado. Además, este control detecta la inhibición asociada a la muestra del ensayo de PCR en tiempo real. El SPC debe ser positivo en una muestra negativa, y puede ser negativo o positivo en una muestra positiva. El SPC se considera superado si cumple los criterios de aceptación validados.

Control de comprobación de la sonda (PCC): antes de iniciar la reacción PCR, el sistema GeneXpert Dx mide la señal de fluorescencia de las sondas para monitorizar la rehidratación de las microesferas, el llenado del tubo de reacción, la integridad de las sondas y la estabilidad de los colorantes. La comprobación de la sonda se considera superada si cumple los criterios de aceptación asignados.

Controles externos: siguiendo las buenas prácticas de laboratorio, se pueden utilizar controles externos de acuerdo con las organizaciones de acreditación locales, regionales y nacionales, según corresponda.

16 Interpretación de los resultados

El sistema GeneXpert Dx interpreta los resultados a partir de las señales fluorescentes medidas y de los algoritmos de cálculo incorporados, y los muestra en la ventana **Ver resultados (View Results)**. Los resultados posibles se resumen en la Tabla 1; a continuación de la tabla se incluye más información.

Tabla 1. Resultados posibles del ensayo Xpert C.difficile/Epi

Resultados				Interpretaciones	Ejemplo ^a
Toxina B	Toxina binaria	tcdC	SPC		
+	+	+	+/-	Toxigenic <i>C. diff</i> POSITIVO; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE POSITIVO (Toxigenic <i>C. diff</i> POSITIVE; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE POSITIVE)	Figura 2
+	+	-	+/-	Toxigenic <i>C. diff</i> POSITIVO; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVO (Toxigenic <i>C. diff</i> POSITIVE; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVE)	Figura 3
	-	+	+/-		
	-	-	+/-		
-	+	+	+	Toxigenic <i>C. diff</i> NEGATIVO; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVO (Toxigenic <i>C. diff</i> NEGATIVE; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVE)	Figura 4
	+	-	+		
	-	+	+		
	-	-	+		

- a. Se muestran capturas de pantalla de las muestras, correspondientes a los resultados positivos y negativos de *C. difficile*/Epi, y a un resultado NO VÁLIDO (INVALID). Consulte la Figura 2 a la Figura 5. No se muestran ejemplos de ERROR ni de SIN RESULTADO (NO RESULT).

Tabla 2. Resultados e interpretaciones del Xpert C.difficile/Epi

Resultado	Interpretación
Toxigenic C.diff POSITIVO; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE POSITIVO (Toxigenic C. diff POSITIVE; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE POSITIVE) (Figura 2)	<p>Se detectan secuencias de ADN diana de <i>C. difficile</i> productor de toxinas, presuntamente 027/NAP1/BI.</p> <ul style="list-style-type: none"> La diana de <i>C. difficile</i> toxínogeno (toxina B) Y ambas dianas presuntamente 027/NAP1/BI (toxina binaria y <i>tcdCA117</i>) tienen valores de Ct dentro del rango válido y valores extremos por encima del valor mínimo configurado. SPC – NA (no aplicable); el SPC se omite, ya que la amplificación de la diana de <i>C. difficile</i> podría competir con este control. Comprobación de la sonda–SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda superan la comprobación. <p>Nota: Los aislados distintos del 027/NAP1/BI que representan el toxinotipo XIV y ocasionalmente los toxinotipos IV, V y X se notifican como «Toxigenic C. diff POSITIVE; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE POSITIVE» (<i>C. diff</i> toxínogeno POSITIVO; 027-NAP1-BI PRESUNTO POSITIVO) con el Xpert C. <i>difficile</i>/Epi Assay</p>
Toxigenic C.diff POSITIVO; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVO (Toxigenic C. diff POSITIVE; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVE) (Figura 3)	<p>Se detectan secuencias de ADN diana de <i>C. difficile</i> productor de toxinas.</p> <ul style="list-style-type: none"> La diana de <i>C. difficile</i> toxínogeno (toxina B) Y solo una o ninguna de las dianas presuntamente 027/NAP1/BI (toxina binaria y <i>tcdCA117</i>) tienen valores de Ct dentro del rango válido y valores extremos por encima del valor mínimo configurado. SPC – NA (no aplicable); el SPC se omite, ya que la amplificación de la diana de <i>C. difficile</i> podría competir con este control. Comprobación de la sonda–SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda superan la comprobación.
Toxigenic C.diff NEGATIVO; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVO (Toxigenic C. diff NEGATIVE; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVE) (Figura 4)	<p>No se detectan secuencias de ADN diana de <i>C. difficile</i> productor de toxinas.</p> <ul style="list-style-type: none"> La diana de <i>C. difficile</i> toxínogeno (toxina B) no se detecta (independientemente de que se detecte la toxina binaria o <i>tcdCA117</i>). SPC – SUPERADO (PASS); el SPC tiene un Ct dentro del rango válido y un valor extremo por encima del valor mínimo configurado. Comprobación de la sonda–SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda superan la comprobación.
NO VÁLIDO (INVALID) (Figura 5)	<p>No puede determinarse la presencia o ausencia de ADN diana de <i>C. difficile</i>. Repita la prueba de acuerdo con las instrucciones de la sección «Procedimiento de repetición de la prueba», a continuación.</p> <ul style="list-style-type: none"> SPC – NO PASA (FAIL); el resultado de la diana del SPC es negativo, el Ct del SPC no está dentro del rango válido y el valor extremo está por debajo del valor mínimo configurado. Comprobación de la sonda–SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda superan la comprobación.
ERROR	<p>No puede determinarse la presencia o ausencia de ADN diana de <i>C. difficile</i>. Repita la prueba de acuerdo con las instrucciones del apartado siguiente.</p> <ul style="list-style-type: none"> Dianas de <i>C. difficile</i> productor de toxinas — SIN RESULTADO (NO RESULT) Toxina binaria (CDT) — SIN RESULTADO (NO RESULT) <i>tcdCA117</i> — SIN RESULTADO (NO RESULT) <p>Comprobación de la sonda — NO PASA (FAIL)*; uno o más de los resultados de la comprobación de la sonda fallan.</p> <p>*Si se superó la comprobación de la sonda, el error se debe a que el límite máximo de presión excedió el rango aceptable.</p>

Tabla 2. Resultados e interpretaciones del Xpert C.difficile/Epi (continuación)

Resultado	Interpretación
SIN RESULTADO (NO RESULT)	<p>No puede determinarse la presencia o ausencia de ADN diana de <i>C. difficile</i>. Repita la prueba de acuerdo con las instrucciones del apartado siguiente.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dianas de <i>C. difficile</i> productor de toxinas — SIN RESULTADO (NO RESULT) • Toxina binaria (CDT) — SIN RESULTADO (NO RESULT) • <i>tcdC</i>Δ117 — SIN RESULTADO (NO RESULT) • Comprobación de la sonda — N/A (no aplicable)

