



BD GeneOhm™ Cdiff Assay



REF 441400
REF 441401

48 Tests
200 Tests

TABLE OF CONTENTS

ENGLISH	4-15
INTENDED USE	4
SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	4
PRINCIPLE OF THE PROCEDURE	4
REAGENTS	5
PRECAUTIONS	6
MATERIALS PROVIDED	6
STORAGE, HANDLING AND STABILITY	7
COLLECTED SPECIMENS.....	7
REAGENTS.....	7
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	7
INSTRUCTIONS FOR USE	8
SPECIMEN COLLECTION	8
SPECIMEN PREPARATION	8
BD GENE ^{OHM} ™ CDIFF ASSAY PROCEDURE	9
QUALITY CONTROL	10
POSITIVE AND NEGATIVE CONTROLS	10
SPECIMEN PROCESSING CONTROLS.....	10
CULTURING OF CLINICAL SPECIMENS	10
INTERPRETATION OF RESULTS	10
INVALID ASSAY RUN	11
UNRESOLVED SPECIMEN	11
SPECIMEN NOT DETERMINED DUE TO I-CORE® MODULE FAILURE	11
LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	11
INTERFERING SUBSTANCES	12
PERFORMANCE CHARACTERISTICS	12
ANALYTICAL SENSITIVITY	14
ANALYTICAL SPECIFICITY.....	14
REPRODUCIBILITY.....	14
PRECISION.....	145
FRANÇAIS	16-27
APPLICATION	16
RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST	16
PRINCIPE DE LA PROCÉDURE	16
RÉACTIFS	17
PRÉCAUTIONS	17
MATÉRIEL FOURNI	18

CONSERVATION, MANIPULATION ET STABILITÉ.....	18
ÉCHANTILLONS PRÉLEVÉS.....	18
RÉACTIFS.....	18
MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI	19
MODE D'EMPLOI.....	19
PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS	19
PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	20
PROCÉDURE DU TEST BD GENEOHM™ CDIFF	20
CONTRÔLE DE LA QUALITÉ.....	22
CONTRÔLES POSITIF ET NÉGATIF.....	21
CONTRÔLES DU TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS.....	21
CULTURE DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES	22
INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	22
SÉRIE INVALIDE	22
ÉCHANTILLON NON RÉSOLU	22
ÉCHANTILLON NON DÉTERMINÉ À CAUSE D'UNE DÉFAILLANCE DU MODULE I-CORE®	22
LIMITES DU TEST.....	22
SUBSTANCES INTERFÉRENTES	23
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE.....	24
SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE.....	26
SENSIBILITÉ ANALYTIQUE	26
REPRODUCTIBILITÉ.....	26
PRÉCISION.....	27
REFERENCES/RÉFÉRENCES	28
INDEX OF SYMBOLS/INDEX DES SYMBOLES.....	29

English

Intended Use

The BD GeneOhm™ Cdiff Assay is a rapid *in vitro* diagnostic test for the direct, qualitative detection of *C. difficile* toxin B gene (*tcdB*) in human liquid or soft stool specimens from patients suspected of having *Clostridium difficile*-associated disease (CDAD). The test, based on real-time PCR, is intended for use as an aid in diagnosis of CDAD. The test is performed directly on the specimen, utilizing polymerase chain reaction (PCR) for the amplification of specific targets and fluorogenic target-specific hybridization probes for the detection of the amplified DNA.

Summary and Explanation of the Test

A liquid or soft stool specimen is collected and transported to the laboratory. A sterile dry swab is dipped into the liquid or soft stool material and processed. For testing, the swab is eluted in sample buffer and the specimen is lysed. An aliquot of the lysate is added to PCR reagents which contain the *tcdB* specific primers used to amplify the genetic target of *Clostridium difficile*, if present. The assay also includes an internal control (IC) to detect PCR inhibited specimens and to confirm the integrity of assay reagents. Amplified targets are detected with hybridization probes labelled with quenched fluorophores (molecular beacons). The amplification, detection and interpretation of the signals are done automatically by the Cepheid SmartCycler® software. The entire procedure takes about 75 to 90 minutes, depending on the number of specimens processed.

C. difficile is the etiologic agent of several diseases. Epidemiology studies demonstrate that an increased number of *C. difficile* associated outbreaks have been reported worldwide¹, some with increased mortality and morbidity². Disease symptoms range from mild nuisance diarrhea to severe colitis and even to bowel perforation and death by dehydration. This pathogen is the major cause of antibiotic-associated diarrhea (AAD) and pseudomembranous colitis³. The predisposing risk factors are numerous and include age, length and number of hospital stays, invasive medical procedures, immunosuppressive treatments, and chronic pathologies (diabetes, cardiovascular syndromes or AIDS)⁴. These factors explain why some wards (intensive care, surgery, long-term care) in hospitals or institutions are more affected than others. The bacterium *C. difficile*, as well as other intestinal flora bacteria, are killed by antimicrobial treatment but not the *C. difficile* spores, which are insensitive to the majority of antimicrobial agents. When antimicrobial concentration is lower than the minimum inhibitory concentration, spores germinate into viable bacteria which produce toxins⁵.

The diagnosis of toxigenic *C. difficile* is usually done by tissue culture cytotoxicity assay and/or by *C. difficile* culture identification and/or by enzyme immunoassay (EIA). The tissue culture cytotoxicity assay and *C. difficile* culture identification are labor and time consuming and results are obtained within 24 to 96 hours. Toxin EIA assays display low sensitivity and glutamate dehydrogenase antigen enzyme immunoassays (GDH EIA) display low specificity. Development of sensitive and specific molecular amplification techniques now allows the detection of only a few copies of bacterial DNA in clinical samples, and the discrimination of specific species⁶. In addition, rapid PCR technology can achieve this in about 1 hour. The combination of these characteristics may allow the prompt targeted treatment of CDAD patients and thus a potential improved patient outcome and reduced recovery time.

Principle of the Procedure

Following specimen lysis, amplification of the *tcdB* target, if present, occurs. Amplification of the internal control (IC), a DNA fragment of 333 base pairs (bp) including a 277 bp sequence not found in *C. difficile*, will also take place unless there are PCR inhibitory substances.

The amplified DNA target is detected with a molecular beacon, a hairpin-forming single-stranded oligonucleotide labelled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the absence of target, the fluorescence is quenched. In the presence of target, the hairpin structure opens upon beacon/target hybridization, resulting in emission of fluorescence. For the detection of *tcdB* amplicons, the molecular beacon contains the fluorophore FAM at the 5' end and the non-fluorescent quencher DABCYL at the opposite 3' end of the oligonucleotide. For the detection of the IC amplicons, the molecular beacon contains the fluorophore TET at the 5' end and the quencher moiety DABCYL at the 3' end. Each beacon-target hybrid fluoresces at a wavelength characteristic of the fluorophore used in the particular molecular beacon. The amount of fluorescence at any given cycle, or following cycling, depends on the amount of specific amplicons present at that time. The SmartCycler® software simultaneously monitors the fluorescence emitted by each molecular beacon, interprets all data, and provides a final result at the end of the cycling program (see Section "Interpretation of Results").

Reagents

BD GeneOhm™ Cdiff Assay	48 Tests	200 Tests
<i>Sample Buffer</i>	60 X 1 mL	240 X 1 mL
Tris-EDTA buffer		
<i>Lysis tube</i>	50 tubes	200 tubes
Glass beads		
<i>Master Mix</i>	8 tubes	34 tubes
< 0.0005% DNA polymerase complex		
< 0.001% Internal Control (non-infectious DNA containing <i>tcdB</i> primer binding sequences with a unique sequence for probe hybridization)		
< 0.002% Primers		
< 0.002% Molecular probes		
< 0.05% Nucleotide mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		
Bovine serum albumin		
Carbohydrate		
MgCl ₂		
< 0.001% Non-infectious genomic DNA of <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)		
<i>Control DNA</i>	8 tubes	34 tubes
Tris-EDTA buffer		
Carbohydrate		
< 0.001% Non-infectious genomic DNA of <i>C. difficile</i> bearing <i>tcdB</i> gene (ATCC 43255)		
<i>Diluent</i>	8 X 700 µL	34 X 700 µL
Tris-HCl buffer		
MgCl ₂		
(NH ₄) ₂ SO ₄		
KCl		

Precautions

- This test is for *in vitro* diagnostic use only.
- Do not use the kit if the outer carton safety seal is broken.
- Do not use reagents if their protective pouches are open or torn upon arrival.
- Close protective pouches of Master Mix and Control DNA quickly with the zip seal after each use.
- Do not remove desiccant from Master Mix and Control DNA pouches.
- Do not use reagents if desiccant is not present inside Master Mix and Control DNA pouches.
- Reagents are not interchangeable between lots.
- Never pool reagents from different tubes even if they are from the same lot.
- Do not use the reagents after their expiration date.
- Do not interchange caps among reagents as contamination may occur and compromise test results.
- Avoid microbial and deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents when removing aliquots from tubes. The use of sterile DNase-free disposable filter-blocked or positive displacement pipettor tips is recommended.
- To avoid contamination of the environment with *tcdB* gene amplicons, do not open the reaction tubes post-amplification.
- Use a new pipettor tip for each specimen or reagent.
- Performing the assay outside of the recommended time ranges can produce invalid results. Assays not completed within specified time ranges should be repeated.
- Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organizations.
- In cases where open-tube PCR tests are conducted in the same general area by the laboratory, separated and segregated working areas should be used for specimen preparation and amplification/detection activities. Supplies and equipment should be dedicated to each area and should not be moved from one area to another. Gloves must always be worn and must be changed before going from one area to another. Gloves must be changed before manipulating lyophilized reagents.
- Always handle specimens as if they are infectious and in accordance with safe laboratory procedures such as those described in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁷ and in the CLSI Document M29⁸.
- Wear protective clothing and disposable gloves while handling kit reagents. Wash hands thoroughly after performing the test.
- Do not pipet by mouth.
- Do not smoke, drink, or eat in areas where specimens or kit reagents are being handled.
- Dispose of unused reagents and waste in accordance with local, state and/or federal regulations.
- Users should complete proficiency testing and training prior to performing the BD GeneOhm™ Cdiff Assay according to local, state and/or federal regulations or accrediting organizations.

Materials Provided

- Sample Buffer
- Lysis tube
- Master Mix
- Control DNA
- Diluent
- SmartCycler® reaction tubes, 25 µL
- Specimen identification labels

Storage, Handling and Stability

Collected Specimens

- Specimens should be kept between 2 °C and 25 °C during transport. Protect against freezing or exposure to excessive heat.
- Specimens can be stored up to 5 days at 2-8 °C before testing. Specimens can be kept at room temperature (15-25 °C) up to 48 hours before testing. Specimens can be tested after one freeze and thaw cycle.

Reagents

Note: Storage conditions must follow the specifications written on each pouch.

Kit Component		Master Mix, Diluent and Control DNA (white, black strip and red strip labels, respectively)	Lysis Tubes (yellow cap)	Sample Buffer (blue cap)
Sealed pouch	Temperature	2-8 °C	2-25 °C	2-25 °C
	Stability	Expiration date	Expiration date	Expiration date
Opened pouch ^A	Temperature	2-8 °C	2-25 °C	2-25 °C ^B
	Stability	1 month ^C	Expiration date	2 months ^C

^A Once the original seal on the pouch is broken, carefully close the pouch with the zip seal after each use and store at appropriate temperature.

^B Although these reagents can be stored at room temperature, they should be kept with their accompanying reagents of the same lot between 2-8 °C.

^C Provided the bags are properly closed with the zip seal after each use.

Kit Components outside of their protective pouch		Master Mix and Control DNA (white and red strip labels)	
Tubes containing unreconstituted reagents	Temperature	15-25 °C	
	Stability	2 hours	
Tubes containing reconstituted reagents ^A	Original container	Temperature	2-8 °C
		Stability	3 hours
	SmartCycler [®] tube	Temperature	2-8 °C
		Stability	1 hour

^A Discard unused tubes after expiration of the indicated stability.

