



RIDA[®] GENE CD Toxin A/B

REF PG0825



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



Deutsch	3
English.....	21
Español.....	39
Français.....	57
Italiano	75

RIDA[®] GENE CD Toxin A/B

REF PG0825

1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA[®]GENE CD Toxin A/B ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis der *Clostridium difficile* Toxin-Gene A (tcdA) und B (tcdB) aus humanen Stuhl- und Kulturproben. Die RIDA[®]GENE CD Toxin A/B real-time PCR soll die Diagnose einer *Clostridium difficile* assoziierten Diarrhoe (CDAD) unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Die Erstbeschreibung von *Clostridium difficile*, eines gram-positiven sporenbildenden anaeroben Bakteriums, erfolgte 1935 durch Hall und O'Toole, die die Darmflora gesunder Säuglinge untersuchten.¹ Erst in den späten 1970er Jahren wurde *Clostridium difficile* als Erreger der Antibiotika-assoziierten Diarrhoe sowie der pseudomembranösen Kolitis identifiziert.² Heute ist *Clostridium difficile* einer der häufigsten Erreger der nosokomialen Diarrhoe.

Clostridium difficile ist die Hauptursache bei 15 - 25% aller Patienten mit Antibiotika-assoziierten Diarrhoe und bei fast allen Patienten mit pseudomembranöser Kolitis.³ Prädisponierende Risikofaktoren für eine *Clostridium difficile* assoziierte Diarrhoe sind z.B. Antibiotikatherapie, Alter des Patienten, sowie Länge und Anzahl der Krankenhausaufenthalte. Zunehmend erkranken aber auch nicht Antibiotika-therapierte und nicht hospitalisierte Patienten an einer *Clostridium difficile*-Infektion. Die Krankheitssymptome reichen von leichten Durchfällen über Darmentzündungen unterschiedlicher Schwere bis hin zur pseudomembranösen Kolitis, der schwersten Form der Antibiotika-assoziierten Diarrhoe. Die klinische Symptomatik wird durch toxische Stämme von *Clostridium difficile*, die das Toxin A und Toxin B produzieren, hervorgerufen. In den letzten Jahren stiegen Anzahl und Schwere der Erkrankungen weltweit an.⁴

Die real-time PCR liefert schnell hochsensitive und spezifische Patientenergebnisse bei Verdacht auf eine CDAD. Dies ermöglicht eine schnelle spezifische Behandlung von CDAD-Patienten und die Einleitung von Hygienemaßnahmen.

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE CD Toxin A/B ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis der *Clostridium difficile* Toxin-Gene A (tcdA) / B (tcdB) in humanen Stuhl- und Kulturproben.

Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von Toxin A und Toxin B (tcdA/tcdB) amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die **Taq-Polymerase** den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA[®]GENE CD Toxin A/B Test enthält eine **Internal Control DNA** (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab.1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu **20 Mal** beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA® GENE CD Toxin A/B multiplex real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

Tab. 2: Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy®MAG™
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) bei Verwendung des LightCycler® 2.0
- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-freies Wasser)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Test die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen, wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die DNA-Präparation aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen die Stuhlproben vor der Extraktion 1:3 mit Wasser zu verdünnen, stark zu vortexen und 30 sec bei 1000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA[®] GENE CD Toxin A/B Test enthält eine Internal Control DNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control DNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control DNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der Internal Control DNA dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die Internal Control DNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control DNA während der Extraktion eingesetzt werden. Die Internal Control DNA soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

8.2 DNA-Präparation aus Kulturproben

Für die DNA-Präparation aus Kulturproben wird folgende Extraktionsmethode empfohlen: Für die Kulturproben 1 ml PCR-Wasser in ein Präparationsröhrchen vorlegen. Mit einer Impföse mehrere Kolonien sammeln und im vorgelegten PCR-Wasser suspendieren. Den Stab der Impföse abbrechen oder abschneiden. Das Präparationsröhrchen dicht verschließen und 60 sec stark vortexen. Danach im Heizblock für 10 min bei 95°C unter Schütteln erhitzen. Anschließend 1 min bei 13.000 x g zentrifugieren und den Überstand als Probe einsetzen.

Hinweis: Bei starker Trübung den Zentrifugationsschritt ggf. wiederholen.

Der RIDA®GENE CD Toxin A/B Test enthält eine Internal Control DNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control DNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control DNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der ICD dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die Internal Control DNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control DNA während der Extraktion eingesetzt werden. Die Internal Control DNA soll dem Proben-PCR-Wasser-Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control DNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix,	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: Je 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.**

Proben: Je 5 µl DNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.**

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 DNA real-time PCR-Profil

Tab. 5: DNA real-time PCR-Profil für LightCycler® Serie und Rotor-Gene Q

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: DNA real-time PCR-Profil für Mx3005P, ABI 7500 und CFX96™

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.3.2 Universal real-time PCR-Profil

Hinweis: Das Universal real-time PCR Profil für DNA Tests sollte nur verwendet werden, wenn RIDA® GENE DNA und RIDA® GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

Tab. 7: Universal real-time PCR-Profil für LightCycler® Serie

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 8: Universal real-time PCR-Profil für Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 9: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 2.0	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	530	RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) wird benötigt
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	533/580	
ABI 7500	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICD	Yellow	
Bio-Rad CFX96™	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	-
	ICD	VIC	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 10, Abb. 1).

Die Positive Control liegt für *Clostridium difficile* Toxin A/B in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

Tab. 10: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * ¹	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

*¹ Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Wenn die Positivkontrolle in dem angegebenen Ct-Bereich nicht detektiert wird, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

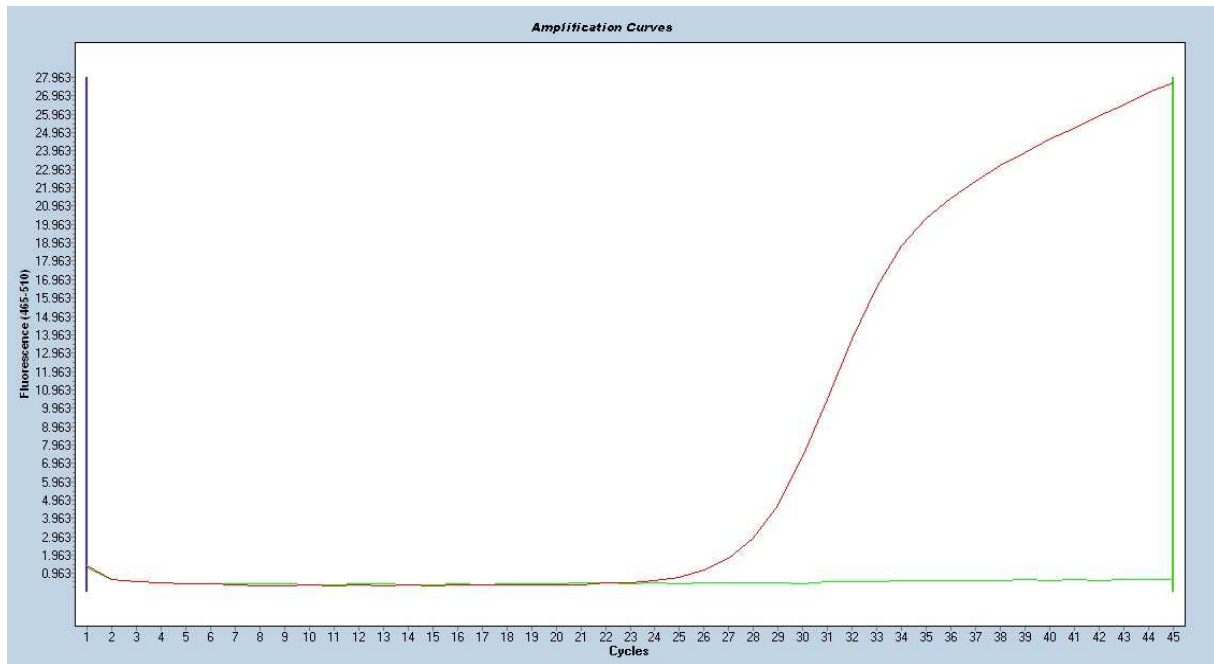


Abb.1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (*Clostridium difficile* Toxin-Gene A/B) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

Tab. 11: Interpretation der Ergebnisse

Zielgene	ICD	Ergebnis
<i>C. difficile</i> Toxin-Gene A/B		
positiv	positiv/negativ	<i>C. difficile</i> Toxin-Gene A/B nachweisbar
negativ	positiv	Zielgen nicht nachweisbar
negativ	negativ	Ungültig

Clostridium difficile Toxin A/B ist nachweisbar, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control DNA** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

Clostridium difficile Toxin A/B ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation, jedoch keine Amplifikation für die **Internal Control DNA** im Nachweissystem zeigt. Der Nachweis der **Internal Control DNA** ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der internen Amplifikationskontrolle führen können.

Clostridium difficile Toxin A/B ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation, aber die **Internal Control DNA** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der **Internal Control DNA** ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control DNA** im Nachweissystem keine Amplifikation zeigt. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für humane Stuhl- und Kulturproben validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA[®]GENE CD Toxin A/B zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die *Clostridium difficile* Toxin-Gene A/B (*tcdA/tcdB*) vorhanden sind.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Der RIDA[®] GENE CD Toxin A/B multiplex real-time PCR Test hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA-Kopien/ Reaktion für *C. difficile* Toxin A/B.

Die folgende Abbildung 2 zeigt eine Verdünnungsreihe von *C. difficile* Toxin-Genen A/B (10^5 - 10^1 DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II.