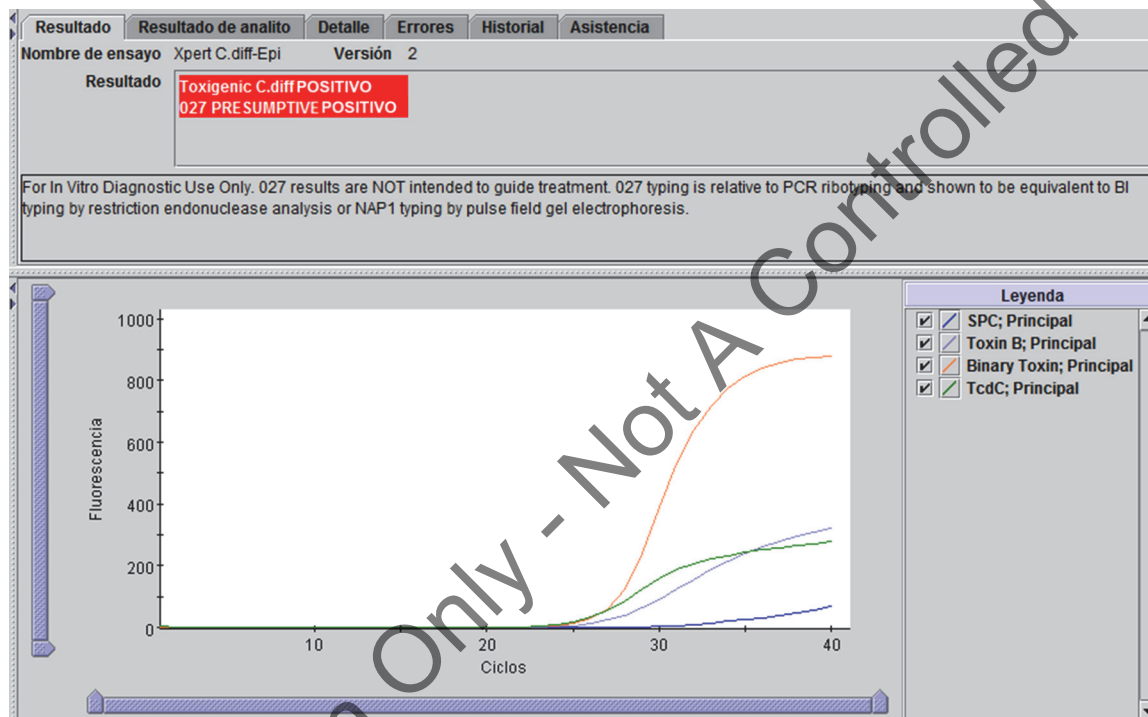


Figura 2. Ejemplo de un resultado Toxigenic *C.diff* POSITIVO; 027 PRESUMPTIVE POSITIVO
(Toxigenic *C.diff* POSITIVO; 027 PRESUMPTIVE POSITIVO)

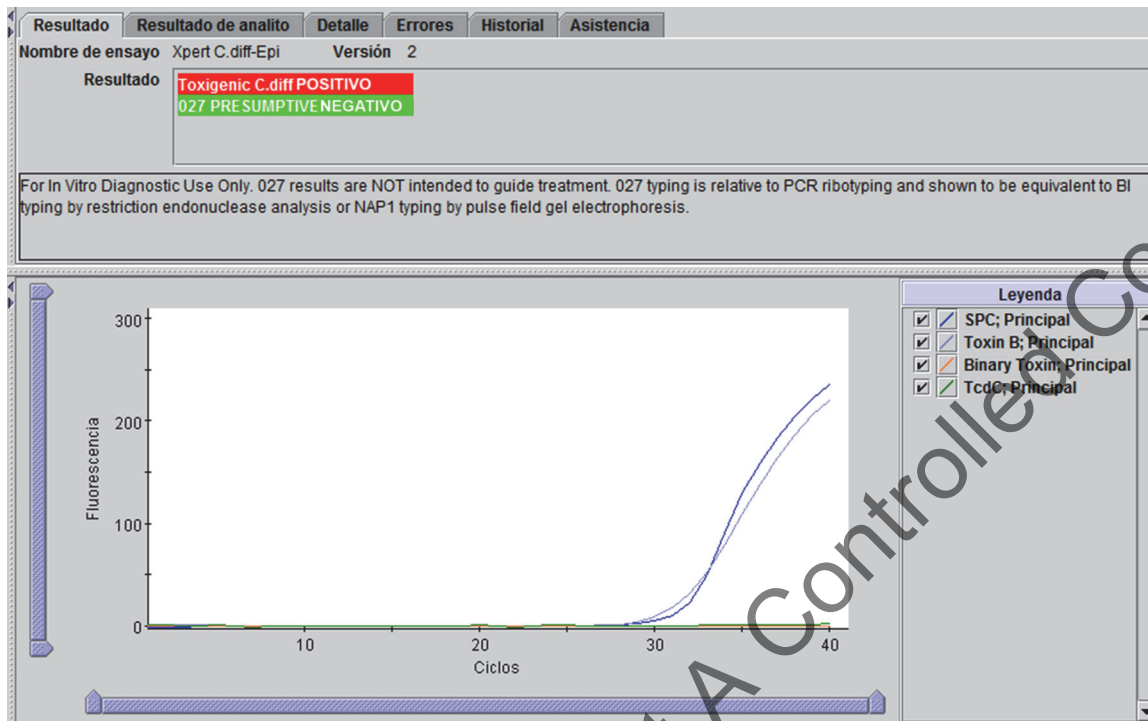


Figura 3. Ejemplo de un resultado Toxigenic C.diff POSITIVO; 027 PRESUMPTIVE NEGATIVO (Toxigenic C.diff POSITIVE; 027 PRESUMPTIVE NEGATIVE)