Materials Required but not Provided

- Dry sterile swab
- Dry sterile container for the collection of liquid or soft stool specimens
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc.) with 1.5 mL microtube holder or equivalent; for processing multiple samples, adapter with multiple holding sites can be used
- Micropipettors (accurate range between 1-10 µL, 10-100 µL and 100-1000 µL)
- Sterile DNase-free filter-blocked or positive displacement micropipettor tips
- DNase free microcentrifuge tubes
- Scissors (optional)
- Gauze
- Disposable gloves, powderless
- Microcentrifuge for low speed centrifugation
- Dry heating block for 1.5 mL tubes or water bath
- Ice or cooling block for 1.5 mL tubes
- Stopwatch or timer
- SmartCycler[®] starter system with Dx Software (processing block, user manual⁹, accessory kit, and desktop computer) (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)

Instructions for Use

Specimen Collection

In order to obtain an adequate specimen, the procedure for specimen collection must be followed closely.

Liquid stool or soft stool specimen

Using a dry sterile container, liquid stool or soft stool specimens are collected according to the following procedure:

1. **Transfer liquid or soft stool (but not urine) into the container. Avoid mixing toilet paper, water, or soap with the sample.**
2. **Label the container.**
3. **Ship the container to the laboratory according to hospital standard operating procedures.**
4. **Refer to the section entitled Storage, Handling and Stability – Collected Specimens for storage and handling.**

Specimen Preparation

NOTE: One (1) sample buffer tube (**blue cap**) and one (1) lysis tube (**yellow cap**) are required for each specimen to be tested. An additional sample buffer tube (**blue cap**) is also required to dilute specimens. This sample buffer tube will also be used for the BD GeneOhm™ Cdiff Assay procedure. Remove the required number of tubes from their protective pouches, remove the excess air and close the pouches quickly with the zip seal.

1. **Prior to starting specimen preparation for the BD GeneOhm™ Cdiff Assay, vortex the specimen at high speed for 15 seconds and dip a sterile dry swab into the fecal material for testing. Remove excess stool.**
2. **Place the swab in a sample buffer tube (blue cap).**
Identify the sample buffer tube on the cap and/or the tube label.
3. **Break the swab stem and close the sample buffer tube tightly.**
Hold the swab by the stem near the rim of the tube (use gauze to minimize risks of contamination). Lift the swab a few millimeters from the bottom and bend the stem against the edge of the tube to break it. Alternative method: use clean scissors to cut the stem. Make sure the cap will close tightly.
4. **Vortex the sample buffer tube (containing the swab) at high speed for one (1) minute.**
For processing multiple samples, adapters with multiple holding sites can be used.
5. **Add 40 µL from the additional sample buffer tube (blue cap) to the lysis tube (yellow cap) in order to dilute the specimen.**
6. **Transfer 10 µL of cell suspension (from Step 4) to the lysis tube (yellow cap) already containing 40 µL of sample buffer (blue cap) (from Step 5).**
7. **Vortex the lysis tube for five (5) minutes at high speed.**
For processing multiple samples, adapters with multiple holding sites can be used.
8. **Centrifuge the lysis tube briefly (quick spin).**
Centrifuge at low speed for two (2) to five (5) seconds to bring the solid contents at the bottom of the tube.
9. **Heat the lysis tube at 95 ± 2 °C between five (5) and seven (7) minutes.**
Use a dry heating block for 1.5 mL tubes or a water bath.
10. **Place the lysis tube on ice or on a cooling block.**
Lysates are stable up to four (4) hours at 2-8 °C.

BD GeneOhm™ Cdiff Assay Procedure

NOTE: One (1) reconstituted Master Mix tube (**white label**) will yield enough reagents to run **eight (8)** reactions. Allow one SmartCycler® tube per specimen to be tested and two (2) additional SmartCycler® tubes for the **positive and the negative controls**. One (1) **positive** and one (1) **negative** control must be included in each BD GeneOhm™ Cdiff Assay run. One (1) Control DNA (**red strip label**) is required per assay run. One (1) diluent tube (**black strip label**) is required for the reconstitution of up to three (3) Master Mix tubes. Remove the required number of tubes from their protective pouches, **remove the excess air, and close the pouches quickly with the zip seal**.

Prepare only enough SmartCycler® tubes to fill available I-CORE® modules on the SmartCycler® instrument.

- 1. Place the required number of Master Mix tubes on ice or on a cooling block for 1.5 mL tubes.**
- 2. Add 225 µL of diluent (black strip label) to each Master Mix tube.**
Insert the micropipettor tip through the septum of the cap of the Master Mix tube. Do not insert the tip too deeply into the cap. Deliver the diluent. Discard the unused diluent afterward.
- 3. Vortex the tube(s) for 5-10 seconds.**
- 4. Place the tube(s) on ice or on a cooling block for 1.5 mL tubes until ready to use.**
Place a Control DNA tube (red strip label) on ice or on a cooling block for 1.5 mL tubes.
- 5. Add 225 µL of sample buffer (blue cap) to the Control DNA tube.**
Use the additional sample buffer tube (blue cap) from the specimen preparation (Step 4). Insert the micropipettor tip through the septum of the cap of the Control DNA tube. Do not insert the tip too deeply into the cap. Deliver the sample buffer.
- 6. Vortex the tube for 5-10 seconds.**
Place the tube on ice or on a cooling block for 1.5 mL tubes until ready to use.
- 7. Place the required number of SmartCycler® tubes on the SmartCycler® cooling block.**
Allow one (1) SmartCycler® tube per specimen and two (2) more SmartCycler® tubes for the controls. Avoid touching the optical detection windows at the bottom edges of the tube and the lower diamond-shaped area.

THE FOLLOWING STEPS MUST BE PERFORMED WITHIN A ONE (1) HOUR TIME FRAME:

- 8. Add 25 µL of reconstituted Master Mix to the SmartCycler® tubes (appropriate pipetting technique is required to ensure proper transfer of the solution).**
Remove the cap before pipetting the reagent. Deliver the liquid into the reservoir (upper part) of the SmartCycler® tubes. Identify the SmartCycler® tubes on the cap. Specimen identification labels can be used (provided with the kit). Discard the unused Master Mix.
- 9. Add 3.0 µL of each lysed specimen to a different SmartCycler® tube (previously filled with reconstituted Master Mix); close the tubes.**
Be careful not to aspirate beads when pipetting into the lysis tube. After addition of the specimen, pipet up and down 2-3 times in the reservoir to ensure transfer of the complete volume. Use a new micropipettor tip for each specimen.
- 10. Add 3.0 µL of the reconstituted Control DNA to the next to last SmartCycler® tube (Positive Control); close the tube.**
After addition of the DNA, pipet up and down 2-3 times in the reservoir to ensure transfer of the complete volume. Identify as the positive control. Discard the unused control DNA.
- 11. Add 3.0 µL of sample buffer (blue cap) to the last SmartCycler® tube (Negative Control); close the tube.**
Use the sample buffer tube from Step 5. This will monitor PCR contamination that might occur during the manipulation of the specimens. Identify as the negative control. Discard the unused sample buffer.
- 12. Centrifuge all reaction tubes for 5-10 seconds.**
Use the specially adapted microcentrifuge provided with the SmartCycler® instrument.
- 13. Keep the tubes at 2-8 °C on the SmartCycler® cooling block before loading on the instrument.**
The remaining lysates should be frozen at -20 ± 5 °C for later use, if necessary.
- 14. Create a run with the BD GeneOhm™ Cdiff Assay protocol.**
Refer to the SmartCycler® Dx Software Operator Manual⁹ if needed. It is recommended that identification parameters for the specimens be entered before starting the run.
- 15. Insert each reaction tube into an I-CORE® module of the SmartCycler® and close the I-CORE® lid.**
Place the positive and negative controls at their appropriate positions (see the section entitled "Quality control"). Press all the tubes firmly down into place.
- 16. Start the run.**

Quality Control

Positive and Negative Controls

Quality control procedures are designed to monitor assay performance. The positive control is intended to monitor substantial reagent failure. The negative control is used to detect reagent or environmental contamination (or carry-over) by either DNA containing *tcdB* genes or *tcdB* amplicons. Positive and negative controls are assay controls (run controls). An invalid control invalidates the run. Finally, an internal control incorporated into each reaction mixture is intended to monitor the reagent integrity and PCR inhibition in each specimen.

One positive control and one negative control must be included in each assay run on the SmartCycler®. The software automatically assigns the position of the controls on the instrument (refer to the SmartCycler® Dx Software Operator Manual⁹).

Specimen Processing Controls

Additional control strains may be tested according to guidelines or requirements of local, state and/or federal regulations or accreditation organizations. A reference toxigenic *C. difficile* strain bearing the *tcdB* gene (e.g. American Type Culture Collection, ATCC 43255 or a well characterized *C. difficile* clinical isolate identified to be carrying the *tcdB* gene) may be used as a positive specimen processing control while a culture of a non toxigenic *C. difficile* strain (e.g. ATCC 700057) may be used as a negative specimen processing control.

Colonies are isolated after 18 to 24 hours of anaerobic incubation on 5% sheep blood agar. Resuspend colonies in saline to a turbidity of 0.5 McFarland (~1.5 X 10⁷ CFU/mL). Dilute with saline to obtain a suspension of ~10⁶ CFU/mL. Dip a dry swab into the bacterial suspension, press out the excess fluid. Process and test as a clinical specimen (refer to the sections entitled "Specimen Preparation" and "BD GeneOhm™ Cdiff Assay Procedure"), including controls. All specimens and controls should yield valid results (no invalid positive or negative control; no failed internal control; and no incorrect specimen processing control results – when specimen processing controls are performed). In the event of an incorrect specimen processing control result, it is recommended that a new aliquot be obtained from the original stool specimen, and that this specimen be retested along with new controls before reporting results.

For general QC guidance, the user may wish to refer to CLSI MM3¹⁰ and C24¹¹.

Culturing of Clinical Specimens

To perform species identification directly from stools, clinical specimens can be cultured using the hospital procedures.

Interpretation of Results

The decision algorithm for the BD GeneOhm™ Cdiff Assay is embedded in the SmartCycler® DX software. The interpretation of assay results is done according to the following criteria:

Sample Type	Instrument-Reported Assay Result ⁹	Instrument-Reported IC Result ⁹	User Interpretation of Results
Clinical Specimen	NEG	PASS	No <i>tcdB</i> gene DNA detected
	POS	NA	<i>tcdB</i> gene DNA detected
	Unresolved	FAIL	Unresolved – inhibitory specimen or reagent failure
	ND	ND	Not determined due to I-CORE® Module failure (with Warning or Error Codes ⁹)
Positive Control	Valid	NA	Valid Positive Control; valid run when Negative Control is also valid.
	Invalid	NA	Invalid Positive Control; invalid run. ^A Assay results are invalid and must not be reported.
Negative Control	Valid	PASS	Valid Negative Control; valid run when Positive Control is also valid.
	Invalid	FAIL	Invalid Negative Control; invalid run. ^A Assay results are invalid and must not be reported.

IC - Internal Control; NA – not applicable; ND – not determined

^A Invalid assay run or instrument error codes or warnings are flagged on-screen and on reports. Before reporting *C. difficile* results, always verify that the assay run is valid.

Invalid Assay Run

Using frozen lysate(s), prepare new reaction tubes for all clinical specimens within that assay run along with new control tubes.

Unresolved Specimen

Repeat testing with the corresponding frozen specimen lysate. The effect of a freeze-thaw cycle has been shown to reduce the effect of PCR inhibitory substances.

Specimen Not Determined Due to I-CORE® Module Failure

Repeat testing with the corresponding frozen specimen lysate. For the interpretation of warning or error code messages, refer to the SmartCycler® Dx Software Operator Manual⁹.

