

Mode d'emploi

RealStar[®]

Clostridium difficile PCR Kit 2.0

03/2019 FR

RealStar®

Clostridium difficile PCR Kit 2.0

Pour utilisation avec

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)



172013



96



03 2019



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Sommaire

1.	Usage prévu.....	6
2.	Composants du kit.....	6
3.	Stockage	6
4.	Matériel requis non fourni	7
5.	Informations générales.....	8
6.	Description du produit.....	9
6.1	Instruments de PCR en temps réel	10
7.	Mises en garde et précautions.....	11
8.	Procédure	12
8.1	Préparation du prélèvement.....	12
8.2	Préparation du Mastermix.....	13
8.3	Préparation de la réaction.....	15
9.	Programmation des instruments de PCR en temps réel.....	16
9.1	Paramètres.....	16
9.2	Marqueurs de fluorescence (fluorophores)	16
9.3	Profil de température et acquisition du fluorophore	17
10.	Analyse des données	17
10.1	Validation des tests de diagnostic.....	18
10.1.1	Validité des tests de diagnostic (qualitatif)	18
10.1.2	Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif).....	18
10.2	Interprétation des résultats.....	19
10.2.1	Analyse qualitative	19
11.	Evaluation des performances	19

11.1	Sensibilité analytique	19
11.2	Spécificité analytique	21
11.3	Précision	23
12.	Restrictions	24
13.	Contrôle qualité	25
14.	Assistance technique	25
15.	Bibliographie	25
16.	Marques de commerce et clauses de non-responsabilité	26
17.	Explications des symboles	27

1. Usage prévu

Le kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 est un test de diagnostic *In Vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection qualitative et la différenciation de l'ADN spécifique de la *toxine A (tcdA)* et de la *toxine B (tcdB)* de *Clostridium difficile*.

2. Composants du kit

Couleur du bouchon	Composants	Nombre de tubes	Volume [µL/tube]
Bleu	Master A	8	60
Violet	Master B	8	180
Vert	Internal Control	1	1000
Rouge	Positive Control	1	250
Blanc	Water (PCR grade)	1	500

3. Stockage

- Le kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 est livré sur de la neige carbonique. Les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés à réception, ou si l'un des tubes a été endommagé pendant le transport, merci de contacter altona Diagnostics GmbH pour assistance.
- Tous les composants doivent être conservés entre -25°C et -15°C dès leur livraison.
- Il convient d'éviter des cycles répétés de congélation-décongélation (plus de deux) car cela peut affecter les performances du test. Les réactifs doivent être congelés en aliquots en cas d'utilisation occasionnelle
- La conservation entre +2°C et +8°C ne doit pas excéder une période de deux heures.
- Le Master A et le Master B doivent être conservés à l'abri de la lumière.

4. Matériel requis non fourni

- Instrument adapté à la PCR en temps réel (Chapitre 6.1 Instruments de PCR en temps réel)
- Système ou kit approprié à l'extraction des acides nucléiques (voir chapitre 8.1 Préparation du prélèvement)
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour des tubes réactionnels de 2 mL
- Centrifugeuse avec rotor pour microplaques, si des plaques de 96 puits sont utilisées
- Vortex
- Plaques de 96 puits ou tubes réactionnels avec le matériel de fermeture correspondant (optique)
- Pipettes (réglables)
- Cônes avec filtres (jetables)
- Gants non poudrés (jetables)

REMARQUE



Merci de vous assurer que les instruments ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus selon les instructions et les recommandations du fabricant.

NOTE



Il est fortement recommandé d'utiliser le rotor de 72 puits avec les tubes réactionnels de 0,1 ml correspondants, si le Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou le Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN) est utilisé.

5. Informations générales

Clostridium difficile est une bactérie anaérobie sporulée du genre *Clostridium*. Cette espèce constitue une population de structure variée, incluant des centaines de types de souches différents. Ces bactéries à gram positif présentent un grand génome circulaire d'environ 4,3 Mb. [1]

La bactérie est transmise par voie oro-fécale, souvent au cours d'une hospitalisation, en raison d'un isolement inadéquat des patients infectés et de pratiques insuffisantes en matière d'hygiène. Cependant, tous les patients infectés ne sont pas symptomatiques. *Clostridium difficile* ne peut pas se multiplier dans la flore gastro-intestinale saine normale, car d'autres bactéries empêchent sa prolifération. Lorsque la flore normale a été éradiquée par l'administration d'antibiotiques, une pullulation des bactéries et une colonisation de tout le côlon deviennent possibles. [2]