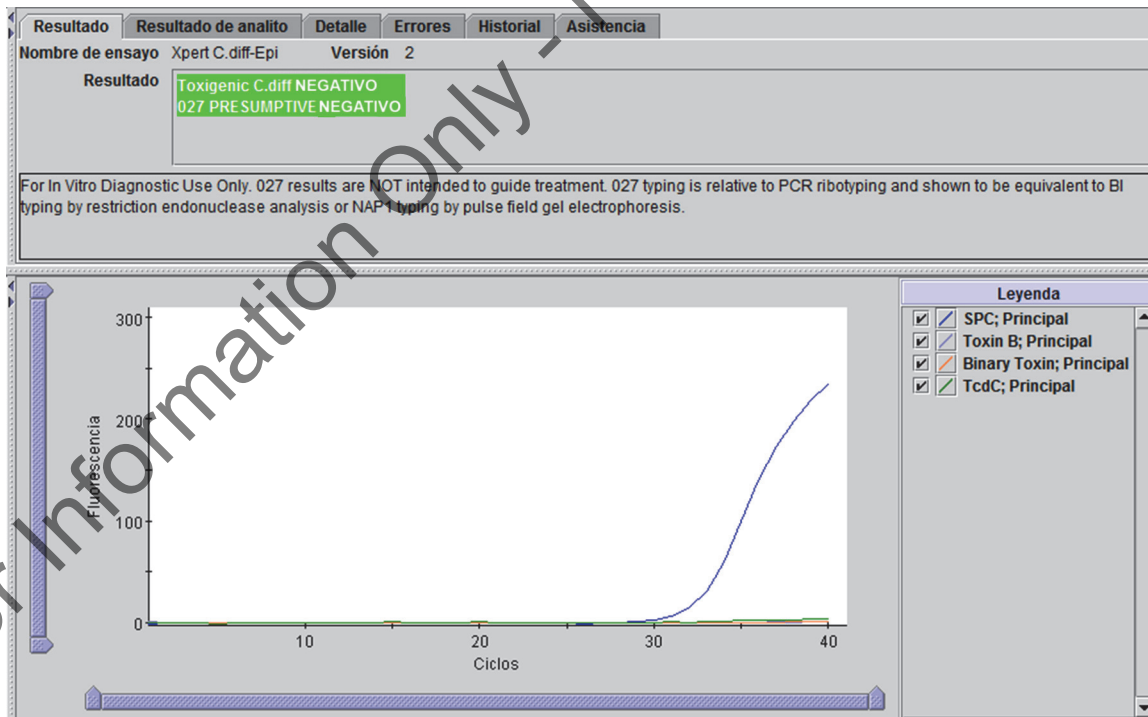


Figura 4. Ejemplo de un resultado Toxigenic C.diff NEGATIVO; 027 PRESUMPTIVE NEGATIVO (Toxigenic C.diff NEGATIVE; 027 PRESUMPTIVE NEGATIVE)

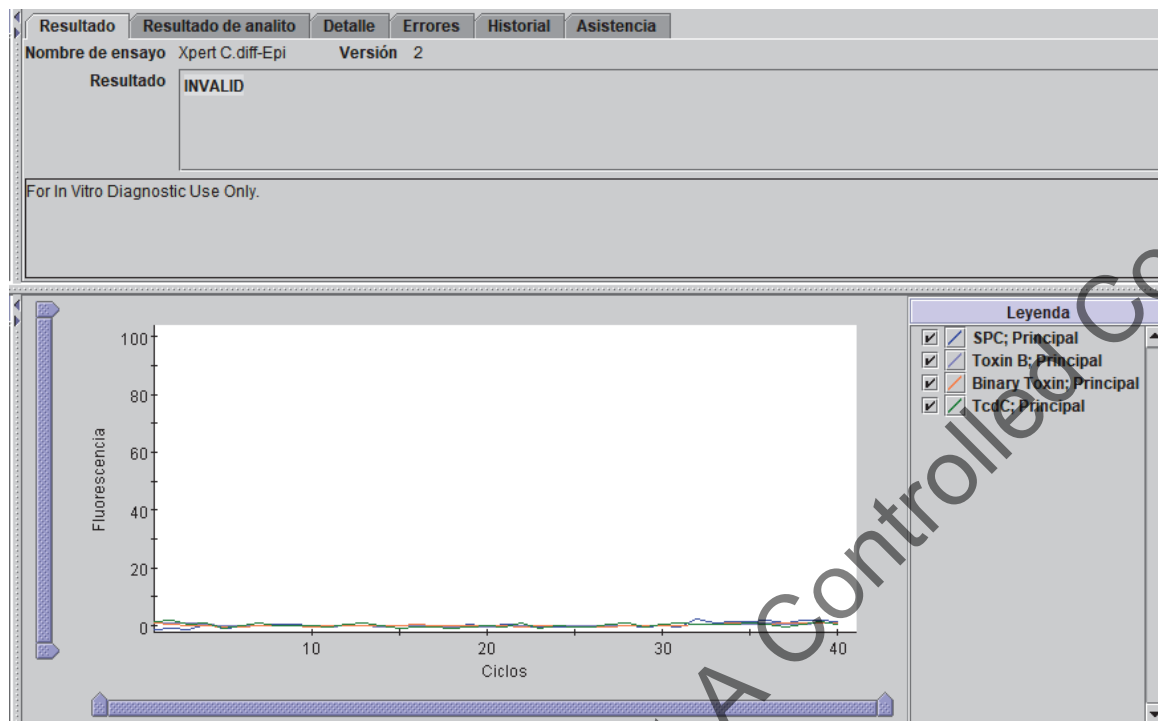


Figura 5. Ejemplo de un resultado NO VÁLIDO (INVALID)

17 Motivos para repetir el ensayo

Si se obtiene alguno de los resultados de la prueba que se mencionan a continuación, repita la prueba de acuerdo con las instrucciones del apartado Procedimiento de repetición de la prueba, a continuación.

Un resultado **NO VÁLIDO (INVALID)** indica que el control SPC falló. La muestra no se procesó correctamente o la PCR se inhibió.

Un resultado de **ERROR** indica que el control de comprobación de la sonda falló y se canceló el ensayo. Las posibles causas son: el tubo de reacción no se llenó correctamente; se detectó un problema de integridad en la sonda del reactivo o se excedieron los límites máximos de presión.

SIN RESULTADO (NO RESULT) indica que no se han recogido suficientes datos. Por ejemplo, si el operador detuvo una prueba en curso.

17.1 Procedimiento de repetición de la prueba

Para repetir la prueba antes de 3 horas de haber obtenido un resultado indeterminado, utilice un cartucho nuevo (no vuelva a utilizar el cartucho) y reactivos nuevos.

1. Transfiera el contenido restante de la cámara de muestras a un nuevo vial de reactivo para muestras con una pipeta de transferencia desechable.
2. Agite en el mezclador vórtex y añada todo el contenido del reactivo para muestras a la cámara de muestras del nuevo cartucho del ensayo Xpert C. *difficile*/Epi.
3. Cierre la tapa e inicie la nueva prueba.

Para repetir la prueba después de 3 horas de haber obtenido un resultado indeterminado, repita la prueba con una nueva muestra en hisopo.