Limitations of the procedure

- The performance characteristics of this assay have not been established with automated real-time PCR instruments other than the SmartCycler® instrument.
- This test is for use only with liquid or soft stools; performance characteristics of other clinical specimen types have not been established.
- Negative test results may also occur from improper specimen collection, handling or storage, presence of inhibitors, technical error, sample mix-up or because the number of organisms in the specimen is below the analytical sensitivity of the test. Careful compliance to the instructions given in this insert and in the SmartCycler® Dx Software Operator Manual⁹ is necessary to avoid erroneous results. Use of this test should be limited to personnel trained on the procedure and on the use of the SmartCycler®.
- The BD GeneOhm™ Cdiff Assay may generate unresolved or invalid results due to an invalid control; therefore, retesting of the lysate kept between -20 ± 5 °C is required and will lead to a delay in obtaining results.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. It does however indicate the presence of the *tcdB* gene and allows for presumptive detection of the *C. difficile* toxigenic organism. The BD GeneOhm™ Cdiff Assay cannot be used for species identification as it does not contain primers and probes specific to *C. difficile*.
- Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of *C. difficile tcdB* gene variants, resulting in a false negative result with the BD GeneOhm™ Cdiff Assay.
- Although there is no need for reagent preparation and the main technical operation is pipetting, good laboratory techniques are essential for the proper performance of this assay. Due to the high analytical sensitivity of this test, extreme care should be taken to preserve the purity of all reagents, especially in cases where multiple aliquots are taken from a tube.
- Variant toxigenic *C. difficile* without the *tcdB* gene or with a non-functional Toxin B protein are very rare¹²⁻¹⁵. The BD GeneOhm™ Cdiff Assay targets the *tcdB* gene and it is unknown whether it would detect Toxin A+/ Toxin B- variant strains.
- The BD GeneOhm™ Cdiff Assay has not been evaluated with the following viruses which may be present in stool specimens: the RNA viruses Enterovirus, Astrovirus, Norovirus, Rotavirus and Hepatitis A virus; the DNA virus Adenovirus. However, sequence homology between the BD GeneOhm Cdiff Assay primers and target probe relative to these viruses is very low.
- BD GeneOhm™ Cdiff Assay primers and target probe were designed to discriminate the *C. difficile* toxin B gene from the *C. sordellii* lethal toxin gene. However, cross reactivity may occur due to the high sequence homology between *C. difficile* Toxin B and *C. sordellii* lethal toxin. Due to the rare occurrence and limited availability of *C. sordellii*, only one strain was available for cross reactivity testing with the assay. No cross reactivity was observed.

Interfering Substances

Twenty-six (26) biological and chemical substances occasionally used or found in perianal, rectal and/or stool specimens were evaluated for interference with the BD GeneOhm™ Cdiff Assay. Potentially interfering substances include, but are not limited to, blood and mucus. The presence of excessive blood may inhibit PCR and may give unresolved results. The remaining twenty-four (24) substances illustrated in the table below showed no detectable interference with the BD GeneOhm™ Cdiff Assay.

Endogenous and Commercial Exogenous Substances Tested with the BD GeneOhm™ Cdiff Assay

Substance	Result	Substance	Result
Anusol ^{MC} Plus *	NI**	Monistat™ Derm Miconazole nitrate cream USP 2% (McNeil)	NI
Atlas Ihle's Paste * Zinc oxide 25 % w/w paste (Laboratoire Atlas Inc.)	NI	Palmitic acid * Fresh solution from powder (LabMat)	NI
Barium sulfate Fresh solution from powder form (LabMat)	NI	Preparation H [®] with Bio-Dyne [®] * Cream (Wyeth)	NI
Exact™ Hydrocortisone acetate * Cream USP 0.5 % (Taro Pharmaceuticals Inc.)	NI	Preparation H [®] with Bio-Dyne [®] * Ointment (Wyeth)	NI
Exact™ stomach relief Bismuth subsalicylate liquid (Perrigo [®])	NI	Rougier Neo-Laryngobis *Suppositories (Rougier Pharma)	NI
Fecal fat	NI	SAB-Dimenhydrinate [®] * Suppositories (SABEX [®])	NI
Fresh control [®] Moist towelettes pH 5,5 (Blue Skin)	NI	Steric acid * Fresh solution from powder (LabMat)	NI
Gyne Moistrin [®] Vaginal moisturizing gel (Schering)	NI	Trojan [®] latex condoms (with nonoxynol-9) Spermicidal lubricant (Church & Dwight Co., Inc.)	NI
Imodium AD [®] * Loperamide hydrochloride oral solution (McNeil)	NI	Tucks ^{MC} personal cleansing pads Moist, soft cloth pads (Pfizer)	NI
Kaopectate [®] Oral attapulgite suspension (Pharmacia & Upjohn)	NI	Vagisil [®] Anti-itch cream (Combe Incorporated)	NI
K-Y [®] Jelly (Johnson & Johnson Inc.)	NI	Vancomycin Liquid (MP Biomedicals, LLC)	NI
Metronidazole Fresh solution from powder form (Acros Organics)	NI	Vaseline™ * White petroleum jelly U.S.P. (Lever Pond's)	NI

* Substance tested with two strains of *C. difficile* (Tox 0 and Tox VIII)

** NI: No detectable interference with the BD GeneOhm™ Cdiff Assay

Performance Characteristics

Performance characteristics of the BD GeneOhm™ Cdiff Assay were determined in a multi-site prospective investigational study. Four (4) medical centers, two (2) in Canada and two (2) in the United States, participated in the study. To be enrolled in the study, specimens had to be from individuals for whom *Clostridium difficile* testing was indicated and/or ordered, according to institutional policies. The Reference Cytotoxicity Assay was performed using a tissue culture Cytotoxicity assay on liquid or soft stool specimens within 48 hours of collection. The procedure was performed according to the Manufacturer's Instructions for Use.

A total of 1108 specimens were tested with both the Reference Assay described above and the BD GeneOhm™ Cdiff Assay, producing 1090 reportable results. The first dataset includes 835 fresh specimens tested at three (3) of the four (4) clinical sites (Table 1). In comparison to the Reference Assay, the BD GeneOhm™ Cdiff Assay identified 93.8% of the *C. difficile* positive specimens and 95.5% of the negative specimens (Table 2). For the population tested this resulted in a Negative Predictive Value (NPV) of 99.1% and a Positive Predictive Value (PPV) of 67.3%. Testing at the fourth clinical site revealed that the Reference Cytotoxicity Assay was not reporting accurate results. Due to the high number of inaccurate reference assay results, samples were retested from aliquots of the original stool specimens which had been frozen after the initial testing. These frozen aliquots were tested with both the Reference Assay and the BD GeneOhm™ Cdiff Assay. The second dataset includes results from 255 frozen stool specimens available for analysis (Table 3). In comparison to the Reference Assay, the BD GeneOhm™ Cdiff Assay identified 100% of the *C. difficile* positive specimens and 97.7% of the negative specimens in the frozen dataset; resulting in a NPV of 99.2% and PPV of 81.5% (Table 4).

Out of 852 fresh specimens tested with the BD GeneOhm™ Cdiff Assay, 39 were initially reported as unresolved (4.6%). Upon repeat testing from the frozen lysates, 22 were resolved and 17 remained unresolved (2.0%) (Table 5). Out of 256 frozen specimens tested with the BD GeneOhm™ Cdiff Assay, only one (1) specimen (0.4%) was initially reported unresolved. The specimen remained unresolved upon repeat testing from the frozen lysate (0.4%) (Table 6). One (1) run was reported invalid due to Run Control failure (0.6%). The run was reported valid upon repeat testing of the specimen lysates (Table 7).

Table 1: Fresh Stool Results Obtained with the BD GeneOhm™ Cdiff Assay in Comparison with the Reference Assay

		Reference Cytotoxicity Assay		
		+	-	
BD GeneOhm™ Cdiff Assay	+	76	34 [†]	110
	-	5 [‡]	720	725
		81	754	835

[†] Cytotoxicity Assay on isolated strains was positive for 21 out of the 34 samples, verifying the presence of toxigenic *C. difficile*. For the remaining 13 samples, standard PCR with alternative primers followed by bi-directional sequencing revealed that 11 out of the 13 samples contained the expected *tcdB* gene.

[‡] For two (2) of the five (5) false negative specimens, *C. difficile* was recovered by culture, and only one (1) of these two (2) was reported as toxigenic. Of the remaining three (3) false negative PCR specimens, no *C. difficile* was recovered by culture.

Table 2: Performance Obtained with Fresh Stools using the BD GeneOhm™ Cdiff Assay in Comparison with the Reference Method

Clinical Sites	Prevalence	Sensitivity with 95% CI*	Specificity with 95% CI*
Site 1	11.0% (40/365)	90.5% (38/42) (77.4% - 97.3%)	95.7% (309/323) (92.8% - 97.6%)
Site 2	6.7% (16/240)	94.4% (17/18) (72.7% - 99.9%)	96.4% (240/249) (93.2% - 98.3%)
Site 3	11.1% (18/162)	100% (21/21) (83.9% - 100%)	94.0% (171/182) (89.4% - 96.9%)
Overall	9.6% (74/767)	93.8% (76/81) (86.2% - 98.0%)	95.5% (720/754) (93.8% - 96.9%)

* CI: Confidence Intervals

Table 3: Frozen Stool Results Obtained with the BD GeneOhm™ Cdiff Assay in Comparison with the Reference Assay

		Reference Cytotoxicity Assay		
		+	-	
BD GeneOhm™ Cdiff Assay	+	34	5	39
	-	0	216	216
		34	221	255

Table 4: Performance Obtained with Frozen Stools using the BD GeneOhm™ Cdiff Assay in Comparison with the Reference Method

Clinical Site	Prevalence	Sensitivity with 95% CI*	Specificity with 95% CI*
Site 4	12.7% (34/267)	100.0% (34/34) (89.7% - 100%)	97.7% (216/221) (94.8% - 99.3%)

* CI: Confidence Intervals

Table 5: Fresh Stool Unresolved Rates

Clinical Sites	Initial unresolved rate with 95% CI*	Unresolved rate after repeat with 95% CI*
Site 1	0.8% (3/367) (0.2% - 2.4%)	0.5% (2/367) (0.1% - 2.0%)
Site 2	6.6% (18/273) (4.0% - 10.2%)	2.2% (6/273) (0.8% - 4.7%)
Site 3	8.5% (18/212) (5.1% - 13.1%)	4.2% (9/212) (2.0% - 7.9%)
Overall	4.6% (39/852) (3.3% - 6.2%)	2.0% (17/852) (1.2% - 3.2%)

* CI: Confidence Intervals

Table 6: Frozen Stool Unresolved Rates

Clinical Site	Initial unresolved rate with 95% CI*	Unresolved rate after repeat with 95% CI*
Site 4	0.4% (1/256) (0.0% - 2.2%)	0.4% (1/256) (0.0% - 2.2%)

* CI: Confidence Intervals

Table 7: Overall Invalid Run Rates

Site	Invalid Run Rates with 95% CI*	
Site 1	2.6% (1/38)	(0.1% - 13.8%)
Site 2	0.0% (0/41)	(0.0% - 8.6%)
Site 3	0.0% (0/58)	(0.0% - 6.2%)
Site 4	0.0% (0/23)	(0.0% - 14.8%)
Overall	0.6% (1/160)	(0.0% - 3.4%)

* CI: Confidence Intervals

Analytical Specificity

Genomic DNA from one non toxigenic *C. difficile* strain, two strains of Toxinotype XI lacking *tcdB* gene¹⁷ and 29 other-*Clostridium* strains (including one strain of *C. sordellii*), along with 99 closely related organisms and other pathogenic and commensal flora found in the intestine and stools (representing 96 species) were tested. All strains were tested at a concentration of approximately 1X10⁸ CFU/mL or 1X10⁸ target copies/mL. None of these species tested positive with the BD GeneOhm™ Cdiff Assay.

Analytical Sensitivity

Quantitated culture and purified genomic DNA diluted in BD GeneOhm™ Cdiff Assay sample buffer were tested in five (5) replicates. The LOD was defined as the lowest concentration, in DNA copy number per reaction and CFU per reaction, at which five replicates out of five were found positive.

The analytical sensitivity (limit of detection or LOD) of the BD GeneOhm™ Cdiff Assay was determined with one strain of Toxinotype 0 *Clostridium difficile* carrying the *tcdB* gene (ATCC 43255).

The BD GeneOhm™ Cdiff Assay LOD is 10 DNA copies per reaction. The LOD in Colony Forming Units (CFU) is established at 4 CFU per reaction.

The analytical sensitivity in CFU per reaction was confirmed with a second Toxinotype 0 (ATCC 9689) and with Toxinotypes IIIa (SE844¹⁶), V (SE881¹⁶), VII (57267¹⁶) and VIII (1470¹⁶) *Clostridium difficile* toxigenic strains.

In addition to strains used for LOD determination, one hundred (100) other toxigenic *C. difficile* strains (including 17 other Toxinotypes), representing 21 countries, from well-characterized clinical isolates or public collections were evaluated using the BD GeneOhm™ Cdiff Assay. *C. difficile* strains were tested at a concentration of approximately 6.7 DNA copies/μL or 1 CFU/μL. The assay correctly identified all 100 *C. difficile* strains carrying the *tcdB* gene.

