

Instrucciones de uso

RealStar[®]

Clostridium difficile PCR Kit 2.0

03/2019 ES

RealStar®

Clostridium difficile PCR Kit 2.0

Para utilizar con

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

Contenido

1.	Uso indicado.....	6
2.	Componentes del kit.....	6
3.	Almacenamiento	6
4.	Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados	7
5.	Información general.....	8
6.	Descripción del producto.....	9
6.1	Instrumentos de PCR en tiempo real.....	10
7.	Advertencias y precauciones	11
8.	Procedimiento	12
8.1	Preparación de las muestras	12
8.2	Configuración de Master Mix	14
8.3	Configuración de reacción	15
9.	Programación del instrumentos de PCR en tiempo real.....	16
9.1	Configuración.....	16
9.2	Detectores de fluorescencia (colorantes).....	17
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	17
10.	Análisis de datos.....	18
10.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas	18
10.1.1	Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	18
10.1.2	Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	18
10.2	Interpretación de los resultados	19
10.2.1	Análisis cualitativo.....	19
11.	Evaluación de rendimiento	19

11.1	Sensibilidad analítica	20
11.2	Especificidad analítica.....	21
11.3	Exactitud	23
12.	Limitaciones	24
13.	Control de calidad.....	25
14.	Asistencia técnica.....	25
15.	Bibliografía	25
16.	Marcas comerciales y aviso legal.....	26
17.	Explicación de los símbolos	27

1. Uso indicado

El kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 es una prueba de diagnóstico *in vitro* que se basa en tecnología PCR en tiempo real, para la detección y la diferenciación cualitativas de DNA de *Clostridium difficile* específico de toxina A (*tcdA*) y toxina B (*tcdB*).

2. Componentes del kit

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen [µl/vial]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rojo	Positive Control	1	250
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

3. Almacenamiento

- El RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deberían llegar congelados. Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con Altona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 y -15 °C tras su llegada.
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos Master (más de dos veces), ya que podría repercutir en el rendimiento de la prueba de valoración. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.
- El almacenamiento entre +2 y +8 °C no debe superar un período de dos horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

- Instrumento adecuado de PCR en tiempo real (ver capítulo 6.1, Instrumentos de PCR en tiempo real)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico adecuados (consulte el capítulo 8.1 Preparación de las muestras)
- Centrífuga de escritorio con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Centrífuga con rotor para placas de microtitulación, si se utilizan placas de reacción de 96 pocillos
- Agitador vortex
- Placas de reacción de 96 pocillos adecuadas o tubos de reacción con el material de cierre (óptico) correspondiente
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipetas con filtros (desechables)
- Guantes sin polvo (desechables)

NOTA



Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se instalen, se calibren, se comprueben y se mantengan conforme a las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

NOTA



Se recomienda encarecidamente utilizar el rotor de 72 pocillos con los tubos de reacción de 0,1 ml adecuados, si se utiliza el Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o el Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Información general

Clostridium difficile es una bacteria anaerobia formadora de esporas del género *Clostridium*. La especie está formada por una diversa estructura poblacional con cientos de tipos de cepas diferentes. Las bacterias son gram positivas con un gran genoma circular de aprox. 4,3 Mb. [1]

La bacteria a menudo se transmite por la vía fecal-oral durante la hospitalización, lo cual a menudo se debe a un aislamiento inadecuado de los pacientes infectados y a una mala rutina de higiene. Sin embargo, no todos los pacientes infectados presentan síntomas. *Clostridium difficile* puede crecer en la flora gastrointestinal sana normal, ya que otras bacterias impiden su proliferación. Tras la erradicación de la flora normal debido a la administración de antibióticos, es posible la proliferación y la colonización completa del colon. [2]

Tras colonizar el colon, las bacterias pueden producir una o dos toxinas, la toxina A y la B, las cuales provocan el efecto patógeno. La producción de estas toxinas es provocada por *percepción de quórum*. Las toxinas producidas alteran la adherencia de las células mucosas (*tcdA*) e inducen la apoptosis (*tcdB*), lo cual puede dar lugar a varias patologías que van desde diarrea leve hasta complicaciones inflamatorias que suponen un peligro de muerte, como la colitis pseudomembranosa o el megacolon tóxico. En un 1,5 % de todos los casos hospitalizados con diarrea por *Clostridium difficile* la infección es mortal, con el mayor riesgo para pacientes ancianos. [2, 3]