18 Limitaciones

- Los aislados distintos del 027/NAP1/BI que representan el toxinotipo XIV se notifican como **Toxigenic C.diff POSITIVO; 027 PRESUMPTIVE POSITIVO (Toxigenic C. diff POSITIVE; 027 PRESUMPTIVE POSITIVE)** con el ensayo Xpert C. *difficile*/Epi.
- Ocasionalmente, los aislados distintos del 027/NAP1/BI que representan los toxinotipos IV, V y X se notifican como **Toxigenic C.diff POSITIVO; 027 PRESUMPTIVE POSITIVO (Toxigenic C. diff POSITIVE; 027 PRESUMPTIVE POSITIVE)** con el ensayo Xpert C. *difficile*/Epi.
- El rendimiento del ensayo Xpert C. *difficile*/Epi se validó únicamente con los procedimientos descritos en este prospecto. Las modificaciones de estos procedimientos pueden afectar al rendimiento de la prueba.
- Los resultados positivos observados con pacientes pediátricos inmunodeprimidos pueden reflejar un estado de portador asintomático de C. *difficile*/Epi.
- La detección de ácido nucleico de C. *difficile* en las heces confirma la presencia de estos microorganismos en pacientes diarreicos, pero este hallazgo no es necesariamente indicativo de que C. *difficile* sea el agente etiológico de la diarrea.
- Los resultados del ensayo Xpert C. *difficile*/Epi deben interpretarse junto con otros datos de laboratorio y clínicos de los que disponga el médico.
- Pueden obtenerse resultados erróneos de la prueba debido a la recogida incorrecta de la muestra, a no seguirse los procedimientos recomendados para la recogida, manipulación y conservación de las muestras, a un error técnico, a la confusión de la muestra o a que el número de microorganismos en la muestra sea demasiado bajo para detectarse mediante la prueba. El estricto cumplimiento de las instrucciones de este prospecto es necesario para evitar resultados erróneos.
- Debido al factor de dilución asociado con el procedimiento de repetición de la prueba, es posible que muestras positivas de C. *difficile*, muy próximas o en el límite de detección (LD) del ensayo C. *difficile*/Epi, puedan dar un resultado negativo falso al repetir la prueba.
- Se ha observado inhibición del ensayo Xpert C. *difficile*/Epi en presencia de las siguientes sustancias: pasta de óxido de zinc y crema Vagisil®.
- Los brotes de ICD pueden estar causados por cepas distintas a la 027/NAP1/BI.
- Pueden obtenerse resultados negativos falsos cuando el microorganismo infectante tiene mutaciones, inserciones, eliminaciones o reorganizaciones genómicas, o cuando la prueba se realiza en una fase muy precoz de la enfermedad.

19 Valores esperados

En el estudio clínico del ensayo Xpert *C. difficile/Epi* se incluyó un total de 2293 muestras de heces informes de siete centros de todo Estados Unidos y Canadá. El número y porcentaje de casos positivos de *C. difficile* toxinógeno por cultivo, calculados por edad y sexo, se presentan en la Tabla 3 y la Tabla 4, respectivamente.

Tabla 3. Prevalencia observada de *C. difficile* toxinógeno por grupo de edad^a

Grupos de edad	N	Prevalencia de <i>C. difficile</i> toxinógeno (incluye 027/NAP1/BI)	Prevalencia de 027/NAP1/BI
2-5	16	37,5 % (6/16)	12,5 % (2/16)
6-21	105	12,4 % (13/105)	0,9 % (1/105)
22-59	898	16,4 % (147/898)	3,3 % (30/898)
>60	1274	20,7 % (264/1274)	7,2 % (92/1274)
Total	2293	18,8 % (430/2293)	5,5 % (125/2293)

a. Prevalencia basada en los resultados de Xpert.

Tabla 4. Prevalencia observada de *C. difficile* toxinógeno por sexo^a

Sexo	N	Prevalencia de <i>C. difficile</i> toxinógeno (incluye 027/NAP1/BI)	Prevalencia de 027/NAP1/BI
Varones	1072	18,2 % (195/1072)	5,0 % (54/1072)
Mujeres	1221	19,2 % (235/1221)	5,8 % (71/1221)
Total	2293	18,8 % (430/2293)	5,5 % (125/2293)

a. Prevalencia basada en los resultados de Xpert.

20 Eficacia diagnóstica

20.1 Rendimiento clínico

La eficacia diagnóstica del ensayo Xpert *C. difficile/Epi* se determinó en un estudio de investigación multicéntrico prospectivo en siete centros de EE. UU. y Canadá mediante la comparación del ensayo Xpert *C. difficile/Epi* con un cultivo de referencia seguido de una prueba de citotoxicidad celular en los aislados y de la tipificación de cepas toxinógenas por métodos de PCR-ribotipificación, electroforesis en gel de campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) y análisis de endonucleasas de restricción (restriction endonuclease analysis, REA).²²

Los sujetos incluyeron personas cuya atención médica ordinaria exigía la prueba de *C. difficile*. Se obtuvo una parte de cada muestra de heces informe sobrante para analizarla con el ensayo Xpert *C. difficile/Epi*. La muestra sobrante se envió a un laboratorio central para analizarla mediante el método del cultivo de referencia y la prueba de citotoxina B. Cada muestra de heces se inoculó sobre una placa directa de agar-fructosa con cicloserina y cefoxitina (CCFA-D) prerreducida y caldo de manitol, cicloserina y cefoxitina con taurocolato, lisozima y cisteína (CCMB-TAL). Después de 24 horas, se llevó a cabo un subcultivo del CCMB-TAL en una segunda placa CCFA-E (CCFA enriquecido). De aquí en adelante nos referiremos al método de cultivo enriquecido directo como «cultivo de referencia».

En los casos en que se aisló *C. difficile* de la placa CCFA-D y el aislado fue positivo en el ensayo de citotoxicidad celular, la muestra se clasificó como «*C. difficile* toxinógeno positivo (toxigenic *C. difficile* positive)» y la placa CCFA-E no se sometió a análisis adicionales. En los casos en los que no se aisló *C. difficile* de la placa CCFA-D o el aislado fue negativo en el ensayo de citotoxicidad celular, la placa CCFA-E se sometió a análisis adicionales.

Si la placa CCFA-E fue positiva para *C. difficile* y el aislado fue positivo en el ensayo de citotoxicidad celular, la muestra se clasificó como «*C. difficile* toxinógeno positivo (toxigenic *C. difficile* positive)». La muestra se notificó como «negativa» si la placa CCFA-E fue negativa para *C. difficile* o el aislado fue negativo en el ensayo de citotoxicidad celular.

Tras analizar el cultivo de referencia, los aislados positivos para *C. difficile* toxinógeno se enviaron a un segundo grupo de laboratorios de referencia para la identificación de la cepa mediante REA, PFGE y PCR-ribotipificación.

Se calculó el rendimiento del ensayo Xpert *C. difficile*/Epi en relación con los resultados del cultivo directo con tipificación de cepas y del cultivo de referencia con tipificación de cepas, para cada uno de los métodos de tipificación de tres cepas.

20.2 Resultados generales

Se analizó un total de 2293 muestras mediante el ensayo Xpert *C. difficile*/Epi, cultivo y tipificación de cepas.