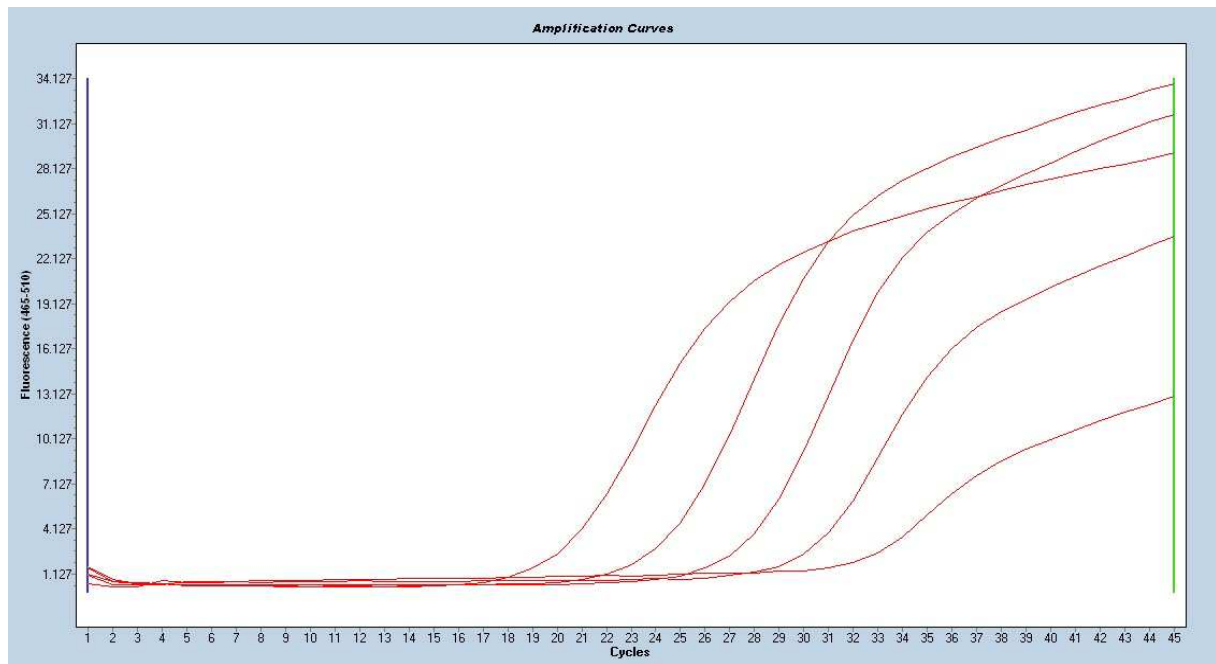


Abb. 2: Verdünnungsreihe *C. difficile* Toxin-Genen A/B (10^5 – 10^1 DNA Kopien / μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, DNA-Extraktion und DNA-Gehalt.

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE CD Toxin A/B multiplex real-time PCR ist spezifisch für *Clostridium difficile* in humanen Stuhlproben. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 12):

Tab. 12: Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>Clostridium bifermentas</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Norovirus GGI	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Norovirus GGII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium sordelli</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Astrovirus	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Rotavirus	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>E.coli</i> (O157:H7)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E.coli</i> (O26:H-)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E.coli</i> (O6)	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland1	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-		

13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des RIDA® GENE CD Toxin A/B multiplex real-time PCR Tests wurde mit *Clostridium difficile* untersucht (s. Tab. 13). Die getesteten *Clostridium difficile* Stämme wurden mit dem RIDA® CD Toxin A/B multiplex real-time PCR Test nachgewiesen.

Tab. 13 Analytische Reaktivitätstestung

<i>Clostridium difficile</i>					
<i>C. difficile</i> Ribotyp 001	+	<i>C. difficile</i> Ribotyp 023	+	<i>C. difficile</i> Ribotyp 075	+
<i>C. difficile</i> Ribotyp 002	+	<i>C. difficile</i> Ribotyp 027	+	<i>C. difficile</i> Ribotyp 078	+
<i>C. difficile</i> Ribotyp 012	+	<i>C. difficile</i> Ribotyp 046	+	<i>C. difficile</i> Ribotyp 0126	+
<i>C. difficile</i> Ribotyp 017	+	<i>C. difficile</i> Ribotyp 056	+	<i>C. difficile</i> Ribotyp 0131	+
<i>C. difficile</i> Ribotyp 020	+				
<i>C. difficile</i> toxinotype 0	+	<i>C. difficile</i> toxinotype X	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXI	+
<i>C. difficile</i> toxinotype I	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIa	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype II	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIb	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXIV	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IIIa	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIc	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXV	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IIIb	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIId	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXVI	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IIIc	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXVII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IV	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXVIII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype V	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIVa	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXIX	+
<i>C. difficile</i> toxinotype VI	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIVb	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXX	+
<i>C. difficile</i> toxinotype VII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XVI	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXXI	+
<i>C. difficile</i> toxinotype VIII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XVII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXXII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IXa	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XVIII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXXIII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IXb	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIX	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXXIV	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IXc	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XX	+		

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2013-01-29	Freigabeversion
2018-05-22	Generelle Überarbeitung
2018-05-22	4. Packungsinhalt 5. Reagenzien und ihre Lagerung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 13. Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

16. Literatur

1. Hall IC and O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935, 49: 390–402.
2. Bartlett JG, et al. Antibiotica-associated pseudomembranous colitis due to a toxin-producing clostridia. *N Engl J Med*, 1978; 298:531-543.
3. Bartlett JG and Gerding DN. Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *CID* 2008, 46: S12-18.
4. Bartlett JG. Narrative Review: The new Epidemic of *Clostridium difficile*-Associated Enteric Disease. *Ann Intern Med* 2006; 145:758-764.

RIDA[®]GENE CD Toxin A/B

REF PG0825

1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. RIDA[®]GENE CD Toxin A/B is a real-time PCR for the direct, qualitative detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) genes from human stool samples and culture. The RIDA[®]GENE CD Toxin A/B real-time PCR is intended for use as an aid in diagnosis of *Clostridium difficile* associated diarrhea (CDAD).

2. Summary and explanation of the test

Clostridium difficile, a gram-positive, spore-forming anaerobic bacterium was first described in 1935 by Hall and O'Toole as a component of the intestinal microflora in healthy neonates.¹ In the late 1970s, however, *Clostridium difficile* was identified as the cause of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis.² Today *Clostridium difficile* is one of the most common causes of nosocomial diarrhea. *Clostridium difficile* is responsible for 15 - 25% of antibiotic-associated diarrhea and nearly all cases of pseudomembranous colitis.³ The predisposing risk factors for CDAD are for example antibiotic exposure, advanced age as well as number and duration of hospitalization. However, *Clostridium difficile* infection is also seen in an increasing number of non-antibiotic-treated and non-hospitalized individuals. The symptoms range from mild diarrhea to intestinal infections of variable severity, including pseudomembranous colitis, the most severe form of antibiotic-induced inflammatory bowel disease. Clinically symptomatic cases are caused by toxigenic *Clostridium difficile* strains that produce toxin A and toxin B. In recent years the incidence and severity of *Clostridium difficile* infections increased worldwide.⁴ Real-time PCR permits a rapid, highly sensitive and specific detection of *Clostridium difficile* infection. An early and reliable diagnosis of *Clostridium difficile* infection makes it possible to administer specific treatment of CDAD patients and also to initiate hygiene measures to prevent nosocomial transmission.

3. Test principle

RIDA[®]GENE CD Toxin A/B multiplex real-time PCR is for the direct, qualitative detection of *Clostridium difficile* toxin genes A (tcdA) / toxin B (tcdB) in human stool and culture samples.

After DNA isolation, amplification of the gene fragments specific for toxin A and B of *Clostridium difficile* (if present) occurs. The amplified DNA targets are detected with hydrolysis probes, which are labeled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the presence of a target the probes hybridize to the amplicons. During the extension step the **Taq-Polymerase** breaks the reporter-quencher proximity. The reporter emits a fluorescent signal which is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescence signal increases with the amount of formed amplicons. The RIDA[®]GENE CD Toxin A/B assay contains an **Internal Control DNA** (ICD) as an internal control of sample preparation procedure and/or to determine possible PCR inhibition.

4. Reagents provided

Tab. 1: Reagents provided (Reagents provided in the kit are sufficient for 100 determinations)

Kit Code	Reagent	Amount		Lid Color
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	yellow
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	red
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	white
P	Positive Control	1x	200 µl	blue

5. Storage instructions

- Protect all reagents from light and store at -20 °C. All reagents can be used until the expiration date. After expiry the quality guarantee is no longer valid.
- Carefully thaw reagents before using (e.g. in a refrigerator at 2 - 8 °C).
- Reagents can sustain up to **20 freeze/thaw cycles** without influencing the assay performance (e.g. after the first thawing separate it in aliquots and freeze immediately).
- During PCR preparation all the reagents should be stored cold in an appropriate way (2 - 8 °C).

6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA[®]GENE CD Toxin A/B multiplex real-time PCR assay is suitable for use with following extraction platforms and real-time PCR instruments:

Tab. 2: Necessary equipment

Extraction platform	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
bioMérieux	NucliSENS easy [®] MAG [™]
Real-time PCR instrument:	
Roche	LightCycler [®] 2.0, LightCycler [®] 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Note: Only use 0.1 ml tubes on the Rotor-Gene Q (QIAGEN).

If you want to use other extraction platforms or real-time PCR instruments please contact R-Biopharm at mdx@r-biopharm.de.

- RIDA[®]GENE Color Compensation II (PG0002) for use with the LightCycler[®] 2.0
- RIDA[®]GENE Color Compensation IV (PG0004) for use with the LightCycler[®] 480II
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foil)
- Centrifuge with a rotor for the reaction vials
- Vortexer
- Pipettes (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves
- PCR water (BioScience grade, nuclease-free water)

7. Precautions for users

For *in-vitro* diagnostic use.

This test must only be carried out by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories have to be followed. The instruction manual for the test procedure has to be followed. Do not pipet samples or reagents by mouth. Avoid contact with bruised skin or mucosal membranes. During handling reagents or samples, wear appropriate safety clothing (appropriate gloves, lab coat, safety goggles) and wash your hands after finishing the test procedure. Do not smoke, eat or drink in areas where samples or reagents are being used.