Se administra un tratamiento con antibióticos a los pacientes afectados y se toman medidas de apoyo para contrarrestar la deshidratación y la pérdida de electrolitos. Sin embargo, la forma de espora de *Clostridium difficile* es resistente a los antibióticos, lo cual empeora el tratamiento y puede producir síntomas recurrentes tras retirar el tratamiento con antibióticos. [2] *Clostridium difficile* es la principal causa de diarrea asociada con antibióticos y de infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria en países desarrollados, con un impacto económico elevado considerable. Dado que ha seguido creciendo el número de infecciones graves en las últimas décadas, aumenta la necesidad de una detección y un tratamiento rápidos y precisos para reducir la mortalidad, los costes médicos y para el control

de infecciones. [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. Descripción del producto

El kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 es una prueba de diagnóstico *in vitro* que se basa en tecnología PCR en tiempo real, para la detección y la diferenciación cualitativas de DNA de *Clostridium difficile* específico de toxina A (*tcdA*) y toxina B (*tcdB*).

La prueba incluye un sistema de amplificación heterólogo [Internal Control (control interno)] para identificar una posible inhibición de PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

La tecnología de PCR utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias de objetivo específicas y sondas específicas de objetivos para la detección del ADN amplificado. Las sondas se marcan con fluoróforos Reporter y Quencher.

La sonda específica para el DNA de *tcdA* se marca con el fluoróforo Cy[®]5, mientras que las sondas específicas para DNA de *tcdB* se marcan con el fluoróforo FAM[™]. La sonda específica para el control interno (IC) se marca con el fluoróforo JOE[™].

Utilizar sondas vinculadas a colorantes distinguibles permite la detección paralela

del DNA específico de *tcdA* y *tcdB*, así como la detección del Internal Control (control interno) en los canales detectores correspondientes del instrumento PCR en tiempo real.

La prueba consta de dos procesos en una sola prueba de valoración de tubo:

- Amplificación de PCR del ADN objetivo y control interno
- Detección simultánea de amplicones de PCR mediante sondas marcadas con fluoróforos

El kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 se compone de:

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

Master A y Master B contienen todos los componentes (solución amortiguadora de PCR, polimerasa de ADN, sal de magnesio, cebadores y sondas) para permitir la amplificación con mediación de PCR y la detección de DNA específico de *tcdA*, DNA específico de *tcdB* y del Internal Control (control interno) en una configuración de reacción.

6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 se desarrolló y validó para usarse con los siguientes instrumentos PCR en tiempo real:

- 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. Advertencias y precauciones

Lea las instrucciones de uso detenidamente antes de utilizar el producto.

- Antes del primer uso, compruebe lo siguiente en el producto y sus componentes:
 - Integridad
 - Si está completo en cuanto a número, tipo y relleno (ver capítulo 2. Componentes del kit)
 - Marcado correcto
 - Si está congelado al llegar
- El uso de este producto se encuentra limitado al personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y *procedimientos* de diagnóstico in vitro.
- Las deben tratarse siempre como si fueran infecciosas o biopeligrosas conforme a los procedimientos seguros de laboratorio.
- Utilice guantes protectores desechables sin polvo, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule muestras.
- Evite la contaminación microbiana y con nucleasas (DNasas/RNasas) de la muestra y de los componentes del kit.
- Utilice siempre puntas de pipetas desechables libres de DNasas/RNasas con barreras de aerosol.
- Utilice siempre guantes protectores desechables sin polvo cuando manipule los componentes del kit.
- Utilice áreas de trabajo separadas y segregadas para (i) la preparación de las muestras, (ii) la configuración de reacción y (iii) las actividades de

amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de manera unidireccional. Utilice siempre guantes desechables en cada área y cámbieselos antes de acceder a un área distinta.

