

## Istruzioni per l'uso

**RealStar<sup>®</sup>**

**Clostridium difficile PCR Kit 2.0**

03/2019 IT



# RealStar®

## Clostridium difficile PCR Kit 2.0

Per uso 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

## Contenuto

<b>1.</b>	<b>Usò previsto .....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Componenti del kit.....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Conservazione.....</b>	<b>7</b>
<b>4.</b>	<b>Materiale e dispositivi richiesti e non forniti .....</b>	<b>8</b>
<b>5.</b>	<b>Informazioni generali .....</b>	<b>9</b>
<b>6.</b>	<b>Descrizione del prodotto .....</b>	<b>10</b>
6.1	Strumenti per PCR in tempo reale .....	12
<b>7.</b>	<b>Avvertenze e precauzioni .....</b>	<b>12</b>
<b>8.</b>	<b>Procedura .....</b>	<b>14</b>
8.1	Preparazione del campione .....	14
8.2	Preparazione della Master Mix.....	15
8.3	Preparazione della reazione .....	17
<b>9.</b>	<b>Programmazione dello strumento PCR in tempo reale .....</b>	<b>18</b>
9.1	Impostazioni .....	18
9.2	Sonde fluorescenti (coloranti) .....	18
9.3	Profilo termico e acquisizione dei coloranti .....	19
<b>10.</b>	<b>Analisi dei dati.....</b>	<b>19</b>
10.1	Validità dei test diagnostici .....	20
10.1.1	Test diagnostico valido (qualitativo) .....	20
10.1.2	Test diagnostico invalido (qualitativo).....	20
10.2	Interpretazione dei risultati .....	21
10.2.1	Analisi qualitativa .....	21
<b>11.</b>	<b>Dati di performance .....</b>	<b>21</b>

11.1	Sensibilità analitica.....	22
11.2	Specificità analitica.....	24
11.3	Precisione .....	25
<b>12.</b>	<b>Limitazioni .....</b>	<b>27</b>
<b>13.</b>	<b>Controllo di qualità .....</b>	<b>28</b>
<b>14.</b>	<b>Assistenza tecnica .....</b>	<b>28</b>
<b>15.</b>	<b>Letteratura .....</b>	<b>28</b>
<b>16.</b>	<b>Marchi e brevetti.....</b>	<b>29</b>
<b>17.</b>	<b>Spiegazione dei simboli .....</b>	<b>30</b>

## 1. Uso previsto

Il RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo e la differenziazione del DNA specifico di *tossina A (tcdA)* e *tossina B (tcdB)* di *Clostridium difficile*.

## 2. Componenti del kit

Colore coperchio	Componente	Numero di fiale	Volume [µl/fiale]
Blu	Master A	8	60
Viola	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rosso	Positive Control	1	250
Bianco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control (IC) = Controllo interno

Positive Control = Controllo positivo

Water (PCR grade) = Acqua (testata per PCR)

### 3. Conservazione

- Il RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit devono arrivare congelati. Se uno o più componenti non sono congelati al momento della ricezione o se le provette sono state danneggiate durante la spedizione, contattare Altona Diagnostics GmbH per assistenza.
- Tutti i componenti devono essere conservati tra -25°C e -15°C dopo l'arrivo.
- Evitare lo scongelamento e il congelamento ripetuti (più di due volte) dei reagenti Master, poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del test. I reagenti devono essere congelati in aliquote, in caso di utilizzo intermittente.
- La conservazione tra +2°C e +8°C non deve superare un periodo di due ore.
- Proteggere il Master A e il Master B dalla luce.

## 4. Materiale e dispositivi richiesti e non forniti

- Strumento PCR in tempo reale appropriato (vedere il capitolo 6.1 Strumenti PCR in tempo reale)
- Sistema o kit di estrazione di acidi nucleici appropriato (vedere il capitolo 8.1 Preparazione del campione)
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Centrifuga con rotore per piastre per microtitolazione, se si utilizzano piastre di reazione a 96 pozzetti
- Vortex mixer
- Piastre di reazione o provette di reazione appropriate a 96 pozzetti con materiale di chiusura (ottico) corrispondente
- Pipette (regolabili)
- Puntali con filtro (monouso)
- Guanti senza polvere (monouso)

### NOTA



*Assicurarsi che tutti gli strumenti utilizzati siano stati installati, calibrati, controllati e sottoposti a manutenzione secondo le istruzioni e le raccomandazioni del produttore.*