Reproducibility

The reproducibility panel consisted of three (3) simulated specimen categories where each tube contained 100 μL of simulated bowel flora; the two positive panel members were also inoculated with *C. difficile* (ATCC 43255). Additionally, two (2) Specimen Processing Controls (ATCC 9689 and ATCC 25922) and, two (2) Run Controls (Positive and Negative) were included. The specimens were tested in triplicate per panel run, on five (5) distinct days (consecutive or not), wherein each day two (2) panels were tested, one for each of two (2) technologists, at three (3) clinical sites with one (1) lot of reagents. One (1) of these clinical sites participated in the extended study where two (2) additional lots of reagents were tested.

The overall percent agreement for the low positive *C. difficile* specimen category is 96.7%; the moderate positive *C. difficile* specimen category is 100% and the negative specimen category is 100% for the Site-to-Site Reproducibility (Table 8).

The overall percent agreement for the low positive *C. difficile* specimen category is 100%; the moderate positive *C. difficile* specimen category is 97.8% and the negative specimen category is 100% for the Lot-to-Lot Reproducibility (Table 9).

Cycle threshold (Ct), an internal criteria used to determine a final assay result, was selected as an additional means of assessing assay reproducibility. Overall mean Ct values with variance components (SD and %CV) are shown in Tables 8 and 9.

An additional reproducibility study was performed, in accordance with the original reproducibility study protocol, to assess high negative specimens below the BD GeneOhm™ Cdiff Assay limit of detection (LOD). A sample containing simulated bowel flora was inoculated with *C. difficile* (ATCC 43255) at a concentration equivalent to the assay LOD. 100-fold and 10-fold dilutions of this sample were prepared, respectively, to obtain the two (2) high negative panel members. Overall percent agreement for negative test results and overall mean Ct values with variance components (SD and %CV) are shown in Table 10. As expected, the more dilute panel member (100-fold below the LOD) containing lower levels of target, demonstrates a higher percent agreement for negative test results than the less dilute panel member (10-fold below the LOD) which contains higher levels of target. Although high negative panel members are below the analytical LOD of the assay, positive test results may still be observed due to the presence of target in these specimens.

Table 8: Site-To-Site Reproducibility Study Results using One Lot

Category	SITE						Overall Percent Agreement		Ct Values		
	Site 1		Site 2		Site 3						
	Percent Agreement	Percent Agreement	Percent Agreement	Percent Agreement	Percent Agreement	Percent Agreement	Overall Mean	SD	%CV		
NEG	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%	36.2 [†]	0.3 [†]	0.8% [†]
LOW POS	28/30	93.3%	29/30	96.7%	30/30	100.0%	87/90	96.7%	38.8	0.9	2.3%
MOD POS	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%	38.3	1.0	2.7%

[†]Data represent values from the internal control.

Table 9: Lot-To-Lot Reproducibility Study Results using Three Lots

Category	LOT						Overall Percent Agreement		Ct Values		
	Lot 1		Lot 2		Lot 3						
	Percent Agreement	Percent Agreement	Percent Agreement	Percent Agreement	Percent Agreement	Percent Agreement	Overall Mean	SD	%CV		
NEG	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%	36.1 [†]	0.3 [†]	0.8% [†]
LOW POS	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%	38.6	1.0	2.5%
MOD POS	29/30	96.7%	29/30	96.7%	30/30	100.0%	88/90	97.8%	37.8	1.1	2.8%

[†]Data represent values from the internal control.

Table 10: Additional Reproducibility Study Using a High Negative Sample Panel

High Negative Panel Member	Site 1		Site 2		Site 3		Overall Percent Agreement*		Ct Values		
	Percent Agreement*	Percent Agreement*	Percent Agreement*	Percent Agreement*	Percent Agreement*	Percent Agreement*					
1:100 dilution	25/30	83.3%	21/30	70.0%	26/30	86.7%	72/90	80.0%	41.3	0.9	2.1%
1:10 dilution	11/30	36.7%	5/30	16.7%	5/30	16.7%	21/90	23.3%	40.2	1.4	3.4%

*Percent agreement for a negative result.

Precision

Within-laboratory precision was evaluated for the BD GeneOhm Cdiff Assay at one (1) site. The study was performed over 12 days, with two (2) runs per day and two (2) sample replicates per run. Samples included simulated specimens representing low and moderate positive *C. difficile* as well as negative *C. difficile*. One (1) out of 24 runs was excluded due to failure of the positive control (PC). One (1) moderate positive sample produced an unresolved result. All remaining samples and controls produced reportable results for a total of 46 replicates. Precision study results for low and moderate positive samples demonstrated agreement for (46/46) and (45/46) replicates, respectively; negative sample results demonstrated agreement for (46/46) replicates.

Français

Application

Le test BD GeneOhm™ Cdiff est un test rapide *in vitro* à usage diagnostique pour la détection directe et qualitative du gène de la toxine B du *C. difficile* (*tcdB*) à partir d'échantillons de selles humaines, liquides ou molles, provenant de patients soupçonnés d'être atteints de la maladie associée au *Clostridium difficile* (CDAD). Le test, basé sur la PCR en temps réel, est destiné à aider au diagnostic de CDAD. Réalisé directement sur l'échantillon, le test utilise une réaction en chaîne de polymérase (PCR) pour l'amplification des cibles spécifiques, ainsi que des sondes d'hybridation fluorogéniques spécifiques à la cible pour la détection de l'ADN amplifié.

Résumé et explication du test

Un échantillon de selle liquide ou molle est recueilli et transporté au laboratoire. Un écouvillon sec stérile est trempé dans la matière fécale liquide ou molle, puis traité. Pour le test, l'écouvillon est élué dans le tampon d'échantillon et l'échantillon est lysé. Une aliquote du lysat est ajoutée aux réactifs de la PCR qui contiennent des amorces spécifiques à *tcdB* utilisées pour amplifier la cible génétique du *Clostridium difficile*, si elle est présente. Le test comprend aussi un contrôle interne (CI) pour détecter les échantillons inhibiteurs de la PCR et pour confirmer l'intégrité des réactifs servant à l'analyse. Les cibles amplifiées sont détectées au moyen de sondes d'hybridation marquées par des fluorophores inactivés servant de balises moléculaires. L'amplification, la détection et l'interprétation des signaux sont effectuées automatiquement par le logiciel SmartCycler® de Cepheid. La procédure entière prend de 75 à 90 minutes, en fonction du nombre d'échantillons traités.

C. difficile est l'agent étiologique de plusieurs maladies. Des études épidémiologiques montrent qu'une augmentation du nombre d'éclosions associées au *C. difficile* a été signalée dans le monde entier¹; certaines de ces éclosions ont été accompagnées d'une augmentation de la mortalité et de la morbidité.² Les symptômes de la maladie vont de diarrhée légère jusqu'à la colite grave et même jusqu'à la perforation des intestins et la mort par déshydratation. Ce pathogène est la cause principale de la diarrhée associée aux antibiotiques (AAD) et de la colite pseudo-membraneuse.³ Les facteurs de risque prédisposants sont nombreux et comprennent: l'âge, la durée et le nombre de séjours à l'hôpital, les procédures médicales invasives, les traitements immunosuppresseurs et les pathologies chroniques (diabète, syndromes cardiovasculaires ou SIDA).⁴ Ces facteurs expliquent pourquoi certaines salles (soins intensifs, chirurgie, soins de longue durée) d'hôpitaux ou d'établissements sont plus affectées que d'autres. La bactérie *C. difficile*, comme les autres bactéries de la flore intestinale, est tuée par le traitement antimicrobien mais non pas les spores de *C. difficile* qui sont insensibles à la majorité des agents antimicrobiens. Lorsque la concentration antimicrobienne est inférieure à la concentration minimale d'inhibition, les spores se développent en bactéries viables produisant des toxines.⁵

Le diagnostic de la *C. difficile* toxigène est établi généralement par un test de cytotoxicité par culture tissulaire et/ou par identification par culture de *C. difficile* et/ou par dosage immunoenzymatique (EIA). L'analyse de la cytotoxicité par culture tissulaire et l'identification par culture de *C. difficile* exigent beaucoup de temps et de main d'œuvre et les résultats sont obtenus entre 24 et 96 heures. Les dosages EIA de la toxine montrent une faible sensibilité et les immunoessais enzymatiques détectant l'antigène de la glutamate déshydrogénase (GDH EIA) montrent une faible spécificité. Le développement de techniques d'amplification moléculaire sensibles et spécifiques permet maintenant la détection de seulement quelques copies d'ADN bactérien dans les échantillons cliniques et l'identification d'espèces spécifiques.⁶ De plus, la technologie rapide par PCR permet d'obtenir ce résultat en 1 heure environ. L'ensemble de ces caractéristiques peut permettre un traitement ciblé rapide pour les patients atteints de CDAD et, par conséquent, une amélioration potentielle du pronostic pour le patient et une réduction du temps de récupération.

Principe de la procédure

À la suite de la lyse des échantillons, l'amplification de la cible *tcdB*, si elle est présente, a lieu. L'amplification du contrôle interne (CI), un fragment d'ADN de 333 paires de base (pb) comprenant une séquence de 277 pb qu'on ne retrouve pas dans *C. difficile*, a lieu également à moins que des substances inhibitrices de la PCR ne soient présentes.

La cible d'ADN amplifiée est détectée au moyen d'une balise moléculaire qui est une sonde oligonucléotidique monocaténaire adoptant une structure en épingle à cheveux porteuse d'un inactivateur à une extrémité et d'un colorant rapporteur fluorescent (fluorophore) à l'autre extrémité. En absence de cible, la fluorescence est réprimée. En présence de cible, la structure en épingle à cheveux s'ouvre lors de l'hybridation balise/cible, provoquant l'émission de fluorescence. Pour la détection des amplicons *tcdB*, la balise moléculaire contient le fluorophore FAM à l'extrémité 5' et l'inactivateur non fluorescent DABCYL à l'extrémité opposée (3') de l'oligonucléotide. Pour la détection des amplicons du CI, la balise moléculaire contient le fluorophore TET à l'extrémité 5' et l'inactivateur DABCYL à l'extrémité 3'. Chaque hybride balise-cible émet une fluorescence à une longueur d'onde caractéristique du fluorophore utilisé dans cette balise moléculaire spécifique. L'intensité de la fluorescence à un cycle donné, ou à la suite du cyclage, est fonction de la quantité d'amplicons spécifiques présents à ce moment. Le logiciel SmartCycler® surveille simultanément la fluorescence émise par chaque balise moléculaire, interprète toutes les données et fournit un résultat final à la fin du programme de cyclage (voir Interprétation des résultats).

Réactifs

Test BD GeneOhm™ Cdiff	48 tests	200 tests
<i>Tampon d'échantillon (Sample Buffer)</i>	60 X 1 mL	240 X 1 mL
Tampon Tris-EDTA		
<i>Tube de lyse (Lysis tube)</i>	50 tubes	200 tubes
Billes de verre		
<i>Mélange réactionnel (Master Mix)</i>	8 tubes	34 tubes
< 0,0005 % complexe ADN polymérase		
< 0,001 % contrôle interne (ADN non infectieux contenant des séquences liant les amorces <i>tcdB</i> avec une séquence unique pour l'hybridation de la sonde)		
< 0,002 % amorces		
< 0,002 % sondes moléculaires		
< 0,05 % mélange de nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		
Albumine sérique bovine		
Hydrate de carbone		
MgCl ₂		
< 0,001 % ADN génomique non infectieux de <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)		
<i>ADN contrôle (Control DNA)</i>	8 tubes	34 tubes
Tampon Tris-EDTA		
Hydrate de carbone		
< 0,001 % d'ADN génomique non infectieux de <i>C. difficile</i> porteur du gène <i>tcdB</i> (ATCC 43255)		
<i>Diluant (Diluent)</i>	8 X 700 µL	34 X 700 µL
Tampon Tris-HCl		
MgCl ₂		
(NH ₄) ₂ SO ₄		
KCl		

Précautions

- Ce test est à usage diagnostique *in vitro* uniquement.
- Ne pas utiliser la trousse si le sceau de sécurité sur la boîte extérieure est brisé.
- Ne pas utiliser les réactifs si leurs sachets de protection sont ouverts ou endommagés à l'arrivée.
- Refermer rapidement les sachets de protection du mélange réactionnel et de l'ADN contrôle avec les fermetures à glissière après chaque utilisation.
- Ne pas retirer les dessiccants des sachets de mélange réactionnel et d'ADN contrôle.
- Ne pas utiliser les réactifs s'il n'y a pas de dessiccant dans les sachets de mélange réactionnel et d'ADN contrôle.
- Les réactifs ne sont pas interchangeables entre les lots.
- Ne jamais mélanger de réactifs provenant de différents tubes, même s'ils proviennent du même lot.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ne pas interchanger les capuchons entre les réactifs pour ne pas les contaminer et fausser ainsi les résultats.
- Éviter la contamination microbienne et par désoxyribonucléase (DNase) des réactifs en retirant les aliquotes des tubes. Il est recommandé d'utiliser des embouts de pipette stériles, sans DNase, jetables, à filtre barrière ou à déplacement positif.