- Utilice suministros y equipamiento en cada área de trabajo separada y no los mueva de un área a otra.
- Almacene el material positivo o presuntamente positivo separadamente de todos los demás componentes del kit.
- No abra los tubos o placas de reacción después de la amplificación, para evitar la contaminación con amplicones.
- Pueden realizarse pruebas a controles adicionales de acuerdo con las pautas o requisitos de las leyes locales, estatales o federales, o de organizaciones de acreditación.
- No esterilice en el autoclave los tubos de reacción después del PCR, ya que no degradará el ácido nucleico amplificado y conllevará el riesgo de contaminar la zona del laboratorio.
- No utilice componentes del kit cuya fecha de caducidad haya vencido.
- Descarte muestras y residuos de productos conforme a las regulaciones locales de seguridad.

8. Procedimiento

8.1 Preparación de las muestras

El DNA extraído es el material inicial para el kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0.

La calidad del DNA extraído tiene una repercusión fundamental en el rendimiento de todo el sistema de pruebas. Se recomienda garantizar que el sistema utilizado para la extracción de ácidos nucleicos sea compatible con la tecnología de PCR en tiempo real. Los siguientes kits y sistemas son adecuados para la extracción de ácido nucleico:

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIAasymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

También pueden resultar adecuados sistemas alternativos de extracción de ácido nucleico. La idoneidad del procedimiento de extracción de ácido nucleico para su uso con el kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 debe validarla el usuario.

Si utiliza un procedimiento de preparación de muestras basado en centrifugación (spin column, en inglés) que incluya soluciones amortiguadoras de lavado que contengan etanol, se recomienda encarecidamente seguir un paso de centrifugación adicional durante 10 minutos a aproximadamente 17 000 x g (~13 000 rpm), utilizando un tubo de recogida nuevo, antes de la elución del ácido nucleico.

PRECAUCIÓN



Si su sistema de preparación de pruebas utiliza soluciones amortiguadoras de lavado que contengan etanol, asegúrese de eliminar cualquier resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor en PCR en tiempo real.

PRECAUCIÓN



El uso de ARN portador es crucial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.

Si necesita más información o asistencia técnica en relación con el pretratamiento y la preparación de las muestras, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

8.2 Configuración de Master Mix

Todos los reactivos y muestras deben descongelarse del todo, mezclarse (pipeteando o aplicando un vortex suave) y centrifugarse brevemente antes de su uso.

El RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 contiene un control interno (IC) heterólogo, que puede utilizarse como control de inhibición de PCR o para controlar el procedimiento de preparación de muestras (extracción de ácido nucleico) y como control de inhibición de PCR.

- ▶ Si se utiliza el IC como control de inhibición de PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de las muestras, configure el Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (control interno)	1 µl	12 µl
Master Mix de volumen	21 µl	252 µl

- ▶ Si se utiliza el IC como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de PCR, añada el IC durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el IC **no debe** añadirse directamente al espécimen. El IC debe añadirse siempre a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis). El volumen del IC que debe añadirse dependerá siempre y únicamente del volumen de la elución. Representa el 10 % del volumen de la elución. Por ejemplo, si se va a eluir el ácido nucleico en 60 µl de Elution Buffer (tampón de elución) o agua, deberán añadirse 6 µl de IC por muestra a la mezcla de

espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis).

- ▶ Si se añadió IC durante el procedimiento de preparación de las muestras, configure el Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Master Mix de volumen	20 µl	240 µl

PRECAUCIÓN



Si se añadió el IC [Internal Control (control interno)] durante el procedimiento de preparación de las muestras, al menos el control negativo debe incluir el IC.

PRECAUCIÓN



Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el IC directamente al espécimen.

8.3 Configuración de reacción

- ▶ Pipetee 20 µl de la Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica adecuada de 96 pocillos o un tubo de reacción óptica adecuado.
- ▶ Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl de los controles (control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	20 µl
Muestra o control	10 µl
Volumen total	30 µl

- ▶ Asegúrese de que al menos se utilicen un control positivo y al menos un control negativo por Master Mix y por serie.
- ▶ Mezcle a fondo las mezclas y los controles con la Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre la placa de reacción de 96 pocillos con las tapas adecuadas o una película adhesiva óptica y los tubos de reacción con las tapas adecuadas.
- ▶ Centrifugue la placa de 96 pocillos en una centrifuga con un rotor de placa de microfútilos durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

9. Programación del instrumentos de PCR en tiempo real

Para ver información básica en relación con la configuración y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones de programación detalladas sobre el uso del RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 en instrumentos PCR específicos en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