20.3 Rendimiento frente al cultivo directo

En relación con el cultivo directo con tipificación de cepas por REA, el ensayo Xpert *C. difficile*/Epi mostró una sensibilidad para el *C. difficile* toxinógeno del 98,72 % y una especificidad del 90,86 %. El ensayo Xpert *C. difficile*/Epi también demostró una concordancia positiva del 98,55 % y una concordancia negativa del 97,65 % para BI (Tabla 5).

Tabla 5. Rendimiento del ensayo Xpert *C. difficile*/Epi frente al cultivo directo y REA

Cultivo directo y REA					
		Toxina B+ BI +	Toxina B+ BI -	NEG	Total ^a
Xpert <i>C. diff</i> /Epi ^b	Toxina B+ 027/NAP1/BI+	68	5	47	120
	Toxina B+ 027/NAP1/BI-	1	158	140	299
	NEG	0	3	1860	1863
	Total	69	166	2047	2282
		<i>C. difficile</i> toxinógeno		<i>C. difficile</i> toxinógeno / 027/NAP1/BI	
		Sensibilidad:	98,72 % (232/235)	Concordancia pos:	98,55 % (68/69)
		Especificidad:	90,86 % (1860/2047)	Concordancia neg:	97,65 % (2161/2213)
		Precisión:	91,67 % (2092/2282)	Precisión:	97,68 % (2229/2282)
		VPP ^c :	55,37 % (232/419)	VPP:	56,67 % (68/120)
		VPN ^d :	99,84 % (1860/1863)	VPN:	99,95 % (2161/2162)

- 11 muestras fueron positivas en el cultivo, pero no se tipificaron las cepas por las siguientes razones: digestión parcial con endonucleasas de restricción o no se envió el aislado. Estas 11 muestras no se incluyen en la eficacia diagnóstica anterior.
- Los resultados del Xpert mostrados corresponden al primer o el segundo intento. Aproximadamente un 3,2 % de las muestras fueron indeterminadas en el primer intento.
- Valor predictivo positivo
- Valor predictivo negativo

En comparación con el cultivo directo con tipificación de cepas por PFGE, el ensayo Xpert *C. difficile*/Epi mostró una sensibilidad para el *C. difficile* toxinógeno del 98,76 % y una especificidad del 90,86 %. El ensayo Xpert *C. difficile*/Epi también mostró una concordancia positiva del 100 % y una concordancia negativa del 97,61 % para NAP1 (Tabla 6).

Tabla 6. Rendimiento del ensayo Xpert *C. difficile*/Epi frente al cultivo directo y PFGE

Cultivo directo y PFGE					
		Toxina B+ NAP1+	Toxina B+ NAP1-	NEG	Total ^a
Xpert <i>C. diff</i> / Epi ^b	Toxina B+ 027/NAP1/BI+	71	6	47	124
	Toxina B+ 027/NAP1/BI-	0	161	140	301
	NEG	0	3	1860	1863
	Total	71	169	2047	2288
<i>C. difficile</i> toxinógeno			<i>C. difficile</i> toxinógeno / 027/NAP1/BI		
Sensibilidad: 98,76 % (238/241)			Concordancia pos: 100 % (71/71)		
Especificidad: 90,86 % (1860/2047)			Concordancia neg: 97,61 % (2163/2216)		
Precisión: 91,70 % (2098/2288)			Precisión: 97,68 % (2234/2288)		
VPP ^c : 56,00 % (238/425)			VPP: 57,26 % (71/124)		
VPN ^d : 99,84 % (1860/1863)			VPN: 100 % (2164/2164)		

- 5 muestras fueron positivas en el cultivo, pero no se tipificaron las cepas por las siguientes razones: digestión parcial con endonucleasas de restricción, crecimiento nulo o contaminación. Estas 5 muestras no se incluyen en la eficacia diagnóstica anterior.
- Los resultados del Xpert mostrados corresponden al primer o el segundo intento. Aproximadamente un 3,2 % de las muestras fueron indeterminadas en el primer intento.
- Valor predictivo positivo
- Valor predictivo negativo

En comparación con el cultivo directo con PCR-ribotipificación, el ensayo Xpert *C. difficile*/Epi mostró una sensibilidad para el *C. difficile* toxinógeno del 98,78 % y una especificidad del 90,86 %. El ensayo Xpert *C. difficile*/Epi también mostró una concordancia positiva del 100 % y una concordancia negativa del 97,70 % para 027 (Tabla 7).

Tabla 7. Rendimiento del ensayo Xpert C. difficile/Epi frente al cultivo directo y PCR-ribotipificación

Cultivo directo y PCR-ribotipificación					
		Toxina B+ 027+	Toxina B+ 027-	NEG	Total ^a
Xpert C.diff/ Epi ^b	Toxina B+ 027/NAP1/BI+	74	4	47	125
	Toxina B+ 027/NAP1/BI-	0	164	140	304
	NEG	0	3	1860	1863
	Total	74	171	2047	2292
C. difficile toxinógeno			C. difficile toxinógeno / 027/NAP1/BI		
Sensibilidad:	98,78 % (242/245)		Concordancia pos:	100 % (74/74)	
Especificidad:	90,86 % (1860/2047)		Concordancia neg:	97,70 % (2167/2218)	
Precisión:	91,71 % (2102/2292)		Precisión:	97,77 % (2241/2292)	
VPP ^c :	56,41 % (242/429)		VPP:	59,20 % (74/125)	
VPN ^d :	99,84 % (1860/1863)		VPN:	100 % (2218/2218)	

- a. No fue posible tipificar un aislado debido a contaminación; esta muestra no se incluye en las estadísticas de rendimiento.
b. Los resultados del Xpert mostrados corresponden al primer o el segundo intento. Aproximadamente un 3,2 % de las muestras fueron indeterminadas en el primer intento.
c. Valor predictivo positivo
d. Valor predictivo negativo

20.4 Rendimiento frente al cultivo de referencia

El cultivo de referencia (enriquecido) es un método más sensible para la detección de *C. difficile* en pacientes sintomáticos; por ejemplo, mejora la detección de un bajo número de microorganismos en las muestras debido a un tratamiento anterior con antibióticos y la posible pérdida de viabilidad debida al transporte de las muestras.

En comparación con el cultivo de referencia con tipificación de cepas por REA, el ensayo Xpert *C. difficile*/Epi mostró una sensibilidad para el *C. difficile* toxinógeno del 93,35 % y una especificidad del 94,02 %. El ensayo Xpert *C. difficile*/Epi también demostró una concordancia positiva del 96,51 % y una concordancia negativa del 98,31 % para BI (Tabla 8).