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.

All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulations for disposal.

For more details see Safety Data Sheets (SDS) at www.r-biopharm.com.

8. Collection and storage of samples

8.1 Sample preparation from stool samples

For DNA isolation of human stool samples, use a commercially available DNA isolation kit (e.g. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) or DNA extraction system (e.g. Maxwell[®] RSC (Promega)). Extract DNA according to the manufacturer's instructions.

We recommend to dilute the stool samples before extraction 1:3 with water. Vortex the diluted stool sample intensely and centrifuge at 1000 x g for 30 sec. Use from the supernatant the appropriate volume according to the manufacturer's instruction.

The RIDA[®]GENE CD Toxin A/B assay contains an **Internal Control DNA** that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The **Internal Control DNA** can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the **Internal Control DNA** is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the **Internal Control DNA** should be added to the Master-Mix (see Tab.4).

If the **Internal Control DNA** is used as an extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, 20 µl of the **Internal Control DNA** has to be added during extraction procedure. The **Internal Control DNA** should always be added to the specimen-lysis buffer mixture

and must **not** be added directly to the specimen. We also recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the negative control and positive control PCR Mix.

8.2 Sample preparation from cultures

For DNA isolation from culture the following procedure is recommended: Add 1 ml PCR water into a preparation tube. Collect colonies with an inoculation loop and suspend them in the prepared PCR water. Cut or break the inoculation loop stem. Cap the preparation tube tightly and vortex strongly for 60 seconds. Heat and shake the preparation tube at 95 °C for 10 min in a heating block. Centrifuge for 1 min at 13.000 x g and apply the supernatant as sample.

Note: Repeat the centrifugation step in case of strong turbidity (if necessary).

The RIDA[®]GENE CD Toxin A/B assay contains an **Internal Control DNA** that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The **Internal Control DNA** can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the **Internal Control DNA** is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the **Internal Control DNA** should be added to the Master-Mix (see Tab.4).

If the **Internal Control DNA** is used as an extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, 20 µl of the **Internal Control DNA** has to be added during extraction procedure. The **Internal Control DNA** should always be added to the specimen-PCR water mixture and must **not** be added directly to the specimen. We also recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the negative control and positive control PCR Mix.

9. Test procedure

9.1 Master-Mix preparation

Calculate the total number of PCR reactions (sample and control reactions) needed. One positive control and one negative control must be included in each assay run.

We recommend calculating an additional volume of 10% to compensate imprecise pipetting (see Tab. 3, Tab. 4). Thaw, mix gently and briefly centrifuge the **Reaction Mix**, the **Taq-Polymerase**, the **Positive Control**, the **No Template Control** and the **Internal Control DNA** before using. Keep reagents appropriately cold during working step (2 - 8 °C).

Tab. 3: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix (ICD as extraction and PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

Tab. 4: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix (ICD only as PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
D	Internal Control DNA	1.0 µl	11 µl
	Total	21.0 µl	231.0 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

9.2 Preparation of the PCR-Mix

Pipette 20 µl of the Master-Mix in each reaction vial (tube or plate).

Negative control: Add 5 µl **No Template Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

Note: If the **Internal Control DNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the PCR-Mix of the negative control.

Sample: Add 5 µl DNA extract to the pre-pipetted Master-Mix.

Positive control: Add 5 µl **Positive Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

Note: If the **Internal Control DNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the PCR-Mix of the positive control.

Cover tubes or plate. Spin down and place in the real-time PCR instrument. The PCR reaction should be started according to the PCR instrument set-up (Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 PCR instrument set-up

9.3.1 DNA real-time PCR profile

Tab. 5: DNA real-time PCR profile for LightCycler® series and Rotor-Gene Q

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

Tab. 6: DNA real-time PCR profile for Mx3005P, ABI 7500 and CFX96™

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

9.3.2 Universal real-time PCR profile

Note: The universal real-time PCR profile should only be used for DNA assays when combining RIDA® GENE DNA and RNA real-time PCR assays in one run.

Tab. 7: Universal real-time PCR profile for LightCycler® series

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

Tab. 8: Universal real-time PCR profile for Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q and CFX96™

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

9.4 Detection channel set-up

Tab. 9: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR instrument	Detection	Detection channel	Note
Roche LightCycler® 2.0	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	530	RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) is required
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	ICD	533/580	
ABI 7500	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	Check that passive reference option ROX is none
	ICD	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	Check that reference dye is none
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	Green	The gain settings have to be set to 5, according to the default settings
	ICD	Yellow	
Bio-Rad CFX96™	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	-
	ICD	VIC	

10. Quality control

The analysis of the samples is done by the software of the used real-time PCR instrument according to the manufacturer`s instructions. Positive control and negative control have to show correct results (see Table 10, Fig. 1) in order to determine a valid run.

The Positive Control CD Toxin A/B has a concentration of 10^3 copies/ μ l. In each PCR run it is used in a total amount of 5×10^3 copies.

Tab. 10: For a valid run, the following conditions must be met:

Sample	Assay result	ICD Ct	Target Ct
Positive control	Positive	NA ^{*1}	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Ct > 20	0

^{*1} No Ct value is required for the ICR to make a positive call for the positive control.

If the positive control is not positive within the specified Ct range but the negative control is valid, prepare all new reactions including the controls.

If the negative control is not negative but the positive control is valid, prepare all new reactions including the controls.

If the required criteria are not met, following items have to be checked before repeating the test:

- Expiry of the used reagents
- Functionality of the used instrumentation
- Correct performance of the test procedure

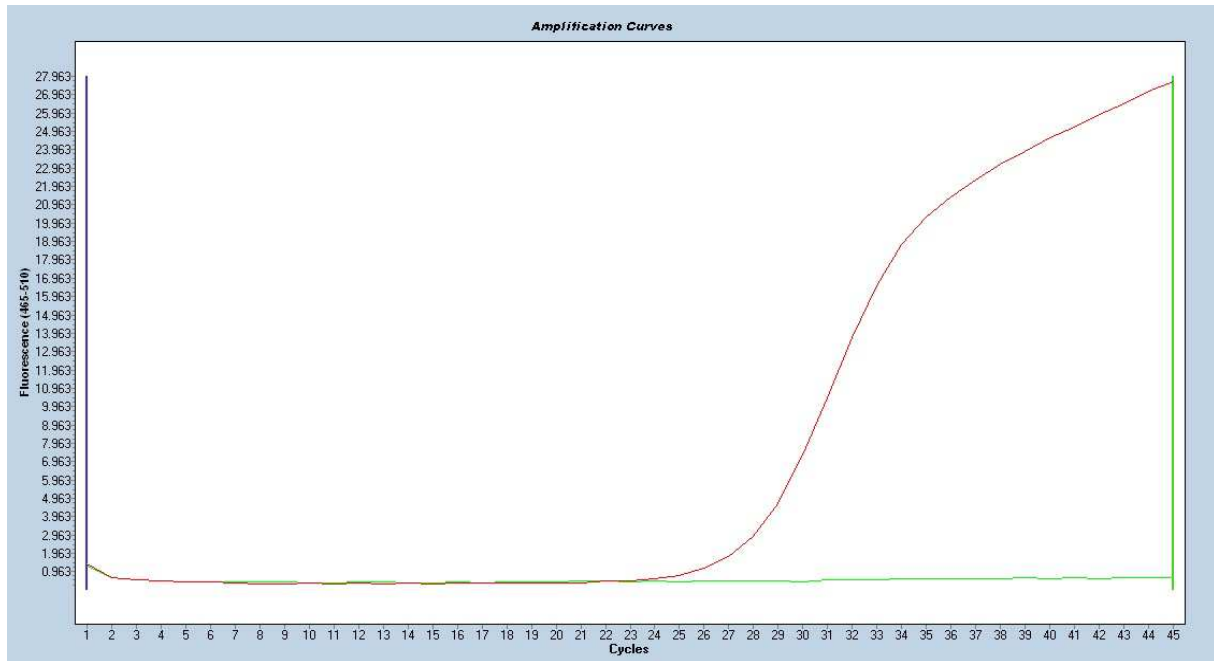


Fig. 1: Correct run of the positive and negative control (*C. difficile* toxin genes A/B) on the LightCycler® 480II

11. Result interpretation

The result interpretation is done according to Table 11.

Tab. 11: Sample interpretation

Target genes		
<i>C. difficile</i> toxin genes A/B	ICD	Result
positive	positive/negative	<i>C. difficile</i> toxin genes A/B detected
negative	positive	Target genes not detected
negative	negative	Invalid

C. difficile toxin genes A/B are detected, if the sample DNA and the **Internal Control DNA** show an amplification signal in the detection system.

C. difficile toxin genes A/B are also detected, if the sample DNA shows an amplification signal but none for the **Internal Control DNA** in the detection system. The detection of the internal amplification control is not necessary because high concentrations of the amplicon can cause a weak or absent signal of the **Internal Control DNA**.

C. difficile toxin genes A/B are not detected, if the sample DNA shows no amplification signal, but an amplification signal for the **Internal Control DNA** in the

detection system. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the detection of the **Internal Control DNA**.

A sample is invalid, if the sample DNA and **Internal Control DNA** show no amplification signal in the detection system. The sample contains a PCR inhibitor or a failure occurred in the extraction procedure. The extracted sample needs to be further diluted with PCR water (1:10) and re-amplified, or the isolation and purification of the sample has to be improved.

12. Limitations of the method

1. The result of molecular analysis should not lead to the diagnosis, but always be considered in the context of medical history and symptoms of the patient.
2. This assay is only validated for stool and culture samples.
3. Inappropriate specimen collection, transport, storage and processing or a pathogen load in the specimen below the analytical sensitivity can result in false negative results.
4. The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
5. Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new variants resulting in a false negative result with the RIDA[®]GENE CD Toxin A/B assay.
6. As with all PCR based *in vitro* diagnostic tests, extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
7. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. However, a positive result is indicative for the presence of the *C. difficile* toxin A/B genes (tcdA/tcdB).