Après avoir colonisé le côlon, les bactéries peuvent fabriquer une ou deux toxines, les toxines A et B, à l'origine de l'effet pathogène. La fabrication de cette toxine est déclenchée par la *détection du quorum*. Les toxines fabriquées perturbent l'adhérence cellulaire muqueuse (*tcdA*) et induisent l'apoptose (*tcdB*), ce qui peut entraîner diverses maladies allant de la diarrhée légère à des complications inflammatoires menaçant le pronostic vital, telles que l'entérocolite pseudomembraneuse ou le mégacôlon toxique. L'infection est mortelle dans 1,5 % de l'ensemble des cas de diarrhée à *Clostridium difficile* chez des patients hospitalisés, les patients âgés étant les plus exposés. [2, 3]

Les patients atteints reçoivent un traitement antibiotique et des mesures de soutien visant à remédier à la déshydratation et à la déperdition électrolytique. La forme sporulée de *Clostridium difficile* est néanmoins résistante aux antibiotiques, ce qui contrecarre le traitement antibiotique et peut entraîner la réapparition des symptômes une fois ce traitement terminé. [2] *Clostridium difficile* est une cause majeure de diarrhée associée à la prise d'antibiotiques et d'infections associées aux soins dans les pays en développement, avec un impact économique considérable. Le nombre d'infections sévères en constante augmentation ces dernières décennies engendre le besoin de méthodes rapides et précises de détection et de traitement

afin de réduire la mortalité et les coûts médicaux et de favoriser la lutte contre les infections. [4]

- [1] Knight DR, Elliot B, Chang BJ, Perkins TT, Riley TV (2015) Diversity and Evolution in the Genome of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Rev. 28: 721-741.
- [2] Tonna I and Welsby PD (2005). Pathogenesis and treatment of Clostridium difficile infection. Postgrad Med J. 81: 367-369.
- [3] Kirk JA, Banerji O, Fagan RP (2017). Characteristics of the Clostridium difficile cell envelope and its importance in therapeutics. Microb Biotechnol. 10: 76-90.
- [4] Peng Z, Ling L, Stratton CW, Li C, Polage CR, Wu B, Tang Y-W (2018). Advances in the diagnosis and treatment of Clostridium difficile infections. Emerg Microbes Infect. Doi: 10.1038/s41426-017-0019-4.

6. Description du produit

Le kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 est un test de diagnostic *In Vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection qualitative et la différenciation de l'ADN spécifique de la *toxine A (tcdA)* et de la *toxine B (tcdB)* de *Clostridium difficile*.

Le test comprend un système d'amplification hétérologue (contrôle interne) afin d'identifier d'éventuelles inhibitions de la PCR et de confirmer l'intégrité des réactifs du kit.

La technologie PCR en temps réel utilise la réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification de séquences cibles spécifiques et de sondes spécifiques aux cibles pour la détection de l'ADN amplifié. Les sondes sont marquées avec un marqueur fluorescent (reporter) et un désactivateur (quencher).

Les sondes spécifiques de l'ADN de *tcdA* sont marquées par le fluorophore Cy[®]5, tandis que les sondes spécifique de l'ADN de *tcdB* sont marquées par le fluorophore FAM[™]. La sonde spécifique du contrôle interne est marquée par le fluorophore JOE[™].

L'utilisation de sondes associées à des fluorophores différents permet la détection en parallèle de l'ADN spécifique de *tcdA* et *tcdB*, ainsi que la détection du contrôle interne dans les canaux correspondants de l'instrument PCR en temps réel.

Le test consiste en deux processus réalisés dans un même tube réactionnel :

- L'amplification par PCR de l'ADN cible et contrôle interne
- La détection simultanée des amplicons de PCR par des sondes marquées par un fluorophore

The RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 consists of:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)

Les réactifs du Master A et du Master B contiennent tous les composants nécessaires (tampon PCR, ADN Polymérase, sel de magnésium, amorces et sondes) afin de réaliser l'amplification par PCR et la détection de la cible ADN spécifique de *tcdA*, de la cible ADN spécifique de *tcdB* ainsi que du contrôle interne en une seule étape de réaction.

6.1 Instruments de PCR en temps réel

Le kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments de PCR en temps réel suivants :

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

7. Mises en garde et précautions

Lire attentivement le manuel d'utilisation avant d'utiliser le produit.