### NOTA



*Si consiglia di utilizzare il rotore a 72 pozzetti con le appropriate provette di reazione da 0,1 ml, se si utilizza il Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o il Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).*



## 5. Informazioni generali

*Clostridium difficile* è un batterio sporigeno, anaerobio appartenente al genere *Clostridium*. La specie è costituita da una popolazione dalla struttura varia con centinaia di diversi ceppi. Questi batteri sono gram-positivi, con un ampio genoma circolare di circa 4.3 Mb. [1]

Il batterio viene trasmesso per via oro-fecale, spesso durante il ricovero ospedaliero, e la trasmissione è dovuta a inadeguato isolamento dei pazienti infetti e cattive prassi igieniche. Tuttavia, non tutti i pazienti infetti sono sintomatici. *Clostridium difficile* non è in grado di crescere nella flora gastrointestinale normale e sana, perché la sua proliferazione viene compromessa da altri batteri. A seguito dell'eradicazione della flora intestinale normale dovuta alla somministrazione di antibiotici è possibile un eccesso di crescita e la piena colonizzazione del colon. [2]

Dopo la colonizzazione, i batteri possono produrre due tipi di tossine, la tossina A oppure la tossina B, che causano l'effetto patogeno. La produzione di tossine viene scatenata dal *quorum sensing*. Le tossine prodotte danneggiano l'adesione delle cellule mucosali (*tcdA*) e inducono l'apoptosi (*tcdB*), il che può portare a diverse patologie che vanno dalla diarrea lieve a complicazioni infiammatorie potenzialmente fatali come la colite pseudomembranosa o il megacolon tossico. Nell'1,5 % di tutti i casi ricoverati con diarrea da *Clostridium difficile*, l'infezione è fatale; il rischio più alto è nei pazienti anziani. [2, 3]

I pazienti colpiti sono trattati con terapia antibiotica e misure di supporto per combattere la disidratazione e la perdita di elettroliti. Tuttavia, la spora di *Clostridium difficile* è resistente agli antibiotici, e ciò aggrava il trattamento e può portare a recidiva dei sintomi dopo l'interruzione del trattamento antibiotico. [2] Il *Clostridium difficile* è una delle cause principali di diarrea associata agli antibiotici e di infezioni nosocomiali nei paesi sviluppati, con un impatto economico considerevolmente elevato. Dato che il numero di infezioni gravi è continuato a crescere nel corso degli ultimi decenni, aumenta la necessità di un rilevamento e trattamento rapido e accurato della patologia, al fine di ridurre la mortalità e i costi sanitari e di controllare le infezioni. [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 e 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. Descrizione del prodotto

Il RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo e la differenziazione del DNA specifico di *tossina A (tcdA)* e *tossina B (tcdB)* di *Clostridium difficile*.

Il test include un sistema di amplificazione eterologa (controllo interno) per identificare la possibile inibizione della PCR e per confermare l'integrità dei reagenti del kit.

La tecnologia PCR in tempo reale utilizza la reazione a catena della polimerasi (PCR) per l'amplificazione di sequenze target specifiche e sonde target specifiche per la rilevazione del DNA amplificato. Le sonde sono marcate con un reporter fluorescente (fluoroforo) ed un quencher.

Le sonde specifiche per il DNA di *tcdA* sono marcate con il fluoroforo Cy<sup>®</sup>5 mentre le sonde specifiche per il DNA di *tcdB* sono marcate con il fluoroforo FAM<sup>™</sup>. La sonda specifica per il controllo interno (IC) è marcata con il fluoroforo JOE<sup>™</sup>.

L'uso di sonde collegate a coloranti distinguibili consente il rilevamento in parallelo del DNA specifico di *tcdA* e *tcdB*, nonché il rilevamento del controllo interno nei corrispondenti canali di rivelazione dello strumento PCR in tempo reale.

Il test comprende due processi in un'unica provetta:

- Amplificazione per PCR del DNA target e del controllo interno
- Rilevamento simultaneo di ampliconi da PCR mediante sonde marcate con colorante fluorescente

Il RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 è composto da:

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

Internal Control = Controllo interno

Positive Control = Controllo positivo

Water (PCR grade) = Acqua (testata per PCR)

Master A e Master B contengono tutti i componenti (tampone per PCR, DNA polimerasi, sali di magnesio, primers e sonde) per consentire l'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento del DNA specifico di *tcdA*, *tcdB* e del controllo interno in una singola reazione.