- Pour éviter la contamination de l'environnement avec les amplicons du gène *tcdB*, ne pas ouvrir les tubes de réaction après l'amplification.
- Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque échantillon ou réactif.
- La réalisation du test en dehors des intervalles temporels recommandés peut produire des résultats invalides. Les tests qui n'ont pas été réalisés dans les intervalles temporels spécifiés doivent être répétés.
- Des contrôles supplémentaires peuvent être testés selon les directives ou les règlements locaux, nationaux et/ou fédéraux ou selon les organismes d'accréditation.
- Dans les cas où des tests de PCR en tubes ouverts sont réalisés par le laboratoire, utiliser des zones de travail complètement isolées pour la préparation des échantillons et pour les activités d'amplification et de détection. Les fournitures et l'équipement doivent être consacrés à chaque zone et ne doivent pas être déplacés d'une zone à l'autre. Le port de gants est obligatoire et les gants doivent être changés pour aller d'une zone à l'autre. Les gants doivent être changés avant de manipuler les réactifs lyophilisés.
- Toujours manipuler les échantillons comme s'ils étaient infectieux et selon les procédures sécuritaires de laboratoire telles que celles décrites dans *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁷ et dans le document CLSI M29.⁸
- Porter des vêtements protecteurs et des gants jetables pour manipuler les réactifs de la trousse. Se laver soigneusement les mains après l'exécution du test.
- Ne pas pipetter avec la bouche.
- Ne pas fumer, boire ni manger dans les endroits où les échantillons ou les réactifs de la trousse sont manipulés.
- Jeter les réactifs non utilisés et les déchets selon les règlements locaux, nationaux et/ou fédéraux
- Les usagers doivent compléter un test de compétence et une formation avant d'exécuter le test BD GeneOhm™ Cdiff selon les règlements locaux, nationaux et/ou fédéraux ou les organismes d'accréditation.

Matériel fourni

- Tampon d'échantillon (*Sample Buffer*)
- Tube de lyse (*Lysis Tube*)
- Mélange réactionnel (*Master Mix*)
- ADN contrôle (*Control DNA*)
- Diluant (*Diluent*)
- Tubes de réaction SmartCycler®, capacité de 25 µL
- Étiquettes pour identifier les échantillons

Entreposage, manipulation et stabilité

Échantillons prélevés

- Les échantillons devraient être gardés entre 2 et 25 °C pendant le transport. Les protéger contre le gel ou l'exposition à une température élevée.
- Les échantillons peuvent être conservés pendant un maximum de 5 jours entre 2 et 8 °C avant l'analyse. Les échantillons peuvent être conservés à température ambiante (15-25 °C) pendant un maximum de 48 heures avant l'analyse. Les échantillons peuvent être analysés après un cycle de gel/dégel.

Réactifs**Remarque :** Les conditions d'entreposage doivent être conformes aux spécifications figurant sur chaque sachet.

Composantes de la trousse		<i>Master Mix, Diluent et Control DNA</i> (étiquettes à bande blanche , noire et rouge respectivement)	<i>Lysis tube</i> (capuchon jaune)	<i>Sample Buffer</i> (capuchon bleu)
Sachet scellé	Température	2-8 °C	2-25 °C	2-25 °C
	Stabilité	Date de péremption	Date de péremption	Date de péremption
Sachet ouvert^A	Température	2-8 °C	2-25 °C	2-25 °C ^B
	Stabilité	1 mois ^C	Date de péremption	2 mois ^C

^A Lorsque le sceau de sécurité du sachet a été brisé, refermer soigneusement le sachet avec la fermeture à glissière après chaque utilisation et le conserver à la température appropriée.

^B Bien que ces réactifs puissent être conservés à température ambiante, ils devraient être gardés avec les autres réactifs du même lot entre 2 et 8 °C.

^C À condition que les sacs soient fermés convenablement avec la fermeture à glissière après chaque utilisation.

Composantes de la trousse à l'extérieur de leur sachet de protection		<i>Master Mix et Control DNA</i> (étiquettes à bande blanche et rouge)		
Tubes contenant des réactifs non reconstitués	Température	15-25 °C		
	Stabilité	2 heures		
Tubes contenant des réactifs reconstitués^A	Réceptacle d'origine	Température	2-8 °C	
		Stabilité	3 heures	
	Tube SmartCycler®	Température	2-8 °C	
		Stabilité	1 heure	

^A Jeter les tubes inutilisés après l'expiration de la stabilité indiquée.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Écouvillon sec stérile
- Réceptacle sec stérile pour la collecte des échantillons de selles liquides ou molles
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc.) avec porte-microtube de 1,5 mL ou l'équivalent ; pour le traitement de plusieurs échantillons, un adaptateur à positions multiples peut être utilisé
- Micropipettes (plage exacte de 1 à 10 µL, 10 à 100 µL et 100 à 1000 µL)
- Embouts de micropipettes stériles exempts de DNase munis d'un filtre ou à déplacement positif
- Tubes de microcentrifugeuse exempts de DNase
- Ciseaux (facultatifs)
- Gaze
- Gants jetables, sans poudre
- Microcentrifugeuse pour centrifugation à faible vitesse
- Bloc chauffant à sec pour tubes de 1,5 mL ou bain-marie
- Glace ou bloc réfrigérant pour tubes de 1,5 mL
- Chronomètre ou minuterie
- Système de démarrage SmartCycler® (*starter system*) avec logiciel Dx (bloc analyseur, manuel d'utilisation⁹, trousse d'accessoires et ordinateur) (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)

Mode d'emploi

Prélèvement des échantillons

Pour obtenir un échantillon adéquat, suivre soigneusement la procédure de prélèvement d'échantillon.

Échantillon de selle liquide ou de selle molle

À l'aide d'un récipient sec et stérile, prélever les échantillons de selle liquide ou de selle molle de la manière suivante :

1. **Transférer la selle liquide ou molle (mais non l'urine) dans le récipient. Ne pas mélanger ni papier hygiénique, ni eau, ou savon avec l'échantillon.**
2. **Étiqueter le récipient.**
3. **Expédier le récipient au laboratoire selon le protocole standard de l'hôpital.**
4. **Voir la section Entreposage, manipulation et stabilité – Échantillons prélevés pour conservation et manipulation.**

Préparation des échantillons

REMARQUE : Un (1) tube de *Sample Buffer* (tampon d'échantillon, **capuchon bleu**) et un (1) *Lysis tube* (tube de lyse **capuchon jaune**) sont nécessaires pour chaque échantillon à tester. Un tube supplémentaire de tampon d'échantillon (**capuchon bleu**) est aussi nécessaire pour diluer les échantillons. Ce tube de tampon d'échantillon sera aussi utilisé pour la procédure du test BD GeneOhm™ Cdiff. Retirer le nombre de tubes requis de leurs sachets de protection, retirer l'excès d'air et refermer rapidement les sachets avec la fermeture à glissière.

1. **Avant de commencer la préparation des échantillons pour le test BD GeneOhm™ Cdiff, vortexer l'échantillon à haute vitesse pendant 15 secondes et tremper un écouvillon sec stérile dans la matière fécale à analyser. Retirer l'excès de selle.**
2. **Placer l'écouvillon dans un tube de tampon d'échantillon (capuchon bleu).**
Identifier le tube de tampon d'échantillon sur le capuchon et/ou sur l'étiquette du tube.
3. **Briser la tige de l'écouvillon et refermer hermétiquement le tube de tampon d'échantillon.**
Tenir l'écouvillon par la tige près du bord du tube (utiliser de la gaze pour minimiser le risque de contamination). Soulever l'écouvillon de quelques millimètres du fond et courber la tige contre le bord du tube pour la briser. Autre méthode : couper la tige avec des ciseaux propres. S'assurer que le capuchon ferme complètement.
4. **Vortexer le tampon d'échantillon (contenant l'écouvillon) à haute vitesse pendant une (1) minute.**
Pour traiter plusieurs échantillons, des adaptateurs à positions multiples peuvent être utilisés.
5. **Ajouter 40 µL du tube supplémentaire de tampon d'échantillon (capuchon bleu) au tube de lyse (capuchon jaune) afin de diluer l'échantillon.**
6. **Transférer 10 µL de suspension de cellules (de l'étape 4) au tube de lyse (capuchon jaune) contenant déjà 40 µL de tampon d'échantillon (capuchon bleu) (de l'étape 5).**
7. **Vortexer le tube de lyse pendant cinq (5) minutes à haute vitesse.**
Pour traiter plusieurs échantillons, des adaptateurs à positions multiples peuvent être utilisés.
8. **Centrifuger brièvement le tube de lyse (centrifugation rapide).**
Centrifuger à faible vitesse pendant deux (2) à cinq (5) secondes pour rassembler le contenu solide au fond du tube.
9. **Chauffer le tube de lyse à 95 ± 2 °C entre cinq (5) et sept (7) minutes.**
Utiliser un bloc chauffant à sec pour tubes de 1,5 mL ou un bain-marie.
10. **Placer le tube de lyse sur la glace ou sur un bloc réfrigérant.**
Les lysats sont stables pendant quatre (4) heures entre 2 et 8 °C.

Procédure du test BD GeneOhm™ Cdiff

REMARQUE : Un (1) tube de *Master Mix* (mélange réactionnel, **étiquette blanche**) reconstitué fournit suffisamment de réactifs **pour effectuer huit (8) réactions**. Prévoir un tube SmartCycler® par échantillon à tester et deux (2) tubes SmartCycler® supplémentaires pour les contrôles **positif et négatif**. Un (1) contrôle **positif** et un (1) contrôle **négatif** doivent être inclus dans chaque série de tests BD GeneOhm™ Cdiff. Un (1) ADN contrôle (**étiquette à bande rouge**) est requis par série. Un (1) tube de diluant (**étiquette à bande noire**) est requis pour la reconstitution d'un maximum de trois (3) tubes de mélange réactionnel. Retirer le nombre de tubes requis de leurs sachets de protection, **retirer l'excès d'air et refermer rapidement les sachets avec la fermeture à glissière**.

Préparer juste assez de tubes SmartCycler® pour remplir les modules I-CORE® disponibles sur l'instrument SmartCycler®.

1. **Placer le nombre requis de tubes de mélange réactionnel dans glace ou sur un bloc réfrigérant pour tubes de 1,5 mL.**
2. **Ajouter 225 µL de diluant (étiquette à bande noire) à chaque tube de mélange réactionnel.**
Enfoncer l'embout de la micropipette à travers la membrane du capuchon du tube de mélange réactionnel. Ne pas enfoncer l'embout trop profondément dans le capuchon. Débitier le diluant. Jeter ensuite le diluant non utilisé.
3. **Vortexer le ou les tubes pendant 5 à 10 secondes.**

4. **Placer les tubes sur la glace ou sur un bloc réfrigérant pour tubes de 1,5 mL jusqu'à ce qu'ils soient prêts à être utilisés.**
Placer un tube d'ADN contrôle (étiquette à bande rouge) sur la glace ou sur un bloc réfrigérant pour tubes de 1,5 mL.
5. **Ajouter 225 µL de tampon d'échantillon (capuchon bleu) au tube d'ADN contrôle.**
Utiliser le tube de tampon d'échantillon supplémentaire (capuchon bleu) de la préparation des échantillons (étape 5). Enfoncer l'embout de la micropipette à travers la membrane du capuchon du tube d'ADN contrôle. Ne pas enfoncer l'embout trop profondément dans le capuchon. Débitier le tampon d'échantillon.
6. **Vortexer le tube pendant 5 à 10 secondes.**
Placer le tube sur la glace ou sur un bloc réfrigérant pour tubes de 1,5 mL jusqu'à ce qu'il soit prêt à être utilisé.
7. **Placer le nombre requis de tubes SmartCycler® sur le bloc réfrigérant SmartCycler®.**
Prévoir un (1) tube SmartCycler® par échantillon et deux (2) tubes SmartCycler® en plus pour les contrôles. Éviter de toucher aux fenêtres de détection optique au bas du tube et à la zone inférieure en forme de losange.