- Avant toute utilisation, veuillez vérifier que le produit et ses composants :
 - Ne sont pas endommagés,
 - Sont complets : nombre, type et volume (voir le chapitre 2. Composants du kit)
 - Sont correctement étiquetés,
 - Sont congelés à la réception
- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé aux techniques de PCR en temps réel et *aux procédures* de diagnostic in vitro.
- Manipuler les comme s'ils étaient infectieux et/ou dangereux, en accord avec les procédures de sécurité en vigueur dans le laboratoire.
- Porter des gants jetables non talqués, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons.
- Eviter les contaminations microbiennes et nucléaires (par ADNase/ARNase) de l'échantillon et des composants du kit.
- Toujours utiliser des pipettes à cônes jetables avec filtre, non contaminées par de l'ADNase et de l'ARNase.
- Toujours porter des gants de protection non talqués lors de la manipulation des composants du kit.
- Utiliser des zones de travail séparées les unes des autres pour les différentes activités de (i) préparation des échantillons, (ii) préparation de la réaction et (iii) les étapes d'amplification/détection. Le sens de travail dans le laboratoire

doit être unidirectionnel. Portez toujours des gants jetables dans chacune des zones de travail et changez-en avant de pénétrer dans une zone différente.

- Dédier des fournitures et du matériel pour chaque zone de travail et ne pas les déplacer d'une zone à une autre.
- Conserver le matériel positif et/ou potentiellement positif séparément des autres composants du kit.
- Ne pas ouvrir les tubes/plaques de réaction après l'amplification afin d'éviter toute contamination par les amplicons.
- Des témoins additionnels peuvent devoir être testés selon les directives des organisations locales/gouvernementales ou des organismes d'accréditation.
- Ne pas autoclaver des tubes réactionnels après une PCR, car ceci ne dégrade pas les acides nucléiques amplifiés et risque de contaminer le laboratoire.
- Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.
- Eliminer les échantillons et les déchets de l'essai conformément aux règles de sécurité locales.

8. Procédure

8.1 Préparation du prélèvement

L'ADN extrait constitue le matériel de départ pour le kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0.

La qualité de l'ADN extrait a un impact significatif sur la performance de l'ensemble du test. Il est recommandé de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de PCR en temps réel. Les kits et systèmes suivants sont compatibles pour l'extraction des acides nucléiques :

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)

- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

D'autres kits ou systèmes d'extraction des acides nucléiques peuvent être appropriés. L'aptitude de la procédure d'extraction des acides nucléiques à utiliser avec le kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 doit être validée par l'utilisateur.

Si la préparation des échantillons s'effectue sur une colonne comportant des tampons de lavage à l'éthanol, une étape de centrifugation supplémentaire de 10 minutes à environ 17 000 x g (~ 13 000 tr/min), dans un nouveau tube à essai, est vivement recommandée avant l'élution des acides nucléiques.

ATTENTION



Si votre système de préparation des échantillons utilise des tampons de lavage à l'éthanol, assurez-vous d'éliminer toute trace d'éthanol avant de procéder à l'élution des acides nucléiques. L'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel.

ATTENTION



L'utilisation d'ARN porteur (carrier) est crucial pour l'efficacité de l'extraction et la stabilité des acides nucléiques extraits.

Pour toute information complémentaire ou assistance technique sur le prétraitement et la préparation des échantillons, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

8.2 Préparation du Mastermix

Tous les réactifs doivent être complètement décongelés, homogénéisés (par pipetage ou léger vortexage) et brièvement centrifugés avant utilisation.

Le kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 contient un contrôle interne hétérologue pouvant être utilisé soit comme contrôle d'inhibition de la PCR soit comme contrôle de la préparation de l'échantillon (extraction des acides nucléiques) et de l'inhibition de la PCR.

- ▶ Si le contrôle interne est utilisé comme un contrôle d'inhibition de la PCR, mais non comme contrôle de préparation de l'échantillon, le Mastermix doit être préparé comme décrit par le schéma de pipetage ci-dessous :

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (contrôle interne)	1 µl	12 µl
Volume Mastermix	21 µl	252 µl

- ▶ Si le contrôle interne est utilisé comme contrôle de préparation de l'échantillon, et d'inhibition de la PCR, le contrôle interne doit être ajouté au moment de la procédure d'extraction des acides nucléiques.
- ▶ Quelle que soit la méthode ou le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, le contrôle interne **ne doit jamais** être ajouté directement à l'échantillon. Le contrôle interne doit toujours être ajouté au mélange échantillon/tampon de lyse. Le volume du contrôle interne à ajouter dépend toujours et uniquement du volume d'élution, dont il représente 10 %. Par exemple si les acides nucléiques doivent être élués dans 60 µL de tampon d'élution ou d'eau, 6 µL de contrôle interne par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/tampon de lyse.
- ▶ Si le contrôle interne a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, le Mastermix doit être préparé selon le schéma de pipetage suivant :

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume Mastermix	20 µl	240 µl

ATTENTION

Si le contrôle interne a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, au moins le contrôle négatif doit inclure le contrôle interne.