## 6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti strumenti di PCR in tempo reale:

- 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. Avvertenze e precauzioni

*Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di utilizzare il prodotto.*

- Prima del primo utilizzo, controllare il prodotto e i suoi componenti per:
  - Integrità
  - Completezza rispetto a numero, tipo e riempimento (vedere il capitolo 2. Componenti del kit)
  - Etichette corrette
  - Congelamento all'arrivo
- L'utilizzo di questo prodotto è limitato al personale appositamente istruito e addestrato nelle tecniche di PCR in tempo reale e procedure diagnostiche *in vitro*.
- I campioni devono essere sempre trattati come infettivi e/o pericolosi secondo le procedure di laboratorio sicure.

- Indossare guanti protettivi monouso senza polvere, un camice da laboratorio e una protezione per gli occhi durante la manipolazione dei campioni.
- Evitare la contaminazione microbica e nucleasica (DNasi/RNasi) dei campioni e dei componenti del kit.
- Utilizzare sempre puntali per pipette monouso privi di DNasi/RNasi.
- Indossare sempre guanti protettivi usa e getta senza polvere quando si maneggiano i componenti del kit.
- Utilizzare aree di lavoro separate e isolate per (i) preparazione del campione, (ii) impostazione della reazione e (iii) attività di amplificazione/rilevazione. Il flusso di lavoro in laboratorio dovrebbe procedere in modo unidirezionale. Indossare sempre guanti monouso in ogni area e cambiarli prima di entrare in un'altra area.
- Dedicare materiali di consumo e attrezzature alle aree di lavoro separate e non spostarle da un'area all'altra.
- Conservare il materiale positivo e/o potenzialmente positivo separato da tutti gli altri componenti del kit.
- Non aprire le provette/piastre di reazione dopo l'amplificazione, per evitare contaminazione con ampliconi.
- Controlli aggiuntivi possono essere testati secondo le linee guida o i requisiti delle normative locali, statali e/o federali o delle organizzazioni di accreditamento.
- Non sterilizzare in autoclave le provette dopo la PCR, poiché ciò non distrugge gli acidi nucleici amplificati e rischierà di contaminare l'area di laboratorio.
- Non utilizzare componenti del kit che hanno superato la data di scadenza.
- Eliminare i rifiuti dei campioni e del test in base alle normative di sicurezza locali.

## 8. Procedura

### 8.1 Preparazione del campione

Il DNA estratto è il materiale di partenza per il RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0.

La qualità dell'DNA estratto ha un profondo impatto sulle prestazioni dell'intero sistema di test. È necessario garantire che il sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico sia compatibile con la tecnologia PCR in tempo reale. I seguenti kit e sistemi sono adatti indicati per l'estrazione dell'acido nucleico:

- 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)

Potrebbero anche essere appropriati sistemi e kit di estrazione di acidi nucleici alternativi. L'idoneità della procedura di estrazione dell'acido nucleico per l'uso con RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 deve essere convalidata dall'utente.

Se si utilizza una procedura di preparazione del campione basata su colonna di centrifugazione che include tamponi di lavaggio contenenti etanolo, si consiglia di effettuare un'ulteriore fase di centrifugazione per 10 minuti a circa 17000 x g (~ 13000 rpm), usando una nuova provetta di raccolta, prima dell'eluizione dell'acido nucleico.

**ATTENZIONE**



*Se il sistema di preparazione dei campioni utilizza tamponi di lavaggio contenenti etanolo, assicurarsi di eliminare eventuali tracce di etanolo prima dell'eluizione dell'acido nucleico. L'etanolo è un forte inibitore della PCR in tempo reale.*

**ATTENZIONE**



*L'uso dell'RNA carrier è fondamentale per l'efficienza di estrazione e la stabilità dell'acido nucleico estratto.*

Per ricevere ulteriori informazioni e assistenza tecnica riguardanti pre-trattamento e preparazione dei campioni contattare il nostro servizio di assistenza tecnica (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

## 8.2 Preparazione della Master Mix

Tutti i reagenti e i campioni devono essere completamente scongelati, miscelati (mediante pipettaggio o passaggio delicato su un agitatore vortex) e centrifugati brevemente prima dell'uso.