13. Performance characteristics

13.1 Analytical sensitivity

The RIDA[®] GENE CD Toxin A/B multiplex real-time PCR assay has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction.

The following figure 2 shows a dilution series of *C. difficile* toxin genes A/B (each $10^5 - 10^1$ DNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II.

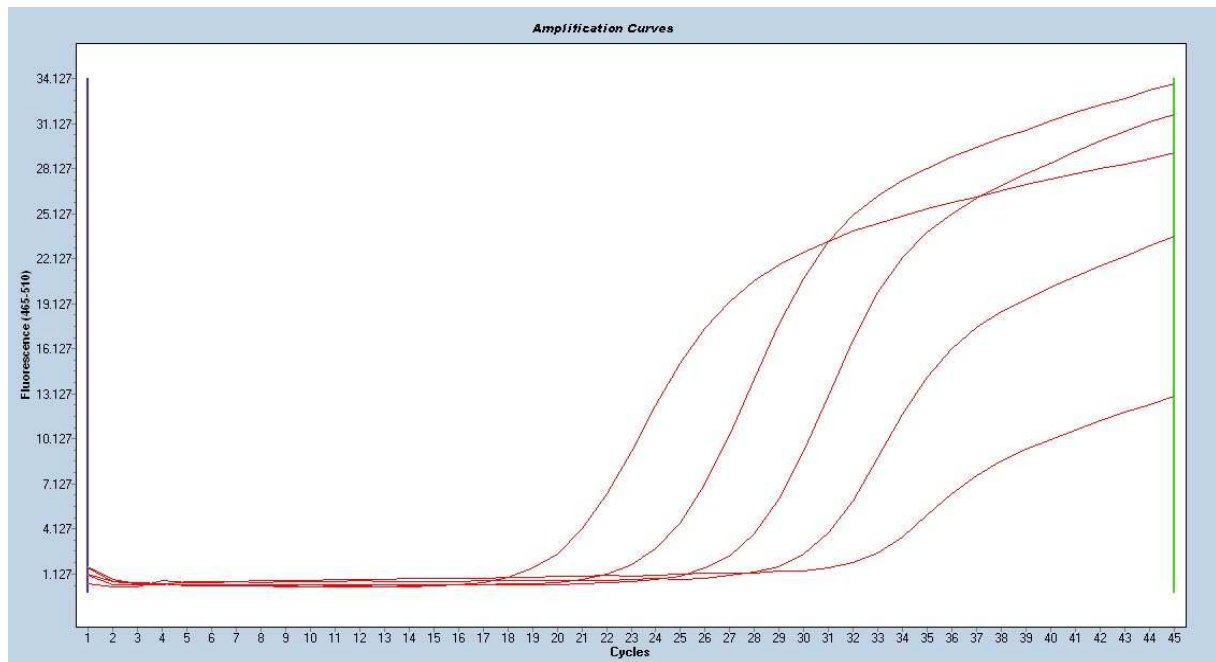


Fig. 2: Dilution series *C. difficile* toxin A/B genes ($10^5 - 10^1$ DNA copies / μl) on the LightCycler[®] 480II

The detection limit of the whole procedure depends on the sample matrix, DNA extraction and DNA concentration.

13.2 Analytical specificity

The RIDA® GENE CD Toxin A/B multiplex real-time PCR is specific for *Clostridium difficile* in human stool samples. No cross-reaction could be detected for the following species (see Tab.12):

Tab. 12: Cross-reactivity testing

Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Norovirus GI	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Norovirus GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium sordelli</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Astrovirus	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Rotavirus	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>E.coli</i> (O157:H7)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E.coli</i> (O26:H-)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E.coli</i> (O6)	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland1	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-		

13.3 Analytical reactivity

The reactivity of the RIDA[®] GENE CD Toxin A/B multiplex real-time PCR assay was tested with *Clostridium difficile* (see Tab. 13). All *Clostridium difficile* strains tested were detected by the RIDA[®] GENE CD Toxin A/B multiplex real-time PCR assay or by sequence alignment.

Tab. 13: Analytical reactivity testing










<i>Clostridium difficile</i>					
<i>C. difficile</i> ribotype 001	+	<i>C. difficile</i> ribotype 023	+	<i>C. difficile</i> ribotype 075	+
<i>C. difficile</i> ribotype 002	+	<i>C. difficile</i> ribotype 027	+	<i>C. difficile</i> ribotype 078	+
<i>C. difficile</i> ribotype 012	+	<i>C. difficile</i> ribotype 046	+	<i>C. difficile</i> ribotype 0126	+
<i>C. difficile</i> ribotype 017	+	<i>C. difficile</i> ribotype 056	+	<i>C. difficile</i> ribotype 0131	+
<i>C. difficile</i> ribotype 020	+				
<i>C. difficile</i> toxinotype 0	+	<i>C. difficile</i> toxinotype X	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXI	+
<i>C. difficile</i> toxinotype I	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIa	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype II	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIb	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXIV	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IIIa	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIc	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXV	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IIIb	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIId	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXVI	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IIIc	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXVII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IV	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXVIII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype V	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIVa	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXIX	+
<i>C. difficile</i> toxinotype VI	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIVb	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXX	+
<i>C. difficile</i> toxinotype VII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XVI	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXXI	+
<i>C. difficile</i> toxinotype VIII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XVII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXXII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IXa	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XVIII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXXIII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IXb	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIX	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXXIV	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IXc	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XX	+		

14. Version history

Version number	Chapter and designation
2013-01-29	Release version
2018-05-22	General revision
2018-05-22	4. Reagents provided 5. Storage instructions 6. Additional necessary reagents and necessary equipment 8. Collection and storage of samples 9. Test procedure 10. Quality control 13. Performance characteristics 14. Version history 15. Explanation of symbols

15. Explanation of symbols

General symbols

	For in vitro diagnostic use
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

Testspecific symbols

Not applicable

16. Literature

1. Hall IC and O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935, 49: 390–402.
2. Bartlett JG, et al. Antibiotica-associated pseudomembranous colitis due to a toxin-producing clostridia. *N Engl J Med*, 1978; 298:531-543.
3. Bartlett JG and Gerding DN. Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *CID* 2008, 46: S12-18.
4. Bartlett JG. Narrative Review: The new Epidemic of *Clostridium difficile*-Associated Enteric Disease. *Ann Intern Med* 2006; 145:758-764.

RIDA[®]GENE CD Toxin A/B

REF PG0825

1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA[®]GENE CD Toxin A/B es una prueba de PCR en tiempo real para la detección directa y cualitativa de los genes de la toxina A (tcdA) y la toxina B (tcdB) de *Clostridium difficile* en cultivos muestras de heces humanas. La prueba de PCR en tiempo real RIDA[®]GENE CD Toxin A/B puede usarse como una ayuda para el diagnóstico de la diarrea asociada con *Clostridium difficile* (DACD).

2. Resumen y descripción del ensayo

Clostridium difficile, una bacteria anaerobia grampositiva formadora de esporas, fue descrita por primera vez en 1935 por Hall y O'Toole como un componente de la microflora intestinal de neonatos sanos.¹ Sin embargo, a finales de la década de los 70 se identificó a *Clostridium difficile* como la causa de la diarrea asociada con el uso de antibióticos y la colitis pseudomembranosa.² En la actualidad, *Clostridium difficile* es una de las causas más comunes de diarrea hospitalaria.

Clostridium difficile es responsable del 15 % al 25 % de los casos de diarrea asociada con el uso de antibióticos y de casi todos los casos de colitis pseudomembranosa.³ Los factores de riesgo que predisponen a la DACD son, por ejemplo, la exposición a antibióticos, la edad avanzada, la cantidad de hospitalizaciones y su duración. Sin embargo, también se observa infección por *Clostridium difficile* en un número cada vez mayor de personas no hospitalizadas y no tratadas con antibióticos.

Los síntomas van desde diarrea leve hasta infecciones intestinales de diversa gravedad, incluida la colitis pseudomembranosa, la forma más grave de enfermedad inflamatoria intestinal inducida por antibióticos. Los casos clínicamente sintomáticos son causados por cepas toxigénicas de *Clostridium difficile* que producen toxina A y toxina B. En los últimos años, la incidencia y la gravedad de las infecciones por *Clostridium difficile* han aumentado en todo el mundo.⁴

La PCR en tiempo real permite la detección rápida y con alta sensibilidad y especificidad de la infección por *Clostridium difficile*. Un diagnóstico temprano y confiable de la infección por *Clostridium difficile* permite administrar un tratamiento específico para los pacientes con DACD y también iniciar medidas de higiene para evitar la transmisión hospitalaria.

3. Principio del ensayo

RIDA® GENE CD Toxin A/B es una prueba de PCR multiplex en tiempo real para la detección directa y cualitativa de los genes de la toxina A (tcdA) y la toxina B (tcdB) de *Clostridium difficile* en cultivos y muestras de heces humanas.

Después del aislamiento del ADN, se lleva a cabo la amplificación de los fragmentos génicos específicos de las toxinas A y B de *Clostridium difficile* (si están presentes). Las dianas de ADN amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA® GENE CD Toxin A/B contiene un **Internal Control DNA** (ICD) como control interno del procedimiento de preparación de la muestra o para determinar la posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarilla
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	roja
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	blanca
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos de la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de vencimiento. Después de la fecha de vencimiento, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado los reactivos antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta **20 ciclos de congelación/descongelación** sin que esto afecte a la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente dividir en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de manera adecuada (2 - 8 °C).

6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE CD Toxin A/B es adecuado para usarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipamiento necesario

Plataforma de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy®MAG™
Equipo de PCR en tiempo real:	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) para uso con el LightCycler® 2.0

- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II

- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)

- Centrífuga y rotor para los viales de reacción

- Agitador vórtex

- Pipetas (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)

- Puntas con filtro

- Guantes desechables sin talco

- Agua para PCR (agua de grado BioScience, sin nucleasas)

7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Seguir las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba. No pipetear muestras ni reactivos con la boca. Evitar el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, llevar ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lavarse las manos al finalizar la ejecución de la prueba. No fumar, comer ni beber en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.

- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilizar el kit después de la fecha de vencimiento.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consultar las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consultar la hoja de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de las muestras a partir de muestras de heces

Para el aislamiento del ADN a partir de muestras de heces humanas, use un kit de aislamiento de ADN (como RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell[®] RSC (Promega)) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se recomienda diluir las muestras de heces 1:3 con agua antes de la extracción. Agite intensamente en un mezclador vórtex la muestra de heces diluida y centrifúguela a 1000 x g durante 30 segundos. Use el volumen adecuado de sobrenadante según las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA[®] GENE CD Toxin A/B contiene un Internal Control DNA que detecta la inhibición de la PCR, monitoriza la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El Internal Control DNA puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el Internal Control DNA se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl del Internal Control DNA a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

8.2 Preparación de la muestra a partir de cultivos

Para aislar el ADN a partir de un cultivo se recomienda el procedimiento siguiente: Agregue 1 ml de agua para PCR a un tubo de preparación. Coseche las colonias con un asa de inoculación y suspéndalas en el agua para PCR preparada. Corte o rompa el vástago del asa de inoculación. Tape bien el tubo de preparación y agítelo en un mezclador vórtex a alta velocidad durante 60 segundos. Caliente y agite el tubo de preparación a 95 °C durante 10 min en un bloque calefactor. Centrifugue durante 1 min a 13 000 x g y aplique el sobrenadante como muestra.

Nota: Si la muestra está muy turbia, repita el paso de centrifugación (si es necesario).

El ensayo RIDA[®]GENE CD Toxin A/B contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitoriza la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control DNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl del **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de muestra-agua para PCR y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10% de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3, 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control DNA** antes de utilizarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 - 8 °C) durante el paso de trabajo.

Tabla 3: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

Tabla 4: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de inhibición de la PCR únicamente)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

9.2 Preparación de la mezcla para PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

Control negativo: Añada 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo.

Muestra: Añada 5 µl de extracto de ADN a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Añada 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control positivo.

Tape los tubos o la placa. Centrifúguelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6, 7, 8).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil de ADN por PCR en tiempo real para los equipos serie LightCycler® y Rotor-Gene Q

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 6: Perfil de PCR en tiempo real del ADN para Mx3005P, ABI 7500 y CFX96™

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

Nota: El perfil universal por PCR en tiempo real se debe usar en los ensayos de ADN solo cuando se combinan en una corrida los ensayos de ADN y ARN RIDA®GENE por PCR en tiempo real.

Tabla 7: Perfil universal por PCR en tiempo real en el equipo LightCycler®

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 8: Perfil universal por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q y CFX96™

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 9: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 2.0	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	530	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	465/510	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
ABI 7500	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna)
	ICD	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno)
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada
	ICD	Amarillo	
Bio-Rad CFX96™	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	-
	ICD	VIC	

10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real utilizado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivo y negativo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 10, figura 1) para determinar que un ensayo es válido.

El **Positive Control** de las toxinas A/B de CD tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de 5×10^3 copias.

Tabla 10: Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	NA ^{*1}	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

^{*1} No se requiere un valor de Ct del ICR para determinar que el control positivo es positivo.

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de vencimiento de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

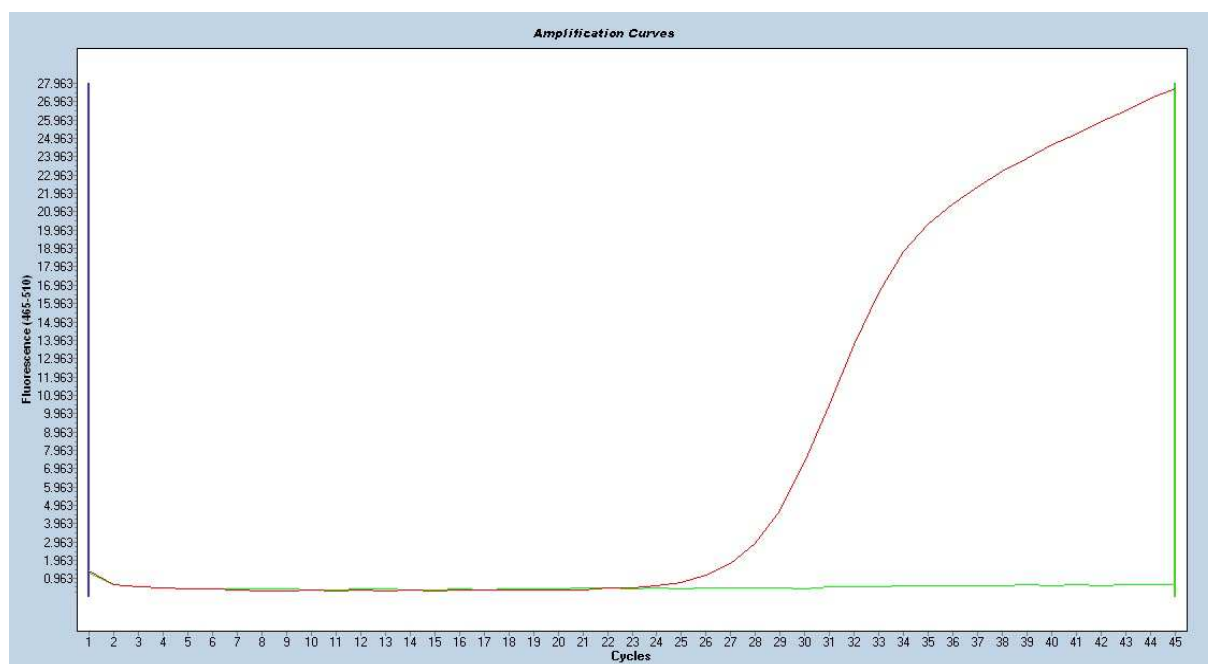


Fig. 1: Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (genes de las toxinas A/B de *C. difficile*) en el LightCycler® 480II

11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 11.

Tabla 11: Interpretación de las muestras

Genes diana		
Genes de las toxinas A/B de <i>C. difficile</i>	ICD	Resultado
positivo	positivo/negativo	Genes de las toxinas A/B de <i>C. difficile</i> detectados
negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	No válido

Los genes de las toxinas A/B de *C. difficile* se detectan si el ADN de la muestra y el **Internal Control DNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

Los genes de las toxinas A/B de *C. difficile* también se detectan si hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero no del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La detección del control de amplificación interno no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del **Internal Control DNA** sea débil o esté ausente.

Los genes de las toxinas A/B de *C. difficile* no se detectan si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero hay señal de amplificación del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del ADN del **Internal Control DNA**.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra y del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR o se produjo un fallo en el procedimiento de extracción. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo está validado para muestras de heces y cultivos.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar a la detección de nuevas variantes, y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA[®] GENE CD Toxin A/B.
6. Como ocurre con todas las pruebas diagnósticas de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LoD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo de la prueba no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia de los genes de las toxinas A/B de *C. difficile* (tcdA/tcdB).

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE CD Toxin A/B tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de ADN por reacción.

En la figura 2, a continuación, se muestra una dilución seriada de los genes de las toxinas A/B de *C. difficile* (en cada caso, $10^5 - 10^1$ copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II.

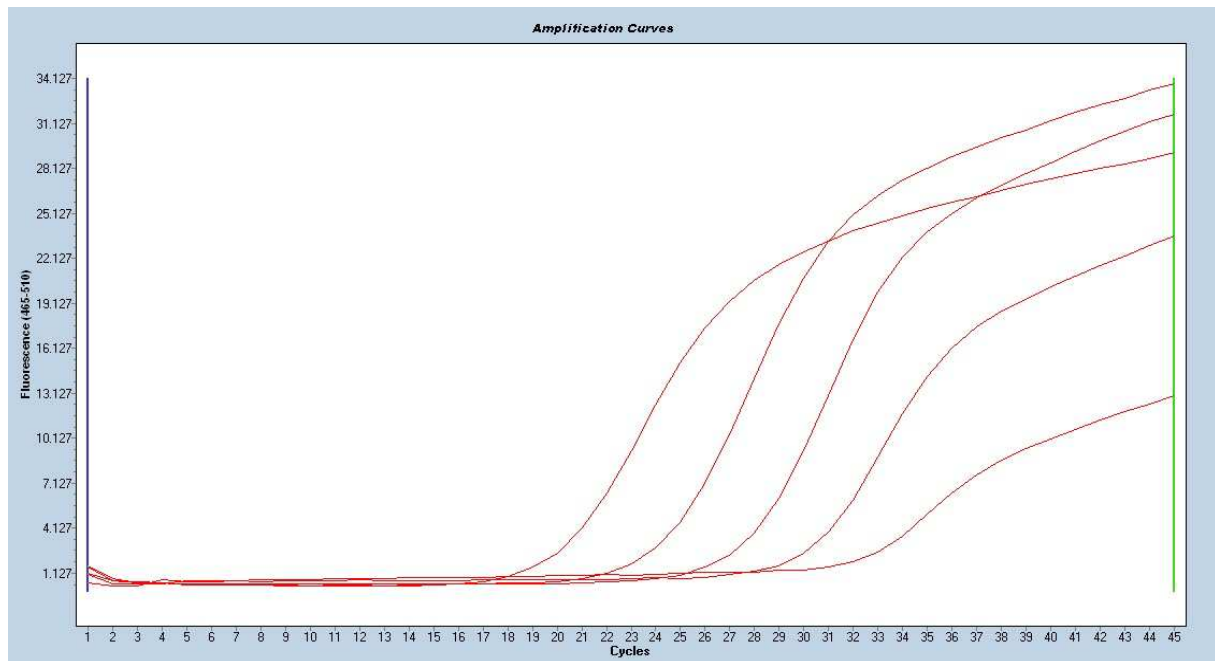


Fig. 2: Dilución seriada de los genes de las toxinas A/B de *C. difficile* ($10^5 - 10^1$ copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ADN y la concentración del ADN.