ATTENTION

Quelle que soit la méthode ou le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, ne jamais ajouter le contrôle interne directement à l'échantillon.

8.3 Préparation de la réaction

- ▶ Pipeter 20 µL de Mastermix dans chacun des puits nécessaires de la plaque 96 puits ou d'un tube à essai permettant les réactions optiques.
- ▶ Ajouter 10 µL d'échantillon (éluat issu de l'extraction des acides nucléiques) ou 10 µL des contrôles (contrôles positifs ou négatifs).

Préparation de la réaction	
Mastermix	20 µl
Echantillon ou contrôle	10 µl
Volume total	30 µl

- ▶ S'assurer qu'au moins un contrôle positif et au moins un contrôle négatif sont utilisés par Mastermix et par essai.

- ▶ Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le Mastermix par pipetage.
- ▶ Couvrir la plaque 96 puits avec un film adhésif transparent approprié et les tubes réactionnels à l'aide de bouchons appropriés.
- ▶ Centrifuger les plaques de 96 puits à l'aide d'un rotor à microplaques pendant 30 secondes à environ 1 000 x g (~ 3 000 tr/min).

9. Programmation des instruments de PCR en temps réel

Pour obtenir des informations générales sur la préparation et la programmation des différents instruments de PCR en temps réel, veuillez consulter les manuels d'utilisation des instruments respectifs.

Pour des instructions sur la programmation relative à l'utilisation du kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 avec un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

9.1 Paramètres

- ▶ Définir les paramètres suivants :

Paramètres	
Volume de réaction	30 µl
Vitesse de la rampe	Par défaut
Référence passive	Aucun

9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores) :

Cible	Nom de marqueur	Fluorophore (Reporter)	Désactivateur (Quencher)
<i>tcdA</i> spécifique ADN	<i>tcdA</i>	Cy®5	(aucun)
<i>tcdB</i> spécifique ADN	<i>tcdB</i>	FAM™	(aucun)
Internal Control (contrôle interne)	IC	JOE™	(aucun)

9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore

- Définir le profil de température et l'acquisition du fluorophore :

	Etape	Nombre de cycles	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:sec]
Dénaturation	Stationnaire	1	-	95	02:00
Amplification	Cyclique	45	-	95	00:15
			Oui	58	00:45
			-	72	00:15

10. Analyse des données

Pour des informations de base concernant l'analyse des données sur un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de se référer au manuel de l'instrument concerné.

Pour des informations détaillées concernant l'analyse des données générées avec le kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 sur différents instruments de PCR en temps réel, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

10.1 Validation des tests de diagnostic

10.1.1 Validité des tests de diagnostic (qualitatif)

Un test de diagnostic **qualitatif** est **valide**, si les valeurs suivantes des contrôles sont obtenues :

Nom du Contrôle	Canal de détection		
	Cy [®] 5	FAM™	JOE™
Positive Control (contrôle positif) [<i>tcdA</i> et <i>tcdB</i>]	+	+	+/-*
Contrôle négatif	-	-	+

* La présence ou l'absence d'un signal dans le canal JOE™ n'est pas pertinente pour la validité de l'essai.

10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif)

Un test de diagnostic **qualitatif** est **invalide**, (i) si l'essai n'est pas complet ou (ii) si l'ensemble des conditions de contrôle pour un test de diagnostic **valide** n'est pas obtenu.

En cas d'**invalidité** du test de diagnostic, répéter le test avec les acides nucléiques purifiés restants ou recommencer depuis l'échantillon de départ.

10.2 Interprétation des résultats

10.2.1 Analyse qualitative

Canal de détection			Interprétation des résultats
Cy [®] 5	FAM™	JOE™	
+	+	+*	<i>tcdA</i> et ADN spécifique de <i>tcdB</i> détecté.
+	-	+*	<i>tcdA</i> ADN spécifique détecté.
-	+	+*	<i>tcdB</i> ADN spécifique détecté.
-	-	+	ADN spécifique de <i>tcdA</i> ou de <i>tcdB</i> non détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ADN spécifique de <i>tcdA</i> ou de <i>tcdB</i> .
-	-	-	PCR Inhibition de la PCR ou défaillance des réactifs. Répéter le test à partir de l'échantillon d'origine ou bien prélever et tester un nouvel échantillon.