Il RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 contiene un controllo interno (IC) eterologo, che può essere utilizzato o come controllo di inibizione della PCR o come controllo della procedura di preparazione del campione (estrazione dell'acido nucleico) e come controllo di inibizione della PCR.

- ▶ Se l'IC viene utilizzato come controllo di inibizione della PCR, ma non come controllo della procedura di preparazione del campione, impostare la Master Mix secondo il seguente schema:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Controllo interno	1 µl	12 µl
<b>Volume Master Mix</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

- ▶ Se l'IC viene utilizzato come controllo per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere l'IC durante la procedura di estrazione dell'acido nucleico.
- ▶ Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, l'IC **non deve** essere aggiunto direttamente al campione. L'IC deve essere sempre aggiunto alla miscela campione/tampone di lisi. Il volume dell'IC da aggiungere dipende sempre e soltanto dal volume di eluizione. Rappresenta il 10% del volume di eluizione. Ad esempio, se l'acido nucleico deve essere eluito in 60 µl di tampone di eluizione o acqua, devono essere aggiunti 6 µl di IC per campione nella miscela campione/tampone di lisi.
- ▶ Se l'IC è stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, preparare la Master Mix secondo il seguente schema:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
<b>Volume Master Mix</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

#### ATTENZIONE



*Se l'IC (controllo interno) è stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, almeno il controllo negativo deve includere l'IC.*



**ATTENZIONE**

*Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, non aggiungere mai l'IC direttamente al campione.*

### 8.3 Preparazione della reazione

- ▶ Pipettare 20 µl di Master Mix in ciascuno dei pozzetti richiesti di un'appropriata piastra di reazione ottica a 96 pozzetti o di un'appropriata provetta di reazione ottica.
- ▶ Aggiungere 10 µl di campione (eluato dall'estrazione dell'acido nucleico) o 10 µl del controllo (controllo positivo o negativo).

Preparazione della reazione	
Master Mix	20 µl
Campione o controllo	10 µl
<b>Volume totale</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ Assicurarsi che almeno un controllo positivo e almeno un controllo negativo siano utilizzati per ogni Master Mix e esecuzione del saggio.
- ▶ Miscelare accuratamente i campioni e i controlli con la Master Mix pipettando su e giù.
- ▶ Chiudere la piastra di reazione a 96 pozzetti con tappi o pellicola adesiva ottica adeguati e le provette di reazione con tappi appropriati.
- ▶ Centrifugare la piastra di reazione a 96 pozzetti in una centrifuga con rotore per piastra di microtitolazione per 30 secondi a circa 1000 x g (~ 3000 rpm).

## 9. Programmazione dello strumento PCR in tempo reale

Per informazioni di base sull'impostazione e la programmazione dei diversi strumenti PCR in tempo reale, consultare il manuale utente del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sulla programmazione dell'utilizzo del RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 su specifici strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

### 9.1 Impostazioni

- Definire i seguenti parametri:

Impostazioni	
Volume di reazione	30 µl
Velocità di rampa	Predefinito
Riferimento passivo	Nessuno

### 9.2 Sonde fluorescenti (coloranti)

- Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

Target	Nome sonda	Reporter	Quencher
DNA specifico di <i>tcdA</i>	<i>tcdA</i>	Cy <sup>®</sup> 5	(Nessuno)
DNA specifico di <i>tcdB</i>	<i>tcdB</i>	FAM <sup>™</sup>	(Nessuno)
Controllo interno	IC	JOE <sup>™</sup>	(Nessuno)

### 9.3 Profilo termico e acquisizione dei coloranti

- Impostare il profilo della temperatura e l'acquisizione del colorante:

	Fase	Ripetizioni del ciclo	Acquisizione	Temperatura [°C]	Durata [min:sec]
Denaturazione	Mantenimento	1	-	95	02:00
Amplificazione	Ciclaggio	45	-	95	00:15
			sì	58	00:45
			-	72	00:15

## 10. Analisi dei dati

Per informazioni di base sull'analisi dei dati su specifici strumenti PCR in tempo reale, consultare il manuale utente del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sull'analisi dei dati generati con RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 su diversi strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

## 10.1 Validità dei test diagnostici

### 10.1.1 Test diagnostico valido (qualitativo)

Un test diagnostico **qualitativo** è **valido** se sono soddisfatte le seguenti condizioni di controllo:

Controllo	Canale		
	Cy <sup>5</sup>	FAM™	JOE™
Controllo positivo [ <i>tcdA</i> e <i>tcdB</i> ]	+	+	+/-*
Controllo negativo	-	-	+

\* La presenza o l'assenza di un segnale nel canale JOE™ non è rilevante per la validità dell'esecuzione del test.