13.2 Especificidad analítica

La prueba de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE CD Toxin A/B es específica para *Clostridium difficile* en muestras de heces humanas. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 12):

Tabla 12: Pruebas de reactividad cruzada

Adenovirus 1, humano, cepa Adenoid 71	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Norovirus GI	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Norovirus GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium sordelli</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Astrovirus	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Rotavirus	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>E.coli</i> (O157:H7)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E.coli</i> (O26:H-)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E.coli</i> (O6)	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland1	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB clon 6	-		

13.3 Sensibilidad analítica

La reactividad del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE CD Toxin A/B se evaluó con *Clostridium difficile* (consulte la tabla 13). Todas las cepas de *Clostridium difficile* evaluadas se detectaron con el ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE CD Toxin A/B o por alineación de secuencias.

Tabla 13: Pruebas de reactividad analítica










<i>Clostridium difficile</i>					
<i>C. difficile</i> ribotipo 001	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 023	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 075	+
<i>C. difficile</i> ribotipo 002	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 027	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 078	+
<i>C. difficile</i> ribotipo 012	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 046	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 0126	+
<i>C. difficile</i> ribotipo 017	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 056	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 0131	+
<i>C. difficile</i> ribotipo 020	+				
<i>C. difficile</i> toxinotipo 0	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo X	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XXI	+
<i>C. difficile</i> toxinotipo I	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XIa	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XXII	+
<i>C. difficile</i> toxinotipo II	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XIb	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XXIV	+
<i>C. difficile</i> toxinotipo IIIa	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XIc	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XXV	+
<i>C. difficile</i> toxinotipo IIIb	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XI d	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XXVI	+
<i>C. difficile</i> toxinotipo IIIc	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XII	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XXVII	+
<i>C. difficile</i> toxinotipo IV	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XIII	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XXVIII	+
<i>C. difficile</i> toxinotipo V	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XIVa	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XXIX	+
<i>C. difficile</i> toxinotipo VI	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XIVb	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XXX	+
<i>C. difficile</i> toxinotipo VII	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XVI	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XXXI	+
<i>C. difficile</i> toxinotipo VIII	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XVII	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XXXII	+
<i>C. difficile</i> toxinotipo IXa	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XVIII	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XXXIII	+
<i>C. difficile</i> toxinotipo IXb	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XIX	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XXXIV	+
<i>C. difficile</i> toxinotipo IXc	+	<i>C. difficile</i> toxinotipo XX	+		

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
29/01/2013	Versión de lanzamiento
22/05/2018	Revisión general
22/05/2018	4. Reactivos suministrados 5. Instrucciones de almacenamiento 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 8. Obtención y almacenamiento de muestras 9. Ejecución de la prueba 10. Control de calidad 13. Características de rendimiento 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Referencias bibliográficas

1. Hall IC and O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935, 49: 390–402.
2. Bartlett JG, et al. Antibiotica-associated pseudomembranous colitis due to a toxin-producing clostridia. *N Engl J Med*, 1978; 298:531-543.
3. Bartlett JG and Gerding DN. Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *CID* 2008, 46: S12-18.
4. Bartlett JG. Narrative Review: The new Epidemic of *Clostridium difficile*-Associated Enteric Disease. *Ann Intern Med* 2006; 145:758-764.

RIDA[®] GENE CD Toxin A/B

REF PG0825

1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA[®] GENE CD Toxin A/B est un test de PCR en temps réel pour la détection qualitative directe des gènes des toxines A (tcdA) et B (tcdB) de *Clostridium difficile* dans les échantillons de selles humaines et cultures. Le test de PCR en temps réel RIDA[®] GENE CD Toxin A/B est destiné à faciliter le diagnostic de la diarrhée associée à *Clostridium difficile* (CDAD).

2. Résumé et explication du test

Clostridium difficile, bactérie anaérobie, à Gram positif, génératrice de spores fut décrite pour la première fois en 1935 par Hall et O'Toole comme un composant de la microflore intestinale des nourrissons sains¹. Cependant, vers la fin des années 1970, *Clostridium difficile* fut identifiée comme étant une cause de diarrhée associée aux antibiotiques et de la colite pseudo-membraneuse². De nos jours, *Clostridium difficile* est l'une des causes les plus courantes de diarrhée nosocomiale.

Clostridium difficile est responsable de 15 à 25 % des cas de diarrhée associée aux antibiotiques et de quasiment tous les cas de colite pseudo-membraneuse³. Les facteurs de risque de la CDAD sont, par exemple, l'exposition aux antibiotiques, l'âge avancé et le nombre et la durée des hospitalisations. Cependant, les infections par *Clostridium difficile* surviennent aussi chez un nombre croissant de personnes non traitées par antibiotiques et non hospitalisées.

Les symptômes vont d'une légère diarrhée à des infections intestinales de sévérité variable, notamment la colite pseudo-membraneuse, forme la plus grave de maladie intestinale induite par les antibiotiques. Les cas cliniquement symptomatiques sont provoqués par des souches toxigènes de *Clostridium difficile* qui produisent la toxine A et la toxine B. Ces dernières années, l'incidence et la sévérité des infections par *Clostridium difficile* ont augmenté dans le monde entier.⁴

La PCR en temps réel permet une détection rapide, hautement sensible et spécifique des infections par *Clostridium difficile*. Un diagnostic précoce et fiable d'une infection par *Clostridium difficile* permet l'administration d'un traitement spécifique aux patients atteints de CDAD et la prise de mesures d'hygiène pour prévenir la transmission nosocomiale.

3. Principe du test

Le test RIDA®GENE CD Toxin A/B est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe des gènes des toxines A (tcdA) et B (tcdB) de *Clostridium difficile* dans les échantillons et cultures de selles humaines.

Après isolation de l'ADN, on procède à l'amplification des fragments de gène spécifiques aux toxines A et B de *Clostridium difficile* (si présentes). Les cibles d'ADN amplifiées sont détectées grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons. Pendant l'étape d'extension, la [Taq-Polymerase] rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA®GENE CD Toxin A/B contient un [Internal Control DNA] (ICD) en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et/ou pour déterminer une éventuelle inhibition de la PCR.

4. Contenu du paquet

Tableau 1 : Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	[Reaction Mix]	2x	1050 µl	jaune
2	[Taq-Polymerase]	1x	80 µl	rouge
D	[Internal Control DNA]	2x	1700 µl	orange
N	[No Template Control]	1x	450 µl	blanc
P	[Positive Control]	1x	200 µl	bleu

5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test ne soit affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).

- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE CD Toxin A/B peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants :

Tableau 2 : Matériel nécessaire

Plateforme d'extraction	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy®MAG™
Instrument de PCR en temps réel :	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Remarque : utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml sur le Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si vous souhaitez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation II (PG0002) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler® 2.0
- RIDA® GENE Color Compensation IV (PG0004) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler® 480II
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, tubes, feuilles)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes à filtre
- Gants jetables sans poudre
- Eau de PCR (qualité BioScience, sans nucléase)

7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses. Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.

- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux de même que tous les réactifs et le matériel exposés aux échantillons. Ils doivent être manipulés conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.

Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Préparation de l'échantillon à partir d'échantillons de selles

Pour isoler l'ADN des échantillons de selles humaines, utiliser un kit d'isolation d'ADN (par ex., RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell[®] RSC (Promega)) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant.

Il convient de diluer les échantillons de selles avant extraction avec de l'eau selon un rapport de 1/3. Agiter fortement l'échantillon de selles dilué et le centrifuger à 1 000 x g pendant 30 s. Utiliser le volume adéquat du surnageant conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA[®] GENE CD Toxin A/B inclut un ADN de contrôle interne

Internal Control DNA qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (voir tableau 4).

Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 20 µl de **Internal Control DNA** pendant la procédure d'extraction. L'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl d'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

8.2 Préparation des échantillons à partir des cultures

Pour isoler l'ADN de la culture, il est recommandé de suivre la procédure suivante : Ajouter 1 ml d'eau de PCR dans un tube de préparation. Recueillir les colonies à l'aide d'une anse de prélèvement et les suspendre dans l'eau de PCR préparée. Couper ou casser la tige de l'anse de prélèvement. Fermer hermétiquement le tube de préparation et l'agiter vigoureusement pendant 60 secondes. Chauffer et agiter le tube de préparation à 95 °C pendant 10 min dans un bloc chauffant. Centrifuger pendant 1 min à 13 000 x g et recueillir le surnageant en tant qu'échantillon.

Remarque : en présence d'une forte turbidité, recommencer l'étape de centrifugation (si nécessaire).

Le test RIDA®GENE CD Toxin A/B inclut un **Internal Control DNA** qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'**Internal Control DNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si l'**Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (voir tableau 4).

S'il est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 20 µl pendant la procédure d'extraction.

L'**Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl d'**Internal Control DNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions de PCR (réactions de l'échantillon et réactions de contrôle) nécessaires. Il faut inclure un contrôle positif et un contrôle négatif dans chaque exécution du test.

Nous recommandons de calculer un volume supplémentaire de 10% pour compenser l'imprécision du pipetage (voir tableaux 3, 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le mélange réactif [Reaction Mix], la [Taq-Polymerase], le contrôle positif [Positive Control], le contrôle sans matrice [No Template Control] et l'ADN de contrôle interne [Internal Control DNA] avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 et 8 °C).

Tableau 3 : Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD comme contrôle de l'extraction et de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	[Reaction Mix]	19,3 µl	212,3 µl
2	[Taq-Polymerase]	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

Tableau 4 : Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (tube ou plaque).

Contrôle négatif : Ajouter 5 µl de **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque : si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle négatif pour la PCR.