* La détection du contrôle interne dans le canal de détection JOE™ n'est pas requise pour des résultats positifs dans le canal de détection Cy[®]5 ou FAM™. De fortes charges en ADN spécifique de *tcdA* et/ou de *tcdB* dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux absents ou très faibles pour le contrôle interne.

11. Evaluation des performances

L'évaluation des performances du kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 a été effectuée au moyen d'ADN quantifié de la souche ATCC®BAA-1804™ de *Clostridium difficile* provenant de la banque American Type Culture Collection et contenant les deux cibles (toxine A [*tcdA*] et toxine B [*tcdB*]).

11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 est définie comme étant la concentration (copies/μL d'éluat) de molécules d'ADN spécifiques de *tcdA* ou de *tcdB* qui peuvent être détectées avec un taux supérieur à 95 %. La sensibilité analytique a été déterminée en analysant des dilutions en série d'une concentration quantifiée en ADN du *tcdA* et en ADN du *tcdB*.

Tableau 1: PCR résultats utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection d'ADN spécifique de *tcdA*

Conc. d'entrée [copies/μL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
100,000	24	24	100,000
31,620	24	24	100,000
10,000	24	24	100,000
3,162	24	24	100,000
1,000	24	24	100,000
0,316	24	23	95,833
0,200	24	21	87,500
0,100	24	14	58,333
0,032	24	7	29,167
0,010	24	4	16,667
0,0032	24	1	4,167

Tableau 2: PCR résultats utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection d'ADN spécifique de *tcdB*

Conc. d'entrée [copies/μL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
100,00	24	24	100,000
31,62	24	24	100,000
10,00	24	24	100,000
3,162	24	24	100,000
1,000	24	24	100,000
0,316	24	24	100,000
0,200	24	21	100,000
0,100	24	10	41,667
0,032	24	5	20,833
0,010	24	2	8,333
0,0032	24	1	4,167

La sensibilité analytique du kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 a été déterminée par analyse Probit :

- Pour la détection de l'ADN spécifique de *tcdA*, la sensibilité analytique est de 0,46 copies/μL [intervalle de confiance (CI) à 95 % : 0,28 - 0,96 copies/μL]
- Pour la détection de l'ADN spécifique de *tcdB*, la sensibilité analytique est de 0,47 copies/μL [intervalle de confiance (CI) à 95 % : 0,30 - 0,93 copies/μL]

11.2 Spécificité analytique

Réactivité

La spécificité analytique concernant la réactivité du kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 a été évaluée au moyen d'un panel d'ADN génomique extrait de souches de *C. difficile* produisant différentes toxines.

Le kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 permet de détecter et de différencier l'ADN des souches suivantes de *C. difficile* productrices de différentes toxines :

- Souche ATCC® BAA-1875™ de *Clostridium difficile* (présence de gènes *tcdB* confirmée par PCR)
- Souche ATCC® BAA-1875™ de *Clostridium difficile* (présence de gènes *tcdA* et *tcdB* confirmée par PCR)
- Souche ATCC® BAA-1801™ de *Clostridium difficile* (absence de gènes *tcdA* et *tcdB* confirmée par PCR)

Spécificité

La spécificité analytique du kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 a été évaluée en testant un panel d'ADN/ARN génomique extrait de différents pathogènes gastro-intestinaux et de la flore commensale présents dans les intestins et les selles.

Le kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 ne présente pas de réactivité croisée avec les pathogènes suivants :

- *Astrovirus*
- *Campylobacter coli*
- *Campylobacter jejuni*
- *Campylobacter lari*
- *Clostridium sordellii*
- *Cryptococcus neoformans*
- *Entamoeba histolytica*
- *Enterococcus faecalis*
- *Escherichia coli*
entérohémorragique (EHEC)
- *Escherichia coli*
- *Giardia lamblia*
- *Norovirus GI*
- *Norovirus GII*
- *Rotavirus*
- *Proteus mirabilis*
- *Proteus vulgaris*
- *Salmonella enterica*
- *Sapovirus*
- *Shigella flexneri*
- *Yersinia enterocolitica*

11.3 Précision

Les données de précision du kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 ont été déterminées comme étant la variabilité intra-essai (variabilité au sein d'une expérience), la variabilité inter-essai (variabilité entre différentes expériences) et la variabilité interlot (variabilité entre différents lots de production). La variabilité totale a été calculée en combinant les trois analyses.