### 10.1.2 Test diagnostico invalido (qualitativo)

Un test diagnostico **qualitativo non è valido**, (i) se l'esecuzione non è stata completata o (ii) se una delle condizioni di controllo per un test diagnostico **valido** non è soddisfatta.

In caso di test diagnostici **non validi** ripetere i test utilizzando gli acidi nucleici purificati rimanenti o ricominciare dai campioni originali.

## 10.2 Interpretazione dei risultati

### 10.2.1 Analisi qualitativa

Canale			Interpretazione dei risultati
Cy <sup>®</sup> 5	FAM <sup>™</sup>	JOE <sup>™</sup>	
+	+	+*	Rilevato DNA specifico di <i>tcdA</i> e <i>tcdB</i> .
+	-	+*	Rilevato DNA specifico di <i>tcdA</i> .
-	+	+*	Rilevato DNA specifico di <i>tcdB</i> .
-	-	+	Non è stato rilevato DNA specifico né di <i>tcdA</i> né di <i>tcdB</i> . Il campione non contiene quantità rilevabili di DNA specifico di <i>tcdA</i> o <i>tcdB</i> .
-	-	-	Inibizione della PCR o guasto del reagente. Ripetere i test dal campione originale o raccogliere e testare un nuovo campione.

\* Il rilevamento del controllo interno nel canale di rilevamento JOE<sup>™</sup> non è necessario in caso di risultati positivi nel canale di rilevamento Cy<sup>®</sup>5 o nel canale di rilevamento FAM<sup>™</sup>. Un elevato carico di DNA di *tcdA* e/o *tcdB* nel campione può portare a segnali del controllo interno ridotti o assenti.

## 11. Dati di performance

La valutazione delle prestazioni del RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 è stata effettuata usando DNA quantificato di ceppo ATCC® BAA-1804<sup>™</sup> di *Clostridium difficile* dall'American Type Culture contenente entrambi i target (tossina A (*tcdA*) e tossina B (*tcdB*)).

## 11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 è definita come la concentrazione (copie/μl dell'eluato) di molecole di DNA specifico di *tcdA* o *tcdB* che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La sensibilità analitica è stata determinata dall'analisi delle diluizioni seriali di DNA *tcdA* quantificato e *tcdB* quantificato.

**Tab. 1:** Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di *tcdA*

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
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

**Tab. 2:** Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di *tcdB*

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
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 sensibilità analitica del RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 è stata determinata dall'analisi Probit:

- Per il rilevamento di DNA specifico di *tcdA*, la sensibilità analitica è di 0,46 copie/μl [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,28 - 0,96 copie/μl]
- Per il rilevamento di DNA specifico di *tcdB*, la sensibilità analitica è di 0,47 copie/μl [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,30 - 0,93 copie/μl]

## 11.2 Specificità analitica

### Reattività

La specificità analitica relativa alla reattività del RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 è stata valutata da un pannello di DNA genomico estratto da ceppi di *C. difficile* che producono tossine differenti.

Il RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 è in grado di rilevare e differenziare il DNA dei seguenti ceppi di *C. difficile* che producono tossine differenti:

- ATCC® BAA-1875™ *Clostridium difficile* (presenza di geni tcdB confermata con PCR)
- ATCC® BAA-1875™ *Clostridium difficile* (presenza di geni tcdA e tcdB confermata con PCR)
- ATCC® BAA-1801™ *Clostridium difficile* (assenza di geni tcdA e tcdB confermata con PCR)

### Specificità

La specificità analitica di RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 è stata valutata analizzando un pannello di RNA/DNA genomico estratto da differenti patogeni gastrointestinali e flora commensale presente nell'intestino e nelle feci.



Il RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 non ha reagito in modo incrociato con nessuno dei seguenti patogeni:

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

### 11.3 Precisione

La precisione del RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 è stata determinata come variabilità intra-dosaggio (variabilità all'interno di un esperimento), variabilità inter-dosaggio (variabilità tra esperimenti diversi) e variabilità inter-lotto (variabilità tra lotti di produzione diversi). La variabilità totale è stata calcolata combinando le tre analisi.