Échantillon : Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN au mélange maître pré-pipeté.

Contrôle positif : Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque : si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle positif pour la PCR.

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger et les placer dans l'instrument de PCR en temps réel. La réaction de PCR devrait commencer conformément à la configuration de l'instrument de PCR (tableaux 5, 6, 7, 8).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

Tableau 5 : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour la série LightCycler® et Rotor-Gene Q

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 6 : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour Mx3005P, ABI 7500 et CFX96™

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

Remarque : le profil universel de PCR en temps réel doit seulement être utilisé pour les tests d'ADN si les tests PCR en temps réel ADN RIDA® GENE et ARN RIDA® GENE sont effectués lors d'une même exécution.

Tableau 7 : Profil universel de PCR en temps réel pour la série LightCycler®

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 8 : Profil universel de PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q et CFX96™

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 9 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 2.0	Toxine A/B de <i>Clostridium difficile</i>	530	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) est nécessaire
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	465/510	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	533/580	
ABI 7500	Toxine A/B de <i>Clostridium difficile</i>	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux paramètres par défaut
	ICD	Jaune	
Bio-Rad CFX96™	Toxine A/B de <i>Clostridium difficile</i>	FAM	-
	ICD	VIC	

10. Contrôle qualité

L'analyse des échantillons est effectuée par le logiciel de l'instrument de PCR en temps réel utilisé conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle positif et le contrôle négatif doivent afficher des résultats corrects (voir tableau 10, figure 1) afin de déterminer qu'une série est valide.

Le **Positive Control** CD Toxin A/B a une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque série de PCR utilise au total 5×10^3 copies de contrôle positif.

Tableau 10 : Pour que l'exécution soit valide, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

Échantillon	Résultat du test	Ct ICD	Ct cible
Positive control	Positif	S/O ^{*1}	Voir Certificat d'assurance qualité
Negative control	Négatif	Ct > 20	0

^{*1} Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICR soit positif pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas positif dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si les critères requis ne sont pas satisfaits, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test

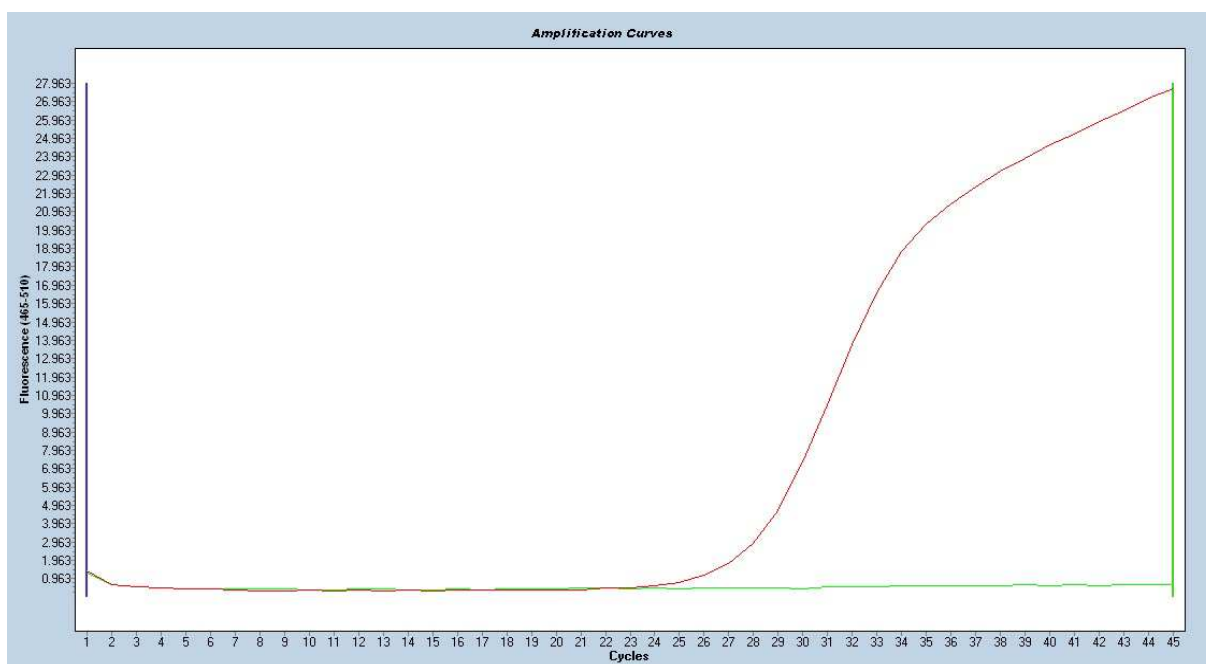


Figure 1 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (gènes des toxines A/B de *C. difficile*) sur le LightCycler® 480II

11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

Tableau 11 : Interprétation des échantillons

Gènes cibles		
Gènes des toxines A/B de <i>C. difficile</i>	ICD	Résultat
positif	positif/négatif	Gènes des toxines A/B de <i>C. difficile</i> détectés
négatif	positif	Gènes cibles non détectés
négatif	négatif	Non valide

Les gènes des toxines A/B de *C. difficile* sont détectés si l'ADN de l'échantillon et le **Internal Control DNA** présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Les gènes des toxines A/B de *C. difficile* sont également détectés si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour le **Internal Control DNA**. La détection du contrôle d'amplification interne n'est pas nécessaire, car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent de l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA**.

Les gènes des toxines A/B de *C. difficile* ne sont pas détectés si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour le **Internal Control DNA**. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection de l'ADN du contrôle interne **Internal Control DNA**.

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et l'ADN du contrôle interne **Internal Control DNA** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR ou la procédure d'extraction est défectueuse. L'échantillon extrait doit être encore dilué avec de l'eau de PCR (1/10) et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

12. Limites de la méthode

1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est uniquement validé pour les échantillons de selles et de cultures.
3. Un prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA[®] GENE CD Toxin A/B.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence des gènes des toxines A/B (tcdA/tcdB) de *C. difficile*.

13. Performances

13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE CD Toxin A/B est ≥ 10 copies d'ADN par réaction.

La figure 2 ci-dessous présente une série de dilutions des gènes des toxines A/B de *C. difficile* ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl chacune) avec le LightCycler® 480II.

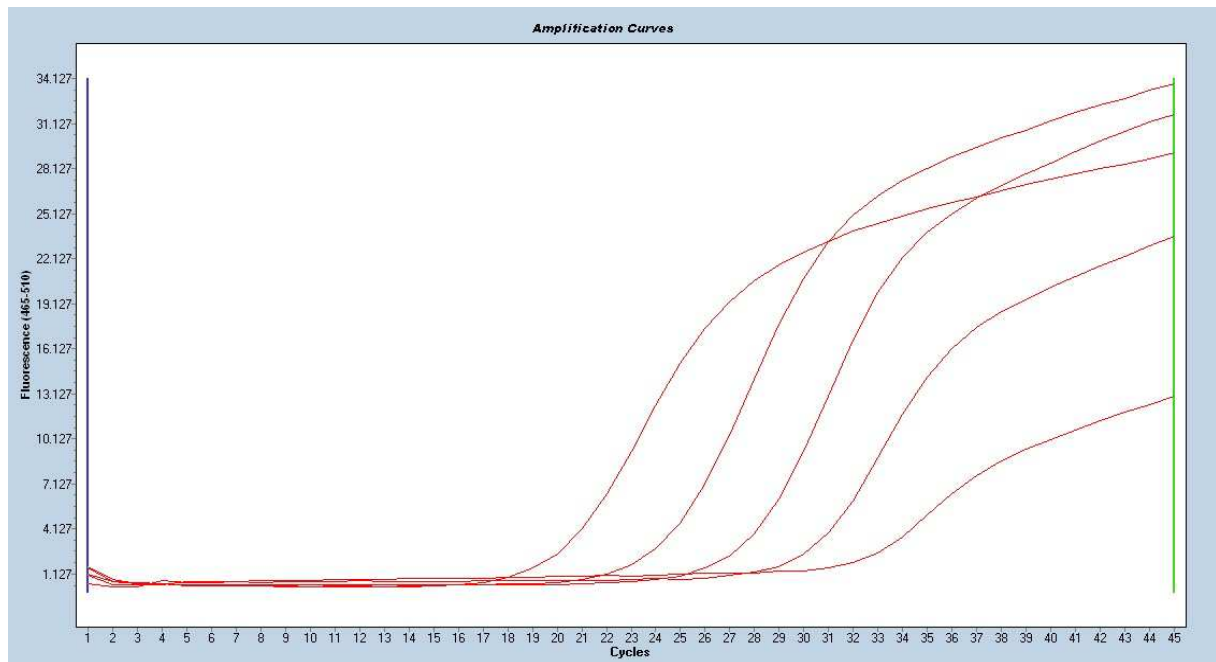


Figure 2 : Série de dilutions des gènes des toxines A/B de *C. difficile* ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ADN et de la concentration de l'ADN.

13.2 Spécificité analytique

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE CD Toxin A/B est spécifique à *Clostridium difficile* dans les échantillons de selles humaines. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 12) :

Tableau 12 : Test de la réactivité croisée

Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Adénovirus 7, humain, souche Gomen	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adénovirus 40, humain, souche Dugan	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Norovirus GI	-
Adénovirus 41, humain, souche Tak	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Norovirus GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Astrovirus	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Rotavirus	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>E.coli</i> (O157:H7)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E.coli</i> (O26:H-)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> sous-esp. <i>fetus</i>	-	<i>E.coli</i> (O6)	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> sous-esp. <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-		

13.3 Réactivité analytique

La réactivité du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE CD Toxin A/B a été étudiée avec *Clostridium difficile* (voir tableau 13). Toutes les souches testées de *Clostridium difficile* ont été détectées par le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE CD Toxin A/B ou par alignement de séquences.