La variabilité des données est exprimée en termes d'écart type et de coefficient de variation basé sur les valeurs du cycle de seuil (C_t). Au moins 6 réplicats par échantillon ont été analysés pour la variabilité intra-essai, l'inter-essai et la variabilité inter-lots.

Tableau 3: Données de précision pour la détection d'ADN spécifique de *tcdA* et *tcdB*

<i>tcdA</i> et <i>tcdB</i>		Valeurs C_t moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra- essai	<i>tcdA</i>	30,91	0,15	0,49
	<i>tcdB</i>	30,59	0,15	0,47
Variabilité inter- essai	<i>tcdA</i>	30,77	0,18	0,58
	<i>tcdB</i>	30,82	0,20	0,64
Variabilité inter- lot	<i>tcdA</i>	30,57	0,13	0,41
	<i>tcdB</i>	30,63	0,12	0,39
Variabilité totale	<i>tcdA</i>	30,68	0,12	0,39
	<i>tcdB</i>	30,75	0,21	0,68

Tableau 4: Données de précision pour la détection de l'Internal Control (contrôle interne)

Internal Control (contrôle interne)	Valeurs C _t moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	26,37	0,08	0,30
Variabilité inter-essai	26,28	0,12	0,47
Variabilité inter-lot	26,17	0,06	0,23
Variabilité totale	26,24	0,12	0,45

12. Restrictions

- Un respect strict du mode d'emploi est nécessaire pour obtenir des résultats optimaux.
- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel au bon fonctionnement de ce test. Il convient de faire preuve de la plus grande vigilance pour préserver la pureté des composants du kit et des configurations de réaction. Tous les réactifs doivent faire l'objet d'une surveillance étroite pour détecter la présence d'impuretés et toute contamination éventuelle. Tout réactif suspect doit être jeté.
- Les procédures de prélèvement des échantillons, de transport, de stockage et de traitement appropriées doivent être respectées pour un fonctionnement optimal de ce test.
- Ce test ne doit pas être utilisé directement sur les échantillons. Les méthodes appropriées d'extraction d'acides nucléiques doivent être effectuées avant d'utiliser ce test.
- La présence d'inhibiteurs de la PCR (p. ex. l'héparine) peut entraîner une ou donner des résultats faussement négatifs ou non valides.
- Les mutations potentielles dans les régions cibles du génome du *tcdAet tcdB* couvertes par les amorces et/ou les sondes utilisées dans le kit peuvent entraîner une empêcher de détecter la présence des pathogènes.

- Comme pour tout test de diagnostic, les résultats obtenus avec le kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 doivent être interprétés en tenant compte des autres constatations cliniques et résultats de laboratoire.

13. Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité de Altona Diagnostics GmbH certifié NF EN ISO 13485, chaque lot du kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 est testé sur la base de spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

14. Assistance technique

Pour bénéficier d'un service après-vente, veuillez contacter notre service d'assistance technique aux coordonnées suivantes :

e-mail: support@altona-diagnostics.com

téléphone: +49-(0)40-5480676-0

15. Bibliographie

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

16. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité

RealStar® (altona Diagnostics) ; ABI Prism® (Applied Biosystems) ; ATCC® (American Type Culture Collection) ; CFX96™ (Bio-Rad) ; Cy® (GE Healthcare) ; FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies) ; LightCycler® (Roche) ; SmartCycler® (Cepheid) ; Maxwell® (Promega) ; Mx 3005P™ (Stratagene) ; NucliSENS® , easyMag® (bioMérieux) ; Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN) ; VERSANT® (Siemens Healthcare).

Les noms déposés, les marques, etc. mentionnés dans ce document, même s'ils ne sont pas expressément désignés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés juridiquement.

Le kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 est un kit de diagnostic au marquage CE conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.

Produit non homologué auprès de Santé Canada, non approuvé par la FDA.

Produit distribué dans certains pays uniquement.

© 2019 altona Diagnostics GmbH; tous droits réservés.

17. Explications des symboles

Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Code du lot
	Couleur du capuchon
	Numéro de catalogue
	Contenu
	Numéro
	Composant
	Code article international
	Consultez le mode d'emploi
	Contenu suffisant pour « n » tests/réactions (rxns)
	Limites de température
	Date de péremption
	Fabricant
	Attention
	Note
	Version

Notes :

Notes :

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