I dati di variabilità sono espressi in termini di deviazione standard e coefficiente di variazione sulla base dei valori del ciclo soglia ( $C_t$ ). Almeno 6 replicati per campione sono stati analizzati per la variabilità intra-dosaggio, inter-dosaggio e inter-lotto.

**Tab. 3:** Dati di precisione per il rilevamento di DNA specifico di *tcdA* e *tcdB*

<i>tcdA</i> e <i>tcdB</i>		Ciclo soglia medio (C <sub>t</sub> )	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	<i>tcdA</i>	30,91	0,15	0,49
	<i>tcdB</i>	30,59	0,15	0,47
Variabilità inter-dosaggio	<i>tcdA</i>	30,77	0,18	0,58
	<i>tcdB</i>	30,82	0,20	0,64
Variabilità inter-lotto	<i>tcdA</i>	30,57	0,13	0,41
	<i>tcdB</i>	30,63	0,12	0,39
Variabilità totale	<i>tcdA</i>	30,68	0,12	0,39
	<i>tcdB</i>	30,75	0,21	0,68

**Tab. 4:** Dati di precisione per il rilevamento del controllo interno

Controllo interno	Ciclo soglia medio (C <sub>t</sub> )	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	26,37	0,08	0,30
Variabilità inter-dosaggio	26,28	0,12	0,47
Variabilità inter-lotto	26,17	0,06	0,23
Variabilità totale	26,24	0,12	0,45

## 12. Limitazioni

- Per risultati ottimali è richiesta la rigorosa osservanza delle istruzioni per l'uso.
- L'utilizzo di questo prodotto è limitato al personale appositamente istruito e addestrato nelle tecniche di PCR in tempo reale e procedure diagnostiche *in vitro*.
- La buona pratica di laboratorio è essenziale per la corretta esecuzione di questo test. È necessario prestare la massima attenzione per preservare la purezza dei componenti del kit e le impostazioni di reazione. Tutti i reagenti devono essere attentamente monitorati per impurità e contaminazione. Eventuali reagenti sospetti devono essere eliminati.
- Per l'esecuzione ottimale di questo test sono necessarie adeguate procedure di raccolta, trasporto, conservazione ed elaborazione dei campioni.
- Questo test non deve essere utilizzato direttamente sul campione. Prima di utilizzare questo test, devono essere condotti appropriati metodi di estrazione dell'acido nucleico.
- La presenza di inibitori della PCR (ad es. eparina) può causare risultati falsi negativi o non validi.
- Le potenziali mutazioni all'interno delle regioni target del genoma *tcdA* e *tcdB* coperte dai primer e/o dalle sonde utilizzate nel kit possono causare una il mancato rilevamento della presenza dei patogeni.
- Come con qualsiasi test diagnostico, i risultati del RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 devono essere interpretati in considerazione di tutti i risultati clinici e di laboratorio.

### 13. Controllo di qualità

In conformità con il sistema di gestione della qualità certificato ISO EN 13485 di Altona Diagnostics GmbH, ogni lotto di RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 è testato in base a specifiche prestabilite per garantire una qualità costante del prodotto.

### 14. Assistenza tecnica

Per l'assistenza ai clienti, si prega di contattare il nostro supporto tecnico:

**e-mail:** [support@altona-diagnostics.com](mailto:support@altona-diagnostics.com)

**telefono:** +49-(0)40-5480676-0

### 15. Letteratura

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise e 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. Marchi e brevetti

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).

Nomi registrati, marchi, ecc. utilizzati in questo documento, anche se non specificamente contrassegnati come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.

















Il RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 è un kit diagnostico marcato CE secondo la direttiva diagnostica *in vitro* europea 98/79/CE.

Prodotto non concesso in licenza con Health Canada e non approvato o autorizzato dalla FDA.

Non disponibile in tutti i Paesi.

© 2019 altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.

## 17. Spiegazione dei simboli

Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>
	Lotto
	Colore del tappo
	Numero di catalogo
	Indice
	Numero
	Componente
	Global Trade Identification Number
	Istruzioni per l'uso
	Contiene sufficienti per "n" test / reazioni (rxns)
	Limite di temperatura
	Da usare entro
	Fornitore
	Attenzione
	Note
	Versione

**Note:**

**Note:**



**Note:**

**Note:**



**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](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