Tabla 8. Rendimiento del ensayo Xpert *C. difficile*/Epi frente al cultivo de referencia y REA

Cultivo de referencia y REA					
		Toxina B+ BI +	Toxina B+ BI -	NEG	Total ^a
Xpert <i>C. diff</i> /Epi ^b	Toxina B+ 027/NAP1/BI+	83	6	31	120
	Toxina B+ 027/NAP1/BI-	2	204	86	292
	NEG	1	20	1841	1862
	Total	86	230	1958	2274
<i>C. difficile</i> toxinógeno			<i>C. difficile</i> toxinógeno / 027/NAP1/BI		
Sensibilidad:	93,35 % (295/316)		Concordancia pos:	96,51 % (83/86)	
Especificidad:	94,02 % (1841/1958)		Concordancia neg:	98,31 % (2151/2188)	
Precisión:	93,93 % (2136/2274)		Precisión:	98,24 % (2234/2274)	
VPP ^c :	71,60 % (295/412)		VPP:	69,17 % (83/120)	
VPN ^d :	98,87 % (1841/1862)		VPN:	99,86 % (2151/2154)	

- 19 muestras fueron positivas en el cultivo, pero no se tipificaron las cepas por las siguientes razones: digestión parcial con endonucleasas de restricción o no se envió el aislado. Estas 19 muestras no se incluyen en la eficacia diagnóstica anterior.
- Los resultados del Xpert mostrados corresponden al primer o el segundo intento. Aproximadamente un 3,2 % de las muestras fueron indeterminadas en el primer intento.
- Valor predictivo positivo
- Valor predictivo negativo

En comparación con el cultivo de referencia con tipificación de cepas por PFGE, el ensayo Xpert *C. difficile*/Epi mostró una sensibilidad para el *C. difficile* toxinógeno del 93,60 % y una especificidad del 94,02 %. El ensayo Xpert *C. difficile*/Epi también mostró una concordancia positiva del 97,73 % y una concordancia negativa del 98,27 % para NAP1 (Tabla 9).

Tabla 9. Rendimiento del ensayo Xpert C. difficile/Epi frente al cultivo de referencia y PFGE

Cultivo de referencia y PFGE					
		Toxina B+ NAP1 +	Toxina B+ NAP1 -	NEG	Total ^a
Xpert <i>C. diff</i> /Epi ^b	Toxina B+ 027/NAP1/BI+	86	7	31	124
	Toxina B+ 027/NAP1/BI-	1	213	86	300
	NEG	1	20	1841	1862
	Total	88	240	1958	2286
		C. difficile toxinógeno		C. difficile toxinógeno / 027/NAP1/BI	
		Sensibilidad:	93,60 % (307/328)	Concordancia pos:	97,73 % (86/88)
		Especificidad:	94,02 % (1841/1958)	Concordancia neg:	98,27 % (2160/2198)
		Precisión:	93,96 % (2148/2286)	Precisión:	98,25 % (2246/2286)
		VPP ^c :	72,41 % (307/424)	VPP:	69,35 % (86/124)
		VPN ^d :	98,87 % (1841/1862)	VPN:	99,91 % (2160/2162)

- a. 7 muestras fueron positivas en el cultivo, pero no se tipificaron las cepas por las siguientes razones: digestión parcial con endonucleasas de restricción crecimiento nulo o contaminación. Estas 7 muestras no se incluyen en la eficacia diagnóstica anterior.
- b. Los resultados del Xpert mostrados corresponden al primer o el segundo intento. Aproximadamente un 3,2 % de las muestras fueron indeterminadas en el primer intento.
- c. Valor predictivo positivo
- d. Valor predictivo negativo

En comparación con el cultivo de referencia con PCR-ribotipificación, el ensayo Xpert *C. difficile*/Epi mostró una sensibilidad para el *C. difficile* toxinógeno del 93,39 % y una especificidad del 94,02 %. El ensayo Xpert *C. difficile*/Epi también mostró una concordancia positiva del 98,89 % y una concordancia negativa del 98,36 % para 027 (Tabla 10).

Tabla 10. Rendimiento del ensayo Xpert C. difficile/Epi frente al cultivo de referencia y PCR-ribotipificación

Cultivo de referencia y PCR-ribotipificación					
		Toxina B+ 027 +	Toxina B+ 027 -	NEG	Total ^a
Xpert C. diff/Epi^b	Toxina B+ 027/NAP1/BI+	89	5	31	125
	Toxina B+ 027/NAP1/BI-	0	217	86	303
	NEG	1	21	1841	1863
	Total	90	243	1958	2291
		C. difficile toxinógeno		C. difficile toxinógeno / 027/NAP1/BI	
Sensibilidad:		93,39 % (311/333)		Concordancia pos: 98,89 % (89/90)	
Especificidad:		94,02 % (1841/1958)		Concordancia neg: 98,36 % (2165/2201)	
Precisión:		93,93 % (2152/2291)		Precisión: 98,38 % (2254/2291)	
VPP ^c :		72,66 % (311/428)		VPP: 71,20 % (89/125)	
VPN ^d :		98,82 % (1841/1863)		VPN: 99,95 % (2165/2166)	

- 2 muestras fueron positivas en el cultivo pero no fue posible tipificar las cepas debido a contaminación y no se incluyen en la eficacia diagnóstica anterior.
- Los resultados del Xpert mostrados corresponden al primero o el segundo intento. Aproximadamente un 3,2 % de las muestras fueron indeterminadas en el primer intento.
- Valor predictivo positivo
- Valor predictivo negativo

21 Uso de antibióticos

De los 2293 casos incluidos en el conjunto de datos principal, se informó del uso de antibióticos en los 2 meses anteriores a la recogida de las muestras en 1630 y se confirmó la no utilización de antibióticos en 570; en 93 casos, no se pudo determinar el estado respecto al uso de antibióticos. El uso de antibióticos no produjo diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento del ensayo.

22 Especificidad analítica

Cincuenta y cinco (55) cepas se obtuvieron, cuantificaron y analizaron con el ensayo Xpert *C. difficile*/Epi. Las cepas procedían de la American Type Culture Collection (ATCC), la Colección de Cultivos de la Universidad de Göteborg (CCUG), la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ), los Centros para el Control y la Prevención de las Enfermedades (CDC), el Instituto de Salud Pública, Maribor, Eslovenia y el Instituto Sueco para el Control de Enfermedades Infecciosas (SMI).

Las especies evaluadas incluyeron diez (10) cepas de *C. difficile* no toxinógeno y once (11) especies de Clostridium distinto de *C. difficile*. Los microorganismos analizados se identificaron como grampositivos (37) o gramnegativos (18). Los organismos se clasificaron además como aerobios (24), anaerobios (29) o microaerobios (2).

Cada cepa se analizó por triplicado a concentraciones que abarcaban desde $1,1 \times 10^8$ hasta $2,2 \times 10^{10}$ UFC/hisopo. Se incluyeron controles positivos y negativos en el estudio. En las condiciones del estudio, todos los aislados se notificaron como **Toxigenic C.diff NEGATIVO; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVO (Toxigenic C. diff NEGATIVE; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEGATIVE)**. La especificidad analítica fue del 100 %.