LES ÉTAPES SUIVANTES DOIVENT ÊTRE RÉALISÉES EN UNE (1) HEURE :

8. **Ajouter 25 µL de mélange réactionnel reconstitué aux tubes SmartCycler® (utiliser une technique de pipettage appropriée pour assurer le transfert de la solution).**
Retirer le capuchon avant de pipetter le réactif. Débitier le liquide dans le réservoir (partie supérieure) des tubes SmartCycler®. Identifier les tubes SmartCycler® sur le capuchon. Les étiquettes d'identification d'échantillon (fournies avec la trousse) peuvent être utilisées. Jeter le mélange réactionnel non utilisé.
9. **Ajouter 3,0 µL de chaque échantillon lysé à un tube SmartCycler® différent (rempli précédemment avec le mélange réactionnel reconstitué) ; reboucher les tubes.**
Prendre soin de ne pas aspirer les billes en pipettant du tube de lyse. Après avoir ajouté l'échantillon, pipetter en aspirant et en relâchant 2 à 3 fois dans le réservoir pour assurer le transfert du volume entier. Utiliser un nouvel embout de micropipette pour chaque échantillon.
10. **Ajouter 3,0 µL de l'ADN contrôle reconstitué à l'avant-dernier tube SmartCycler® (contrôle positif) ; refermer le tube.**
Après l'addition d'ADN, pipetter en aspirant et en relâchant 2 à 3 fois dans le réservoir pour assurer le transfert du volume entier. Identifier comme contrôle positif. Jeter l'ADN contrôle non utilisé.
11. **Ajouter 3,0 µL de tampon d'échantillon (capuchon bleu) au dernier tube SmartCycler® (contrôle négatif) ; refermer le tube.**
Utiliser le tube de tampon d'échantillon de l'étape 5. Ceci permet de surveiller la contamination par PCR pouvant avoir eu lieu pendant la manipulation des échantillons. Identifier le tube comme contrôle négatif. Jeter le tampon d'échantillon non utilisé.
12. **Centrifuger tous les tubes de réaction pendant 5 à 10 secondes.**
Utiliser la microcentrifugeuse spécialement adaptée fournie avec l'instrument SmartCycler®.
13. **Garder les tubes entre 2 et 8 °C sur le bloc réfrigérant SmartCycler® avant de les charger dans l'instrument.**
Les lysats restants devraient être congelés à -20 ± 5 °C pour utilisation ultérieure, au besoin.
14. **Créer un essai avec le protocole du test BD GeneOhm™ Cdiff.**
Se référer au manuel d'utilisation⁹ du logiciel SmartCycler® Dx au besoin. Il est recommandé d'entrer les paramètres d'identification pour les échantillons avant de commencer l'essai.
15. **Introduire chaque tube de réaction dans un module I-CORE® du SmartCycler® et fermer le couvercle du module I-CORE®.**
Placer les contrôles positif et négatif à leur position appropriée (voir la section Contrôle de la qualité). Appuyer fermement sur les tubes pour les mettre en place.
16. **Démarrer l'essai.**

Contrôle de la qualité

Contrôles positif et négatif

Les procédures de contrôle de la qualité sont conçues pour surveiller la performance du test. Le contrôle positif a pour but de surveiller l'occurrence d'une défaillance de réactif importante. Le contrôle négatif sert à détecter la contamination du réactif ou environnementale (ou par transfert) par de l'ADN contenant des gènes *tcdB* ou des amplicons *tcdB*. Les contrôles positif et négatif sont des contrôles de série (contrôles d'essai). Un contrôle invalide rend la série invalide. Finalement, un contrôle interne incorporé à chaque mélange de réaction a pour but de surveiller l'intégrité du réactif et l'inhibition de la PCR dans chaque échantillon.

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série analysée avec le SmartCycler®. Le logiciel attribue automatiquement la position des contrôles sur l'instrument (voir le manuel d'utilisation⁹ du logiciel SmartCycler® Dx).

Contrôles du traitement des échantillons

Des souches de contrôle additionnelles peuvent être testées selon les directives ou les règlements locaux, nationaux et/ou fédéraux ou selon des organismes d'accréditation. Une souche *C. difficile* toxigène de référence porteuse du gène *tcdB* (ex. *American Type Culture Collection*, ATCC 43255 ou un isolat clinique de *C. difficile* bien caractérisé identifié pour être porteur du gène *tcdB*) peut être utilisé comme contrôle positif pour le traitement des échantillons tandis qu'une culture d'une souche *C. difficile* non toxigène (ex. ATCC 700057) peut être utilisée comme contrôle négatif pour le traitement des échantillons.

Les colonies sont isolées après 18 à 24 heures d'incubation anaérobie sur une plaque de gélose anaérobie à 5 % de sang de mouton. Remettre les colonies en suspension dans une solution saline à une turbidité de 0,5 McFarland (~1.5 X 10⁷ UFC/mL). Diluer avec une solution saline pour obtenir une suspension de ~10⁶ UFC/mL. Tremper un écouvillon sec dans la suspension bactérienne, le comprimer pour retirer l'excès de liquide. Traiter et tester comme un échantillon clinique (voir les sections « Préparation des échantillons » et « Procédure du test BD GeneOhm™ Cdiff »), y compris les contrôles. Tous les échantillons et contrôles devraient donner des résultats valides (aucun contrôle positif ou négatif invalide, aucun contrôle interne manqué et aucun résultat de contrôle de traitement d'échantillon incorrect – lorsque les contrôles de traitement des échantillons sont exécutés). En présence d'un résultat de contrôle de traitement d'échantillon incorrect, il est recommandé d'obtenir une nouvelle aliquote de l'échantillon de selles d'origine et de retester cet échantillon avec de nouveaux contrôles avant de rapporter les résultats.

Pour les directives générales de CQ, l'utilisateur peut se référer à CLSI MM3¹⁰ et C24¹¹.

Culture des échantillons cliniques

Pour identifier les espèces directement à partir des selles, les échantillons cliniques peuvent être cultivés en utilisant les procédures de l'hôpital.

Interprétation des résultats

L'algorithme décisionnel pour le test BD GeneOhm™ Cdiff est incorporé dans le logiciel SmartCycler® DX. L'interprétation des résultats de l'analyse se fait selon les critères suivants :

Type d'échantillon	Résultat d'analyse rapporté par l'instrument ⁹	Résultat de CI rapporté par l'instrument ³	Interprétation des résultats par l'utilisateur
Échantillon clinique	NEG (Négatif)	PASS (Accepté)	Aucun ADN de gène <i>tcdB</i> détecté
	POS (Positif)	NA (Non applicable)	ADN de gène <i>tcdB</i> détecté
	Unresolved (Non résolu)	FAIL (ÉCHEC)	Non résolu – échantillon inhibiteur ou défaillance de réactif
	ND (Indéterminé)	ND (Indéterminé)	Non déterminé dû à une défaillance du module I-CORE® (avec Avertissement ou Codes d'erreur ⁹)
Contrôle positif	Valid (Valide)	NA (Non applicable)	Contrôle positif valide, analyse valide quand le contrôle négatif est aussi valide.
	Invalid (Invalide)	NA (Non applicable)	Contrôle positif invalide ; analyse invalide. ^A Les résultats de l'analyse sont invalides et ne doivent pas être rapportés.
Contrôle négatif	Valid (Valide)	PASS (Accepté)	Contrôle négatif valide, analyse valide quand le contrôle positif est aussi valide
	Invalid (Invalide)	FAIL (ÉCHEC)	Contrôle négatif invalide ; analyse invalide. ^A Les résultats de l'analyse sont invalides et ne doivent pas être rapportés.

CI – Contrôle interne

^A Les séries invalidées ou les codes d'erreur d'instrument ou les avertissements sont indiqués sur l'écran et sur les rapports. Avant de rapporter les résultats de *C. difficile*, toujours vérifier que la série est valide.

Série invalide

En utilisant des lysats congelés, préparer de nouveaux tubes de réaction pour tous les échantillons cliniques de cette série avec de nouveaux tubes de contrôle.

Échantillon non résolu

Répéter le test avec le lysat congelé de l'échantillon correspondant. L'effet du cycle de gel/dégel a montré la réduction de l'effet des substances inhibitrices de la PCR.

Échantillon indéterminé à cause d'une défaillance du module I-CORE®

Répéter le test avec le lysat congelé de l'échantillon correspondant. Pour l'interprétation des messages d'avertissement et de codes d'erreur, se référer au manuel d'utilisation⁹ du logiciel SmartCycler® Dx.

Limites du test

- Les caractéristiques de performance de ce test n'ont pas été établies avec des instruments PCR en temps réel automatisés autres que l'instrument SmartCycler®.

- Ce test ne doit être utilisé qu'avec des échantillons de selles liquides ou molles ; les caractéristiques de performance d'autres types d'échantillons cliniques n'ont pas été établies.
- Des résultats de test négatifs peuvent aussi survenir par suite de prélèvement d'échantillon, de manipulation ou d'entreposage inappropriés, de la présence d'inhibiteurs, d'erreurs techniques, de mélange des échantillons ou parce que le nombre d'organismes dans l'échantillon est inférieur à la sensibilité analytique du test. Il est nécessaire de suivre attentivement les directives données dans cette notice et dans le manuel d'utilisation⁹ du logiciel SmartCycler® Dx pour éviter des résultats erronés. Seul le personnel familiarisé avec la procédure et l'utilisation du SmartCycler® doit utiliser ce test.
- Le test BD GeneOhm™ Cdiff peut produire des résultats non résolus ou invalides à cause d'un contrôle invalide ; par conséquent, il est nécessaire de retester le lysat conservé entre -20 ± 5 °C et ceci produira un retard dans l'obtention des résultats.
- Un résultat de test positif n'indique pas forcément la présence d'organismes viables. Il indique cependant la présence du gène *tcdB* et laisse supposer la présence de l'organisme toxigène *C. difficile*. Le test BD GeneOhm™ Cdiff ne peut pas être utilisé pour l'identification des espèces parce que ce système ne contient pas d'amorces et de sondes spécifiques à *C. difficile*.
- Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent affecter la détection de variants du gène *tcdB* de *C. difficile*, donnant un résultat faussement négatif avec le test par BD GeneOhm™ Cdiff.
- Bien qu'il soit inutile de préparer les réactifs et que l'opération technique principale soit le pipetage, il est essentiel de suivre les bonnes pratiques de laboratoire pour exécuter correctement ce test. La sensibilité analytique élevée de ce test exige de prendre un soin extrême pour préserver la pureté de tous les réactifs, spécialement lorsque plusieurs aliquotes sont prélevées du même tube.
- Les souches variantes de *C. difficile* toxigéniques sans le gène *tcdB* ou avec une protéine Toxine B non fonctionnelle sont très rares¹²⁻¹⁵. Le test BD GeneOhm™ Cdiff cible le gène *tcdB* et sa capacité à détecter les souches variantes Toxine A+/Toxine B- n'est pas connue.
- Le test BD GeneOhm™ Cdiff n'a pas été évalué avec les virus suivants qui pourraient être présents dans les échantillons de selles: les virus à ARN entérovirus, astrovirus, norovirus, rotavirus et virus de l'hépatite A; le virus à ADN adénovirus. Cependant, l'homologie de séquence entre les amorces et sonde de la cible du test BD GeneOhm™ Cdiff et ces virus est très faible.
- Les amorces et la sonde de la cible du test BD GeneOhm™ Cdiff ont été conçus pour discriminer le gène de la toxine B de *C. difficile* du gène de la toxine létale de *C. sordellii*. Cependant, une réaction croisée pourrait survenir à cause de l'importante homologie entre les séquences de la Toxine B de *C. difficile* et celle de la toxine létale de *C. sordellii*. À cause de la faible occurrence et de la disponibilité limitée de *C. sordellii*, une seule souche était disponible pour tester la réaction croisée avec le test. Aucune réaction croisée n'a été observée.

Substances interférentes

L'interférence potentielle de vingt-six (26) substances biologiques et chimiques utilisées ou se trouvant occasionnellement dans les échantillons périanaux, rectaux ou de selles avec le test BD GeneOhm™ Cdiff a été évaluée. Les substances interférentes potentielles comprennent le sang et le mucus, mais n'y sont pas limitées. La présence de trop grandes quantités de sang peut inhiber la PCR et peut donner des résultats non résolus. Les vingt-quatre (24) substances restantes montrées dans le tableau ci-dessous n'ont montré aucune interférence détectable avec le test BD GeneOhm™ Cdiff.