9.1 Configuración

- ▶ Defina la siguiente configuración:

Configuración	
Volumen de reacción	30 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	Ninguno

9.2 Detectores de fluorescencia (colorantes)

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre de detector	Reporter	Quencher
DNA específico de <i>tcdA</i>	<i>tcdA</i>	Cy [®] 5	(Ninguno)
DNA específico de <i>tcdB</i>	<i>tcdB</i>	FAM™	(Ninguno)
Internal Control (control interno)	CI	JOE™	(Ninguno)

9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

- Defina el perfil de temperatura y la detección de fluorescencia:

	Fase	Repeti- ciones de ciclo	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Desnaturaliza- ción	Retención	1	-	95	2:00
Amplificación	Ciclo	45	-	95	0:15
			sí	58	0:45
			-	72	0:15

10. Análisis de datos

Para ver información básica en relación con el análisis de datos en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones detalladas sobre el análisis de los datos generados con el RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 en diferentes instrumentos PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

Una serie de pruebas diagnósticas **cualitativa** es **válida** si se cumplen las siguientes condiciones de control:

Id. de control	Canal de detección		
	Cy ⁵	FAM™	JOE™
Control positivo [<i>tcdA</i> y <i>tcdB</i>]	+	+	+/-*
Control negativo	-	-	+

* La presencia o ausencia de una señal en el canal JOE™ no es relevante para la validez de la serie de pruebas.

10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

Una serie de pruebas diagnósticas **cualitativa** es **no válida** (i) si la serie no se ha completado o (ii) si no se cumple cualquiera de las condiciones de control para una serie de pruebas diagnósticas **válida**.

En caso de una serie de pruebas diagnósticas **no válida**, repita las pruebas

utilizando el resto de ácidos nucleicos purificados o empiece de nuevo con las muestras originales.

10.2 Interpretación de los resultados

10.2.1 Análisis cualitativo

Canal de detección			Interpretación del resultado
Cy [®] 5	FAM™	JOE™	
+	+	+*	Se ha detectado DNA específico de <i>tcdA</i> y <i>tcdB</i> .
+	-	+*	Se ha detectado DNA específico de <i>tcdA</i> .
-	+	+*	Se ha detectado DNA específico de <i>tcdB</i> .
-	-	+	No se ha detectado DNA específico de <i>tcdA</i> ni de <i>tcdB</i> . La muestra no contiene cantidades detectables de DNA específico de <i>tcdA</i> o <i>tcdB</i> .
-	-	-	Fallo de reactivo o inhibición de PCR. Repita las pruebas con la muestra original o recoja y someta a pruebas una nueva muestra.

* La detección del Internal Control (control interno) en el canal de detección JOE™ no es necesaria para resultados positivos en los canales de detección Cy[®]5 ni FAM™. Una carga alta de DNA de *tcdA* y/o de *tcdB* en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Internal Control (control interno).

11. Evaluación de rendimiento

La evaluación de rendimiento del kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 se realizó utilizando ADN cuantificado de *Clostridium difficile*, cepa ATCC®BAA-1804™, procedente de American Type Culture, que contiene ambas dianas (toxina A (*tcdA*) y toxina B (*tcdB*)).

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 se define como la concentración (copias/μl/μl del eluido) de moléculas de DNA específico de *tcdA* o *tcdB* que pueden detectarse con un índice positivo del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de series de dilución de DNA de *tcdA* y DNA de *tcdB* cuantificados.

Tabla 1: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de DNA específico de *tcdA*

Conc. entrada [copias/μl/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
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

Tabla 2: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de DNA específico de *tcdB*

Conc. entrada [copias/μl/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
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 sensibilidad analítica del RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de DNA específico de *tcdA*, la sensibilidad analítica es de 0,46 copias/μl/μl [intervalo de confianza del 95 % (CI): 0,28 - 0,96 copias/μl/μl]
- Para la detección de DNA específico de *tcdB*, la sensibilidad analítica es de 0,47 copias/μl/μl [intervalo de confianza del 95 % (CI): 0,30 - 0,93 copias/μl/μl]

11.2 Especificidad analítica

Reactividad

La especificidad analítica con respecto a la reactividad del kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 se evaluó mediante un panel de ADN genómico extraído de cepas de *C. difficile* que producen diferentes toxinas.

El kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 puede detectar y diferenciar ADN de las siguientes cepas de *C. difficile* que producen diferentes toxinas:

- ATCC® BAA-1875™ *Clostridium difficile* (presencia de genes de *tcdB* confirmada mediante PCR)
- ATCC® BAA-1875™ *Clostridium difficile* (presencia de genes de *tcdA* y *tcdB* confirmada mediante PCR)
- ATCC® BAA-1801™ *Clostridium difficile* (ausencia de genes de *tcdA* y *tcdB* confirmada mediante PCR)

Especificidad

La especificidad analítica del kit RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 se evaluó analizando un panel de ADN/ARN genómico extraído de diferentes patógenos gastrointestinales y flora comensal hallados en el intestino y en las heces.

El RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

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

11.3 Exactitud

La precisión para el RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 se determinó como variabilidad de intratest (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad de intertest (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). La variabilidad total se calculó combinando los tres análisis.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación basados en valores de ciclo de umbral (C_T). Se analizaron al menos 6 replicados por muestra para variabilidad intratest, intertest e interlote.

Tabla 3: Datos de precisión para la detección de DNA específico de *tcdA* y *tcdB*

<i>tcdA</i> y <i>tcdB</i>		Ciclo de umbral medio (C_T)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	<i>tcdA</i>	30,91	0,15	0,49
	<i>tcdB</i>	30,59	0,15	0,47
Variabilidad intertest	<i>tcdA</i>	30,77	0,18	0,58
	<i>tcdB</i>	30,82	0,20	0,64
Variabilidad interlote	<i>tcdA</i>	30,57	0,13	0,41
	<i>tcdB</i>	30,63	0,12	0,39
Variabilidad total	<i>tcdA</i>	30,68	0,12	0,39
	<i>tcdB</i>	30,75	0,21	0,68

Tabla 4: Datos de precisión para la detección del Internal Control (control interno)

Internal Control (control interno)	Ciclo de umbral medio (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	26,37	0,08	0,30
Variabilidad intertest	26,28	0,12	0,47
Variabilidad interlote	26,17	0,06	0,23
Variabilidad total	26,24	0,12	0,45

12. Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se encuentra limitado al personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que esta prueba de valoración tenga un rendimiento adecuado. Deben extremarse las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y las configuraciones de reacción. Todos los reactivos deben supervisarse atentamente para saber si tienen impurezas y contaminación. Los reactivos sospechosos deben descartarse.
- Es necesario realizar procedimientos correctos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento para que esta prueba tenga un rendimiento óptimo.
- Esta prueba de valoración no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben llevarse a cabo métodos adecuados de extracción de ácido nucleico antes de utilizar esta prueba de valoración .
- La presencia de inhibidores de PCR (p. ej., heparina) puede provocar falsos negativos o resultados no válidos.

- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del genoma de *tcdA* y *tcdB* cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar fallos al detectar la presencia de los patógenos.
- Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

13. Control de calidad

De acuerdo con el sistema de control de calidad con certificación ISO EN 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

14. Asistencia técnica

Si necesita ayuda al cliente, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico:

E-mail: support@altona-diagnostics.com

Teléfono: +49-(0)40-5480676-0

15. Bibliografía

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

Cohen, Jonathan, Powderly, William G y Steven M Opal. Infectious Diseases, tercera edición. Mosby, 2010.

16. Marcas comerciales y aviso legal

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).

No debe considerarse que los nombres registrados, las marcas comerciales, etc., utilizados en este documento, incluso aunque no se marquen específicamente como tales, carecen de protección legal.

El RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 es un kit de diagnóstico con marcado CE conforme a la directiva europea de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC.

Producto sin licencia de Health Canada y sin autorización ni aprobación de la FDA.

No disponible en todos los países.

© altona Diagnostics GmbH 2019; reservados todos los derechos.

17. Explicación de los símbolos

Símbolo	Explicación
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de catálogo
	Contenido
	Número
	Componente
	Número mundial de artículo comercial
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para «n» pruebas/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución
	Nota
	Versión

Notas:

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