23 Sensibilidad analítica

Se realizaron estudios con el fin de determinar los intervalos de confianza del 95 % para el límite de detección (LD) analítico de *C. difficile* diluido en una matriz fecal de origen humano que puede ser detectada por el ensayo Xpert *C. difficile/Epi*. La matriz fecal consistía de heces líquidas humanas (*C. difficile* negativas por el ensayo Xpert *C. difficile/Epi*) diluidas en PBS con glicerol al 15 %. El LD se define como el número mínimo de unidades formadoras de colonias (UFC) por hisopo que pueden distinguirse de forma reproducible de muestras negativas con una confianza del 95 %.

Se evaluaron réplicas de 20 a cada concentración de *C. difficile* analizada (UFC/hisopo) de 7 cepas de *C. difficile* diferentes que representaban los toxinotipos 0 (dos cepas), III (dos cepas), IV, V y VIII (uno de cada cepa).

La estimación y los intervalos de confianza se determinaron mediante regresión logística con datos (número de resultados positivos por número de réplicas de cada nivel) en todo el rango de UFC analizadas. Los intervalos de confianza se determinaron utilizando estimaciones de máxima verosimilitud de los parámetros del modelo logístico, utilizando la matriz de varianzas y covarianzas de muestras de gran tamaño. Las estimaciones puntuales del LD y los intervalos de confianza superior e inferior del 95 % para cada toxinotipo de *C. difficile* analizado se resumen en la tabla 11.

Tabla 11. Intervalos de confianza del 95 % para el LD analítico – *C. difficile*

ID de la cepa	Toxinotipo	LD _{95 %} (UFC/hisopo)	IC del 95 % inferior	IC del 95 % superior
VPI 10463 (CCUG19126)	0	255	190	632
90556-M6S (ATCC9689)	0	460	419	587
LUMC-1 (027/NAP1/BI) ^a	III	23	19	31
LUMC-5 (027/NAP1/BI) ^a	III	75	45	176
LUMC-7	V	45	34	104
LUMC-6	VIII	60	50	74
9101	XII	41	34	49

^aPor PCR-ribotipificación/electroforesis en gel de campo pulsado/análisis con endonucleasas de restricción

Los resultados de este estudio indican que el ensayo Xpert *C. difficile/Epi* producirá un resultado positivo para *C. difficile* el 95 % de las veces con una muestra fecal que contenga 460 UFC/hisopo y un resultado 027/NAP1/BI positivo presuntivo el 95 % de las veces para un hisopo que contenga 75 UFC.

Además de la determinación del LD, se analizaron 18 cepas de *C. difficile* que representaban toxinotipos 0 más 12 variantes de toxinotipos (incluidos 4 aislados de 027/NAP1/BI toxinotipo III) con el ensayo Xpert *C. difficile/Epi*. Se seleccionaron cepas de *C. difficile* que representaban, en líneas generales, la mayoría de los toxinotipos de *C. difficile* que se encuentran en la práctica. Los cultivos madre se prepararon mediante la suspensión del crecimiento bacteriano de placas de agar en tampón PBS con un 15 % de glicerol. La concentración de cada cultivo madre se ajustó a 1,4-5,9 unidades McFarland. Todas las cepas se diluyeron serialmente hasta aproximadamente 900 UFC/hisopo y se analizaron por triplicado.

En las condiciones de este estudio, el ensayo Xpert *C. difficile/Epi* identificó correctamente las 18 cepas analizadas como **Toxigenic C.diff POSITIVO (Toxigenic C. diff POSITIVE)**. El grupo incluía 8 toxinotipos que también habían sido notificados como positivos para la producción de toxina binaria (CDT). Todos fueron CDT positivos con el ensayo Xpert *C. difficile*. Los cuatro aislados de 027/NAP1/BI que representaban el toxinotipo III fueron identificados correctamente como **Toxigenic C.diff POSITIVO; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE POSITIVO (Toxigenic C. diff POSITIVE; 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE POSITIVE)**.

24 Sustancias interferentes

Se analizaron veintinueve (21) sustancias biológicas y químicas usadas ocasionalmente o encontradas en muestras de heces con el ensayo Xpert *C. difficile/Epi* para determinar posibles interferencias. Las sustancias potencialmente interferentes incluyeron, entre otras: crema Vagisil y pasta de óxido de zinc (consulte el Apartado 18, Limitaciones). Las 19 sustancias indicadas en la Tabla 12 no mostraron interferencias detectables con el ensayo Xpert *C. difficile/Epi*.

Tabla 12. Sustancias analizadas que no interfirieron con el ensayo

Sustancia	Sustancia
Recogida de sangre completa Hospital Universitario Karolinska	K-Y Jelly/Gelée® McNeil-PPC
Mucina (porcino) Sigma	Vaselina Unilever
Kaopectate® Chattem	Dulcolax® Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals
Imodium® McNeil-PPC	Toallitas portátiles Preparation H Wyeth Consumer Healthcare
Pepto-Bismol® Procter & Gamble	Película vaginal anticonceptiva (VCF) Apotheus Pharmaceutical
Preparation H® Wyeth Consumer Healthcare	Vancomycin Fluka
Fleet® CB Fleet Company	Metronidazol Actavis
Grasas fecales Hospital Universitario Karolinska	Anusol® Plus TM Warner-Lambert Company
Monistat® McNeil-PPC	E-Z-HDTM sulfato de bario de alta densidad para suspensión E-Z-EM Canada
Crema de hidrocortisona Longs Drugs	

25 Reproducibilidad

Se analizó un grupo de 7 muestras con concentraciones variables de *C. difficile* toxinógeno y *C. difficile*, 027/NAP1/BI en 10 días diferentes por dos usuarios distintos en cada uno de los tres centros (7 muestras x 2 usuarios/día x 10 días x 3 centros). Se utilizó un lote del ensayo Xpert *C. difficile*/Epi en cada uno de los 3 centros de análisis. Los ensayos Xpert *C. difficile*/Epi se realizaron de acuerdo con el procedimiento del ensayo Xpert *C. difficile*/Epi. Los resultados se resumen en la Tabla 13 y la Tabla 14.

Tabla 13. Resumen de los resultados de reproducibilidad (todos)

ID de la muestra	% de concordancia ^a			% de concordancia total por muestra
	Centro 1	Centro 2	Centro 3	
Negativo	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
<i>C. difficile</i> toxinógeno negativo alto	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
<i>C. difficile</i> toxinógeno positivo bajo	100 % (20/20)	85 % (17/20)	85 % (17/20)	90,0 % (54/60)
<i>C. difficile</i> toxinógeno positivo moderado	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
027/NAP1/BI negativo alto	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
027/NAP1/BI positivo bajo	100 % (20/20)	95 % (19/20)	95 % (19/20)	96,7 % (58/60)
027/NAP1/BI positivo moderado	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
% de concordancia total por centro	100 % (140/140)	97,1 % (136/140)	97,1 % (136/140)	98,1 % (412/420)

- a. Para muestras negativas y negativas altas, el % de concordancia = (n.º de resultados negativos/total de muestras procesadas); para muestras positivas bajas y moderadas, el % de concordancia = (n.º de resultados positivos/total de muestras procesadas).