Substances Endogènes et Substances Exogènes Commerciale Évaluées avec le Test BD GeneOhm™ Cdiff

Substance	Résultat	Substance	Résultat
Anusol ^{MC} Plus *	AI**	Monistat™ Derm Crème de nitrate de miconazole à 2 % USP (McNeil)	AI
Pâte d'Ihle Atlas * 25 % p/p Pâte d'oxyde de zinc (Laboratoire Atlas Inc.)	AI	Acide palmitique * Solution fraîche à partir de la poudre (LabMat)	AI
Sulfate de barium Solution fraîche à partir de la poudre (LabMat)	AI	Préparation H [®] avec Bio-Dyne [®] * Crème (Wyeth)	AI
Crème d'acétate d'hydrocortisone USP, 0.5 % Exact™ * (Taro Pharmaceuticals Inc.)	AI	Préparation H [®] avec Bio-Dyne [®] * Onguent (Wyeth)	AI
Soulagement d'estomac Exact™ Liquide au sous-salicylate de bismuth (Perrigo [®])	AI	Suppositoires Rougier Neo-Laryngobis * (Rougier Pharma)	AI
Graisse fécale	AI	Suppositoires SAB-Dimenhydrinate [®] * (SABEX [®])	AI
Lingettes Fresh control [®] pH 5,5 (Blue Skin)	AI	Acid stéarique * Solution fraîche à partir de la poudre (LabMat)	AI
Gelée vaginale hydratante Gyne Moistrin [®] (Schering)	AI	Condoms-latex Trojan [®] (avec nonoxynol-9) Lubrifiant spermicide (Church & Dwight Co., Inc.)	AI
Imodium AD [®] * Solution orale de chlorhydrate de loperamide (McNeil)	AI	Serviettes nettoyantes Tucks ^{MC} Serviettes douces, humidifiées en flanelle (Pfizer)	AI
Kaopectate [®] Suspension orale d'attapulгите (Pharmacia & Upjohn)	AI	Crème contre les démangeaisons Vagisil [®] (Combe Incorporated)	AI
Gelée K-Y [®] (Johnson & Johnson Inc.)	AI	Vancomycine Liquide (MP Biomedicals, LLC)	AI
Métronidazole Solution fraîche à partir de la poudre (Acros Organics)	AI	Vaseline™ * Gelée de pétrole blanche U.S.P. (Lever Pond's)	AI

* Substance testée avec deux souches de *C. difficile* (Tox 0 et Tox VIII)

** AI : Aucune interférence détectable avec le test BD GeneOhm™ Cdiff

Caractéristiques de performance

Les caractéristiques de performance du test BD GeneOhm™ Cdiff ont été déterminées lors d'une étude expérimentale prospective à plusieurs sites: Quatre (4) centres médicaux, deux (2) au Canada et deux (2) aux États-Unis, ont participé à l'étude. Pour participer à l'étude, les échantillons devaient provenir d'individus pour lesquels une analyse de *Clostridium difficile* était indiquée et/ou demandée selon les politiques institutionnelles. Le test de cytotoxicité de référence a été réalisé en utilisant un test de cytotoxicité en culture tissulaire sur des échantillons de selles liquides ou molles dans les 48 heures suivant leur prélèvement. La procédure a été effectuée selon le mode d'emploi du fabricant.

Au total, 1108 échantillons ont été testés en utilisant le test de référence décrit ci-dessus et le test BD GeneOhm™ Cdiff produisant 1090 résultats rapportables. Le premier groupe comprend 835 échantillons frais, testés dans trois (3) des quatre (4) sites cliniques (Tableau 1). Le deuxième groupe comprend 267 échantillons congelés, testés dans un quatrième site clinique. En comparaison avec le test de référence, le test BD GeneOhm™ Cdiff a identifié 93,8 % des échantillons positifs pour *C. difficile* et 95,5 % des échantillons négatifs (Tableau 2). Pour la population testée, ceci résulte en une valeur prédictive négative (VPN) de 99,1 % et une valeur prédictive positive (VPP) de 67,3 %. Les tests au quatrième site clinique ont révélé que le test de cytotoxicité de référence ne rapportait pas des résultats exacts. A cause du nombre élevé de résultats inexacts du test de référence, les échantillons ont été retestés à partir d'aliquotes des échantillons de selles d'origine qui avaient été congelés après le test initial. Ces aliquotes congelées ont été testées à la fois avec le test de référence et le test BD GeneOhm™ Cdiff. Le deuxième ensemble de données comprend les résultats de 255 échantillons de selles congelés disponibles pour l'analyse (Tableau 3). Par rapport à la méthode de référence, le test BD GeneOhm™ Cdiff a identifié 100% des échantillons *C. difficile* positifs et 97,7% des échantillons négatifs dans le groupe d'échantillons congelés testés, ceci résulte en une VPN de 99,2 % et une VPP de 81,5 % (Tableau 4).

Parmi les 852 échantillons frais, testés avec le test BD GeneOhm™ Cdiff, 39 ont été rapportés initialement comme non résolus (4,6 %). Après avoir répété l'analyse en utilisant les lysats congelés, 22 ont été résolus et 17 sont restés non résolus (2,0 %) (Tableau 5). Parmi les 256 échantillons congelés analysés avec le test BD GeneOhm™ Cdiff, un (1) seul échantillon (0,4 %) a été rapporté initialement comme non résolu. L'échantillon est resté non résolu après avoir répété l'analyse à partir du lysat congelé (0,4 %) (Tableau 6). Un (1) essai a été rapporté invalide à cause d'une défaillance du contrôle d'essai (0,6 %). L'essai a été rapporté valide après répétition des tests des lysats d'échantillon (Tableau 7).

Tableau 1 : Résultats obtenus pour des selles fraîches avec le test BD GeneOhm™ Cdiff en comparaison avec le test de référence

		Analyse de cytotoxicité de référence		
		+	-	
Analyse par BD GeneOhm™ Cdiff	+	76	34 [†]	110
	-	5 [‡]	720	725
		81	754	835

[†]L'analyse de cytotoxicité sur les souches isolées était positive pour 21 des 34 échantillons, confirmant la présence de *C. difficile* toxigénique. Pour les 13 échantillons restants, une analyse PCR standard avec des amorces alternatives suivie d'un séquençage bidirectionnel a révélé que 11 des 13 échantillons contenaient le gène *tcdB* attendu.

[‡]Pour deux (2) des cinq (5) échantillons faux négatifs, *C. difficile* a été récupéré par culture, et seulement l'un (1) des deux (2) a été rapporté toxigénique. Des trois (3) échantillons faux négatifs au PCR restants, aucun n'a été récupéré par culture.

Tableau 2 : Performance obtenue pour des selles fraîches avec le test par BD GeneOhm™ Cdiff en comparaison avec le test de référence

Sites cliniques	Prévalence	Sensibilité avec 95 % IC*	Spécificité avec 95 % IC*
Site 1	11,0 % (40/365)	90,5 % (38/42) (77,4 % - 97,3 %)	95,7 % (309/323) (92,8 % - 97,6 %)
Site 2	6,7 % (16/240)	94,4 % (17/18) (72,7 % - 99,9 %)	96,4 % (240/249) (93,2 % - 98,3 %)
Site 3	11,1 % (18/162)	100 % (21/21) (83,9 % - 100 %)	94,0 % (171/182) (89,4 % - 96,9 %)
Pourcentage global	9,6 % (74/767)	93,8 % (76/81) (86,2 % - 98,0 %)	95,5 % (720/754) (93,8 % - 96,9 %)

* IC : Intervalles de confiance

Tableau 3 : Résultats obtenus pour des selles congelées avec le test BD GeneOhm™ Cdiff en comparaison avec le test de référence

		Analyse de cytotoxicité de référence		
		+	-	
Analyse par BD GeneOhm™ Cdiff	+	34	5	39
	-	0	216	216
		34	221	255

Tableau 4 : Performance obtenue pour des selles congelées en utilisant le test BD GeneOhm™ Cdiff en comparaison avec le test de référence

Site clinique	Prévalence	Sensibilité avec 95 % IC*	Spécificité avec 95 % IC*
Site 4	12,7 % (34/267)	100,0 % (34/34) (89,7 % - 100 %)	97,7 % (216/221) (94,8 % - 99,3 %)

* IC : Intervalles de confiance

Tableau 5 : Taux de non résolus pour les selles fraîches

Sites cliniques	Taux non résolu initial avec 95 % IC*	Taux non résolu après répétition avec 95 % IC*
Site 1	0,8 % (3/367) (0,2 % - 2,4 %)	0,5 % (2/367) (0,1 % - 2,0 %)
Site 2	6,6 % (18/273) (4,0 % - 10,2 %)	2,2 % (6/273) (0,8 % - 4,7 %)
Site 3	8,5 % (18/212) (5,1 % - 13,1 %)	4,2 % (9/212) (2,0 % - 7,9 %)
Pourcentage Global	4,6 % (39/852) (3,3 % - 6,2 %)	2,0 % (17/852) (1,2 % - 3,2 %)

* IC : Intervalles de confiance

Tableau 6 : Taux de non résolus pour les selles congelées

Site clinique	Taux non résolu initial avec 95 % IC*	Taux non résolu après répétition avec 95 % IC*
Site 4	0,4 % (1/256) (0,0 % - 2,2 %)	0,4 % (1/256) (0,0 % - 2,2 %)

* IC : Intervalles de confiance

Tableau 7 : Taux global d'essais invalides généraux

Site	Taux d'essais invalides avec 95 % IC*	
Site 1	2,6 % (1/38)	(0,1 % - 13,8 %)
Site 2	0,0 % (0/41)	(0,0 % - 8,6 %)
Site 3	0,0 % (0/58)	(0,0 % - 6,2 %)
Site 4	0,0 % (0/23)	(0,0 % - 14,8 %)
Pourcentage Global	0,6 % (1/160)	(0,0 % - 3,4 %)

* IC : Intervalles de confiance

Spécificité analytique

L'ADN génomique d'une souche de *C. difficile* non toxigène, de deux souches de Toxinotype XI ne portant pas le gène *tcdB*¹³ et de 29 autres souches de *Clostridium* (y compris une souche de *C. sordellii*), avec 99 organismes très proches et d'autres de la flore pathogène et commensale trouvée dans les intestins et les selles (représentant 96 espèces) a été testé. Toutes les souches ont été testées à une concentration d'environ 1X10⁸ UFC/ml ou 1X10⁸ copies de cible/mL. Aucune de ces espèces n'a montré un résultat positif avec le test BD GeneOhm™ Cdiff.

Sensibilité analytique

Une culture quantifiée et de l'ADN génomique purifié dilué dans le tampon d'échantillon du test BD GeneOhm™ Cdiff ont été testés en cinq (5) réplicats. La limite de détection (LOD) a été définie comme étant la concentration la plus faible, en termes de nombre de copies d'ADN par réaction et d' UFC par réaction, à laquelle cinq réplicats sur cinq ont été trouvés positifs.

La sensibilité analytique (limite de détection ou LOD) du test BD GeneOhm™ Cdiff a été déterminée avec une souche de *Clostridium difficile* de Toxinotype 0 porteuse du gène *tcdB* (ATCC 43255).

La LOD du test BD GeneOhm™ Cdiff est de 10 copies d'ADN par réaction. La LOD en unités formatrices de colonies (UFC) est établie à 4 UFC par réaction.

La sensibilité analytique en UFC par réaction a été confirmée avec un deuxième Toxinotype 0 (ATCC 9689) et avec des souches toxigéniques de *Clostridium difficile* de Toxinotypes IIIa (SE844¹⁶) V (SE881¹⁶), VII (57267¹⁶) et VIII (1470¹⁶).

Outre les souches utilisées pour la détermination de la LOD, cent (100) autres souches de *C. difficile* toxigéniques (y compris 17 autres toxinotypes), représentant 21 pays, provenant d'isolats cliniques bien caractérisés ou de collections publiques ont été évaluées en utilisant le test BD GeneOhm™ Cdiff. Les souches de *C. difficile* ont été testées à une concentration d'environ 6,7 copies d'ADN par µL ou 1 UFC/µL. L'analyse a identifié correctement toutes les 100 souches de *C. difficile* porteuses du gène *tcdB*.