Tabla 14. Resumen de los resultados del valor Ct por nivel de muestra y sonda

SPC			
Nivel	Prom	DE	CV
<i>C. diff</i> toxinógeno neg alto	32,17	0,59	1,83 %
<i>C. diff</i> toxinógeno pos bajo	32,14	0,53	1,66 %
<i>C. diff</i> toxinógeno pos mod	31,98	0,47	1,47 %
027/NAP1/BI neg alto	32,11	0,65	2,03 %
027/NAP1/BI pos bajo	31,93	0,72	2,26 %
027/NAP1/BI pos mod	31,96	0,61	1,90 %
Neg	32,26	0,72	2,22 %
tcdB (toxina B)			
Nivel	Prom	DE	CV
<i>C. diff</i> toxinógeno neg alto	39,59	0,70	1,77 %
<i>C. diff</i> toxinógeno pos bajo	35,88	0,81	2,24 %
<i>C. diff</i> toxinógeno pos mod	32,17	0,45	1,39 %
027/NAP1/BI neg alto	39,11	0,98	2,50 %
027/NAP1/BI pos bajo	35,49	0,58	1,65 %
027/NAP1/BI pos mod	32,10	0,63	1,97 %

Se analizó un grupo adicional de 6 muestras, tres negativas y tres negativas altas de *C. difficile* toxinógeno, en 5 días diferentes por dos usuarios distintos en cada uno de los tres centros (6 muestras x 2 usuarios/día x 5 días x 3 centros). Las muestras negativas altas se prepararon a una concentración por debajo del LD tal que se esperaba que dieran un resultado negativo el 20 % al 80 % de las veces. Se utilizó un lote del ensayo Xpert *C. difficile*/Epi en cada uno de los 3 centros de análisis. Los ensayos Xpert *C. difficile*/Epi se realizaron de acuerdo con el procedimiento del ensayo Xpert *C. difficile*/Epi. Los resultados se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15. Resumen de los resultados de muestras de reproducibilidad adicionales

ID de la muestra	% de concordancia ^a			% de concordancia total por muestra
	Centro 1	Centro 2	Centro 3	
Negativo	100 % (30/30)	100 % (30/30)	100 % (30/30)	100 % (90/90)
<i>C. difficile</i> toxinógeno negativo alto ^b	60,0 % (18/30) ^b	60,0 % (18/30) ^b	53,3 % (16/30) ^b	57,8 % (52/90) ^b

a. (n.º de resultados negativos/total de muestras negativas altas procesadas)

b. 20-80 % de concordancia esperado para muestras negativas altas

26 Bibliografia

1. Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet* 1978;1:1063-1066.
2. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002; 31:334-339
3. Borriello SP. The influence of the normal flora on *Clostridium difficile* colonization of the gut. *Ann Med* 1990;22:61-67.
4. Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect.* 1998; 40:1-15.
5. Kelly CP, Pothoulakis C, Lamont JT. *Clostridium difficile* colitis. *N Engl J Med* 1994; 330:257-262.
6. Braun V, Hundsberger T, Leukel P, et al. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. 1996; *Gene.* 181:29-38.
7. Hammond GA, Johnson JL. The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. *Microb Pathog.* 1995;19:203-213.
8. Sambol SP, Merrigan MM, Lyerly D, et al. Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease. *Infect. Immun.* 2000;68:5480-5487.
9. Gonçalves C, Decré D, Barbut F, et al. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1933-1939
10. Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, et al. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;186:307-312.
11. Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P. Action-specific ADP-ribotransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun.* 1988;56:2299-2306.
12. Kuijper EJ, Coignard B, Tull P. ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*; EU Member States; European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12 Suppl 6:2-18.
13. Curry SR, Marsh JW, Muto CA, et al. *tcdC* genotypes associated with severe *TcdC* truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 2007 Jan;45:215-221. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 2007 Jun;45(6):2103.
14. Weiss K, Boisvert A, Chagnon M, et al. Multipronged Intervention Strategy to Control an Outbreak of *Clostridium difficile* Infection (CDI) and Its Impact on the Rates of CDI from 2002 to 2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30(2):156-162.
15. MacCannell DR, Louie TJ, Gregson DB, et al. Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2147-2152.
16. Wilkins TD, Lyerly DM. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. *Clin Microbiol.* 2003 Feb;41:531-534.
17. Delmee M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7:411-416.
18. Poutanen SM, Simor AE. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ.* 2004;171:51-58.
19. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
21. Cohen SH, Gerding D, Johnson S, et al. SHEA-IDSA Guideline: Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:431-455.
22. Killgore G, Thompson A, Johnson S, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol* 2008;46:431-437.
23. REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on the classification labeling and packaging of substances and mixtures amending and repealing, List of Precautionary Statements, Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC (amending Regulation (EC) No 1907/2007).
24. Occupational Safety and Health Standards, Hazard Communication, Toxic and Hazard Substances (March 26, 2012) (29 C.F.R., pt. 1910, subpt. Z).

27 Oficinas centrales de Cepheid

Oficinas centrales corporativas

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
EE. UU. (EE. UU.)
Teléfono: + 1 408 541 4191
Fax: + 1 408 541 4192
www.cepheid.com

Oficinas centrales europeas

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francia (Francia)
Teléfono: + 33 563 825 300
Fax: + 33 563 825 301
www.cepheidinternational.com

28 Asistencia técnica

Antes de ponerse en contacto con el servicio técnico de Cepheid, reúna la información siguiente:

- Nombre del producto
- Número de lote
- Número de serie del instrumento
- Mensajes de error (si los hubiera)
- Versión de software y, si corresponde, «Service Tag» (número de servicio técnico) del ordenador.

Información de contacto

EE. UU.

Teléfono: + 1 888 838 3222

Correo electrónico: techsupport@cepheid.com

Francia
















Teléfono: + 33 563 825 319

Correo electrónico: support@cepheideurope.com

La información de contacto de todas las oficinas del servicio técnico de Cepheid está disponible en nuestro sitio web:

www.cepheid.com/en/CustomerSupport

29 Tabla de símbolos

Símbolo	Significado
	Número de catálogo
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	No volver a utilizar
	Código de lote
	Consultar las instrucciones de uso
	Precaución
	Fabricante
	País de fabricación
	Contiene una cantidad suficiente para <n> pruebas
	Control
	Fecha de caducidad
	Para uso exclusivo con receta
	Límites de temperatura
	Riesgos biológicos
	Atención



Cepheid
 904 Caribbean Drive
 Sunnyvale, CA 94089
 EE. UU.