Reproductibilité

Le panel de reproductibilité consistait en trois (3) catégories d'échantillons simulés où chaque tube contenait 100 µl de flore intestinale simulée; les deux membres positifs du panel ont aussi été inoculés avec du *C. difficile* (ATCC 43255). De plus, deux (2) contrôles de traitement d'échantillon (ATCC 9689 et ATCC 25922) et deux (2) contrôles d'essai (positif et négatif) ont été inclus. Les échantillons ont été testés en triplicat par panel, en cinq (5) jours distincts (consécutifs ou non), au cours desquels chaque jour deux (2) panels ont été testés, chacun par un de deux (2) techniciens, à trois (3) sites cliniques avec un (1) lot de réactifs. Un (1) de ces sites cliniques a participé à l'étude étendue où deux (2) lots supplémentaires de réactifs ont été testés.

La concordance clinique totale pour la catégorie d'échantillons positifs de *C. difficile* à basse concentration est de 96,7 % ; celui de la catégorie d'échantillons positifs de *C. difficile* à concentration modérée est de 100 % et celui de la catégorie d'échantillons négatifs est de 100 % pour la reproductibilité de site-à-site (Tableau 8).

La concordance clinique totale pour la catégorie d'échantillons positifs de *C. difficile* à basse concentration est de 100 % ; celui de la catégorie d'échantillons positifs de *C. difficile* à concentration modérée est de 97,8 % et celui de la catégorie d'échantillons négatifs est de 100 % pour la reproductibilité de lot-à-lot (Tableau 9).

Le cycle seuil (Cycle threshold, Ct), un critère interne utilisé pour déterminer le résultat final d'un test, a été sélectionné comme moyen additionnel d'évaluation de la reproductibilité du test. Les valeurs globales des moyennes des cycles seuil et leurs composantes de variances (écart type et CV %) sont montrées aux tableaux 8 et 9.

Une étude de reproductibilité additionnelle a été réalisée, en accord avec le protocole de l'étude de reproductibilité initiale, pour évaluer des spécimens hautement négatifs sous la limite de détection (LOD) du test BD GeneOhm™ Cdiff. Un échantillon contenant de la flore intestinale simulée a été inoculé avec du *C. difficile* (ATCC 43255) à une concentration équivalente à celle de la limite de détection de l'essai. Des dilutions un centième et un dixième de cet échantillon ont été préparées respectivement pour obtenir les deux (2) membres de panel hautement négatifs. La concordance clinique totale pour les résultats négatifs du test et la moyenne globale des valeurs de cycle seuil avec les composantes de variance (écart-type et CV %) sont montrées au tableau 10. Tel que prévu, le membre de panel le plus dilué (100 fois sous la limite de détection), contenant le niveau le plus faible de cible, montre une concordance clinique plus élevée pour les résultats négatifs que le membre de panel moins dilué (dix fois sous la limite de détection), qui contient un niveau plus élevé de cible. Bien que les membres de panel hautement

négatifs soient sous la limite de détection analytique du test, des résultats positifs peuvent malgré tout être observés à cause de la présence de cible dans ces échantillons.

Tableau 8 : Résultats d'étude de reproductibilité de site-à-site en utilisant un seul lot

Catégorie	SITE						Concordance Clinique Totale		Valeurs de Cycle Seuil (Ct)		
	Site 1		Site 2		Site 3				Moyenne Globale	Écart type	CV %
	Concordance Clinique	Concordance Clinique	Concordance Clinique	Concordance Clinique	Concordance Clinique	Concordance Clinique					
NEG	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%	36.2 [†]	0.3 [†]	0.8% [†]
POS BAS	28/30	93.3%	29/30	96.7%	30/30	100.0%	87/90	96.7%	38.8	0.9	2.3%
POS MOD	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%	38.3	1.0	2.7%

[†] Les données représentent les valeurs du contrôle interne.

Tableau 9 : Résultats d'étude de reproductibilité de lot-à-lot en utilisant trois lots

Catégorie	LOT						Concordance Clinique Totale		Valeurs de Cycle Seuil (Ct)		
	Lot 1		Lot 2		Lot 3				Moyenne Globale	Écart type	CV %
	Concordance Clinique	Concordance Clinique	Concordance Clinique	Concordance Clinique	Concordance Clinique	Concordance Clinique					
NEG	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%	36.1 [†]	0.3 [†]	0.8% [†]
POS BAS	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%	38.6	1.0	2.5%
POS MOD	29/30	96.7%	29/30	96.7%	30/30	100.0%	88/90	97.8%	37.8	1.1	2.8%

[†] Les données représentent les valeurs du contrôle interne.

Tableau 10: Étude de Reproductibilité Additionnelle Utilisant un Panel d'Échantillon Hautement Négatifs

Membre de Panel Hautement Négatif	Site 1		Site 2		Site 3		Concordance Clinique Totale *		Valeurs de Cycle Seuil (Ct)		
	Concordance Clinique *	Concordance Clinique *	Concordance Clinique *	Concordance Clinique *	Moyenne Globale	Écart type			CV %		
dilution 1:100	25/30	83.3%	21/30	70.0%	26/30	86.7%	72/90	80.0%	41.3	0.9	2.1%
dilution 1:10	11/30	36.7%	5/30	16.7%	5/30	16.7%	21/90	23.3%	40.2	1.4	3.4%

*Concordance clinique pour un résultat négatif.

Précision

La précision intra-laboratoire a été évaluée pour l'essai BD GeneOhm™ Cdiff sur un (1) site. L'étude a été réalisée durant 12 jours, avec deux (2) séries par jour et deux (2) répliqués d'échantillons par série. Les échantillons simulés analysés incluaient des échantillons de *C. difficile* à concentration basse et modérée ainsi que des échantillons négatifs. Une (1) des 24 séries a été exclue à cause de l'échec du contrôle positif (CP). Un (1) échantillon modérément positif a produit un résultat non résolu. Tous les échantillons restant et les contrôles ont produit des résultats rapportables pour un total de 46 répliqués. Les résultats de l'étude de précision pour les échantillons positifs à concentration basse et modérée ont montré une concordance pour 46/46 et 45/46 répliqués respectivement ; les résultats des échantillons négatifs ont montré une concordance pour 46/46 répliqués.

References/Références

1. Cloud J and Kelly CP., Update on *Clostridium difficile* associated disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2007 Jan; 23 (1):4-9.
2. Warny M, *et al.* Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*. 2005 Sep 24-30; 366(9491):1079-84.
3. Bartlett, John G. MD, *Clostridium difficile*: Old and New Observations. *J of Clin Gastroent* 41 Supplement 1:S24-S29, May/June 2007.
4. Hurley BW and Nguyen CC. The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. *Arch Intern Med*. 2002 Oct 28; 162 (19):2177-84.
5. Polgreen PM, *et al.* An outbreak of severe *Clostridium difficile*-associated disease possibly related to inappropriate antimicrobial therapy for community-acquired pneumonia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007 Feb; 28 (2):212-4.
6. Nagy E, *et al.* The place of molecular genetic methods in the diagnostics of human pathogenic anaerobic bacteria. A minireview. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2006 Jun; 53 (2):183-94.
7. 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.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (Refer to the latest edition). Clinical Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.
9. SmartCycler® Dx Software Operator Manual D4198 Rev. C, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline, document MM3-A2 (Refer to the latest edition). Clinical Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute Statistical Quality Control for Quantitative Measurements: Principles and Definitions; Approved Guideline. Document C24 (Refer to the latest edition). Clinical Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.
12. Cohen SH *et al.* (1998) Isolation of a Toxin B-deficient mutant strain of *Clostridium difficile* in a case of recurrent *C. difficile* – Associated Diarrhea, *Clin. Infect. Dis*. 26: 410-412.
13. Cohen SH *et al.* (2000) Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains, *J. Infect. Dis*. 181: 659-63.
14. Maccannell D. *et al.* (2006) Characterization of a novel, TcdB-deficient, NPA1 variant strain of *Clostridium difficile*, 46th Annual ICAAC, San Francisco, Sept. 2006.
15. McFarland, L.V., *et al.*, Implications of the changing face of *Clostridium difficile* disease for health care practitioners. *Am J Infect Control*, 2007. 35(4): p. 237-53.
16. Rupnik M. *et al.* A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates, *J Clin Microbiol*, 1998, vol 36 no 8 : 2240-2247 .
17. Rupnik M. *et al.* Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes, *Microbiology* 2001, 147, 439-447.

This kit is sold under license from the Public Health Research Institute of the City of New York, Inc. and may be used under the PHRI patent rights only for human *in vitro* clinical diagnostics.

The purchase of this product allows the purchaser to use it for amplification and detection of nucleic acid sequences for providing human *in vitro* diagnostics. No general patent or other license of any kind other than this specific right of use from purchase is granted hereby.













This product is subject to an agreement between Molecular Probes, Inc. and GeneOhm Sciences, Inc., and the manufacture, use, sale or import of this product may be subject to one or more of U.S. patents, pending applications and corresponding foreign equivalents, owned by Molecular Probes, Inc. (a wholly owned subsidiary of Invitrogen Corporation). The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product, for use in assays for nucleic acid detection for the purpose of identifying microorganisms in human diagnostics. The buyer cannot use this product or its components for manufacturing or for therapeutic or prophylactic use, or sell or otherwise transfer this product or its components to any third party, or use for any use other than use in human diagnostics. For information on purchasing a license to this product for purposes other than use in human diagnostics, contact Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402, USA, Tel: (541) 465-8300. Fax: (541) 335-0504.

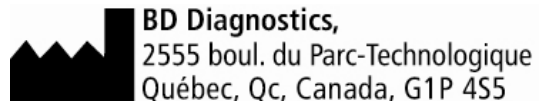
Cette trousse est vendue sous licence du «Public Health Research Institute of the City of New York, Inc.» et peut être utilisée sous les droits de brevet de PHRI uniquement pour du diagnostic clinique *in vitro* chez l'humain.

L'achat de ce produit permet à l'acheteur de l'utiliser pour procéder à une amplification et à une détection de séquences d'acides nucléiques lors de diagnostics cliniques *in vitro* chez l'humain. Aucun droit de brevet général ou autre licence d'aucune sorte autre que le droit d'utilisation spécifique conféré par l'achat n'est accordé ici.

Ce produit est l'objet d'un accord entre Molecular Probes, Inc. et GeneOhm Sciences, Inc., et la fabrication, l'utilisation, la vente ou l'importation de ce produit peut être protégée par un ou plusieurs brevets américains, applications en cours et équivalents étrangers correspondants, appartenant à Molecular Probes, Inc. (filiale à cent pour cent de Invitrogen Corporation). L'achat de ce produit donne à l'acheteur le droit non transférable d'utiliser la quantité achetée du produit et des composants du produit à des fins d'analyse destinées à la détection d'acides nucléiques dans le but d'identifier des microorganismes dans les diagnostics humains. L'acheteur ne peut pas utiliser ce produit ou ses composants pour la fabrication ou pour un usage thérapeutique ou prophylactique, ni vendre ou transférer de manière quelconque ce produit ou ses composants à un tiers, ou l'utiliser pour un usage quelconque autre que les diagnostics humains. Pour tout renseignement sur l'achat d'une licence pour ce produit à des fins autres que le diagnostic humain, s'adresser à Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402, USA, Tél : (541) 465-8300. Téléc. : (541) 335-0504.

Index of Symbols/Index des Symboles

Symbol/Symbole	Meaning/Signification	Symbol/Symbole	Meaning/Signification
	Manufacturer / Fabricant		Batch code / Code de lot
REF	Catalog number / Référence du catalogue		Temperature limitation / Limites de température
	In Vitro Diagnostic Use / Aux fins de diagnostic <i>in vitro</i>		Protect from light and moisture / Conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité
	Authorized European Representative / Représentant européen autorisé		Reseal pouches after use / Refermer le sac après utilisation
	Use by / Utiliser avant		Consult instructions for use / Se référer aux instructions d'utilisation
	Contains sufficient for "n" tests / Contenu suffisant pour « n » tests	 Xi	Irritating to eyes and skin / Irritant pour les yeux et la peau
	Box 1 of 3 / Boîte 1 de 3		



Customer Service/ Service à la clientèle: 1.888.436.3646



Australian Representative:
Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive,
Macquarie University Research Park,
North Ryde,
NSW 2113 Australia