Tableau 13 : Test de la réactivité analytique










<i>Clostridium difficile</i>					
<i>C. difficile</i> ribotype 001	+	<i>C. difficile</i> ribotype 023	+	<i>C. difficile</i> ribotype 075	+
<i>C. difficile</i> ribotype 002	+	<i>C. difficile</i> ribotype 027	+	<i>C. difficile</i> ribotype 078	+
<i>C. difficile</i> ribotype 012	+	<i>C. difficile</i> ribotype 046	+	<i>C. difficile</i> ribotype 0126	+
<i>C. difficile</i> ribotype 017	+	<i>C. difficile</i> ribotype 056	+	<i>C. difficile</i> ribotype 0131	+
<i>C. difficile</i> ribotype 020	+				
<i>C. difficile</i> toxinotype 0	+	<i>C. difficile</i> toxinotype X	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXI	+
<i>C. difficile</i> toxinotype I	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIa	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype II	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIb	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXIV	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IIIa	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIc	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXV	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IIIb	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIId	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXVI	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IIIc	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXVII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IV	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXVIII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype V	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIVa	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXIX	+
<i>C. difficile</i> toxinotype VI	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIVb	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXX	+
<i>C. difficile</i> toxinotype VII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XVI	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXXI	+
<i>C. difficile</i> toxinotype VIII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XVII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXXII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IXa	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XVIII	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXXIII	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IXb	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XIX	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XXXIV	+
<i>C. difficile</i> toxinotype IXc	+	<i>C. difficile</i> toxinotype XX	+		

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
29/01/2013	Version pour la publication
22/05/2018	Révision générale
22/05/2018	4. Contenu du paquet 5. Instructions de conservation des réactifs 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 8. Prélèvement et conservation d'échantillons 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 13. Performances 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour le diagnostic <i>in-vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Sans objet

16. Bibliographie

1. Hall IC and O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935, 49: 390–402.
2. Bartlett JG, et al. Antibiotica-associated pseudomembranous colitis due to a toxin-producing clostridia. *N Engl J Med*, 1978; 298:531-543.
3. Bartlett JG and Gerding DN. Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *CID* 2008, 46: S12-18.
4. Bartlett JG. Narrative Review: The new Epidemic of *Clostridium difficile*-Associated Enteric Disease. *Ann Intern Med* 2006; 145:758-764.

RIDA® GENE CD Toxin A/B

REF PG0825

1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA® GENE CD toxin A/B è un test di PCR real-time per la rivelazione diretta e qualitativa dei geni delle tossine A (tcdA) e B (tcdB) di *Clostridium difficile* da campioni fecali umani da colture. Il test RIDA® GENE CD Toxin A/B di PCR real-time può essere usato come ausilio nella diagnosi di diarrea associata a *Clostridium difficile* (CDAD).

2. Sintesi e spiegazione del test

Clostridium difficile, un batterio anaerobio gram-positivo formante spore, è stato descritto per la prima volta nel 1935 da Hall e O'Toole come componente della microflora intestinale di neonati sani.¹ Alla fine degli anni '70, tuttavia, il *Clostridium difficile* è stato identificato fra le cause della diarrea associata alla terapia antibiotica e della colite pseudomembranosa.² Oggi, *Clostridium difficile* è una delle cause più comuni della diarrea nosocomiale.

Clostridium difficile è responsabile del 15-25% dei casi di diarrea associata alla terapia antibiotica e della quasi totalità dei casi di colite pseudomembranosa.³ I fattori di rischio che predispongono alla CDAD sono, ad esempio, l'esposizione agli antibiotici, l'età avanzata, il numero e la durata dei ricoveri ospedalieri. Tuttavia, l'infezione da *Clostridium difficile* si osserva anche in un numero crescente di soggetti non trattati con antibiotici e non ospedalizzati.

I sintomi spaziano da una lieve diarrea a infezioni intestinali di gravità variabile, inclusa la colite pseudomembranosa, la forma più grave di malattia infiammatoria intestinale indotta da antibiotici. I casi sintomatici sono provocati dai ceppi tossigeni di *Clostridium difficile* che producono la tossina A e la tossina B. Di recente, l'incidenza e la gravità delle infezioni da *Clostridium difficile* sono aumentate in tutto il mondo.⁴

La PCR real-time permette di rivelare in modo rapido e con elevata sensibilità e specificità le infezioni da *Clostridium difficile*. La diagnosi precoce e affidabile di un'infezione da *Clostridium difficile* consente di somministrare terapie specifiche ai pazienti con CDAD e anche di attuare misure igieniche per prevenire la trasmissione nosocomiale.

3. Principio del test

RIDA[®]GENE CD Toxin A/B è un test di PCR real-time multiplex per la rivelazione diretta e qualitativa dei geni delle tossine A (tcdA) e B (tcdB) di *Clostridium difficile* da campioni fecali umani e da colture.

Dopo l'isolamento del DNA, avviene l'amplificazione dei frammenti genetici specifici per le tossine A e B di *Clostridium difficile* (se presenti). I target di DNA amplificati vengono rivelati con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la **Taq-Polymerase** rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati.

RIDA[®]GENE CD Toxin A/B contiene un **Internal Control DNA** (ICD) quale controllo interno della procedura di preparazione dei campioni e/o per determinare la possibile inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

Tab. 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2	1050 µl	giallo
2	Taq-Polymerase	1	80 µl	rosso
D	Internal Control DNA	2	1700 µl	arancione
N	No Template Control	1	450 µl	bianco
P	Positive Control	1	200 µl	blu

5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongellare accuratamente i reagenti prima dell'uso (ad esempio in un frigorifero a 2-8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a **20 cicli di congelamento/scongellamento** senza compromettere i test (ad esempio dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati al freddo in modo appropriato (2 - 8 °C).

6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

Il test RIDA®GENE CD Toxin A/B di PCR real-time multiplex è adatto per l'uso con le seguenti piattaforme di estrazione e strumenti per la PCR real-time:

Tab. 2: Attrezzatura necessaria

Piattaforma di estrazione	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy®MAG™
Strumento per la PCR real-time:	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.

Se per la PCR real-time si preferisce utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti, contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) per l'uso con LightCycler® 2.0
- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler® 480II
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5–20 µl, 20–200 µl, 100–1000 µl)
- Puntali con filtro
- Guanti monouso senza talco
- **Acqua per PCR (grado bioscientifico, priva di nucleasi)**

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in stanze separate per evitare contaminazione crociata.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.
- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com.

8. Raccolta e conservazione di campioni

8.1 Preparazione del campione da campioni fecali

Per l'isolamento del DNA da campioni fecali umani utilizzare un kit (ad es. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell[®] RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore. Prima dell'estrazione si raccomanda di diluire i campioni di feci con acqua in rapporto 1:3. Vorticare vigorosamente il campione di feci diluito e centrifugare a 1000 x g per 30 sec. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il kit RIDA[®] GENE CD Toxin A/B contiene un Internal Control DNA che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'Internal Control DNA può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'Internal Control DNA viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di Internal Control DNA alla Master Mix (vedere Tab. 4).

Se l'Internal Control DNA viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di

Internal Control DNA durante la procedura di estrazione. L'

Internal Control DNA deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

8.2 Preparazione del campione da colture

Per l'isolamento del DNA dalla coltura si raccomanda la seguente procedura: Dispensare 1 µl di acqua per PCR in una provetta di preparazione. Raccogliere le colonie con un'ansa da inoculo e sospenderle nell'acqua per PCR preparata. Tagliare o rompere il gambo dell'ansa da inoculo. Chiudere la provetta di preparazione ermeticamente e agitare vigorosamente per 60 secondi. Scaldare e agitare la provetta di preparazione a 95 °C per 10 minuti in un modulo riscaldante. Centrifugare per 1 minuto a 13,000 x g e applicare il surnatante come campione.

Nota: ripetere la fase di centrifugazione in caso di forte torbidità (se necessario).

Il kit RIDA® GENE CD Toxin A/B contiene un **Internal Control DNA** che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L' **Internal Control DNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l' **Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix (vedere Tab. 4).

Se l' **Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione. L' **Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela campione-acqua per PCR e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10% a compensazione di un pipettaggio non preciso (vedere Tab. 3, Tab. 4). Prima dell'uso scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, il

Positive Control], il No Template Control] e l' Internal Control DNA]. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2-8 °C).

Tab. 3: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD come controllo di estrazione e inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10% extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	20 µl	220 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

Tab. 4: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD solo come controllo di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10% extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Totale	21,0 µl	231,0 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

Controllo negativo: Dispensare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Nota: se l' **Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo negativo.

Campione: Dispensare 5 µl di estratto di DNA alla Master Mix pre-pipettata.

Controllo positivo: Dispensare 5 µl di **Positive Control** alla Master Mix pre-pipettata.

Nota: se l' **Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo positivo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real time. La reazione di PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo della PCR real-time per DNA

Tab. 5: Profilo della PCR real-time del DNA per le serie LightCycler® e Rotor-Gene Q

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tab. 6: Profilo PCR real-time DNA per Mx3005P, ABI 7500 e CFX96™

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.3.2 Profilo della PCR real-time universale

Nota: il profilo per PCR real-time universale deve essere utilizzato per i test del DNA solo quando i test di PCR real-time RIDA[®]GENE DNA e RNA vengono effettuati in un unico ciclo.

Tab. 7: Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler[®]

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tab. 8: Profilo PCR real-time universale per Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q e CFX96[™]

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tab. 9: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Nota
Roche LightCycler® 2.0	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	530	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	465/510	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
ABI 7500	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICD	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	Controllare che non vi sia colorante di riferimento
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	Verde	Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite
	ICD	Giallo	
Bio-Rad CFX96™	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	-
	ICD	VIC	

10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, i controlli positivo e negativo devono mostrare risultati corretti (vedere Tabella 10, Fig. 1).

Il **Positive Control** di CD Toxin A/B ha una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di 5×10^3 copie.

Tab. 10: Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Controllo positivo	Positivo	NA ^{*1}	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

^{*1} Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICR.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test

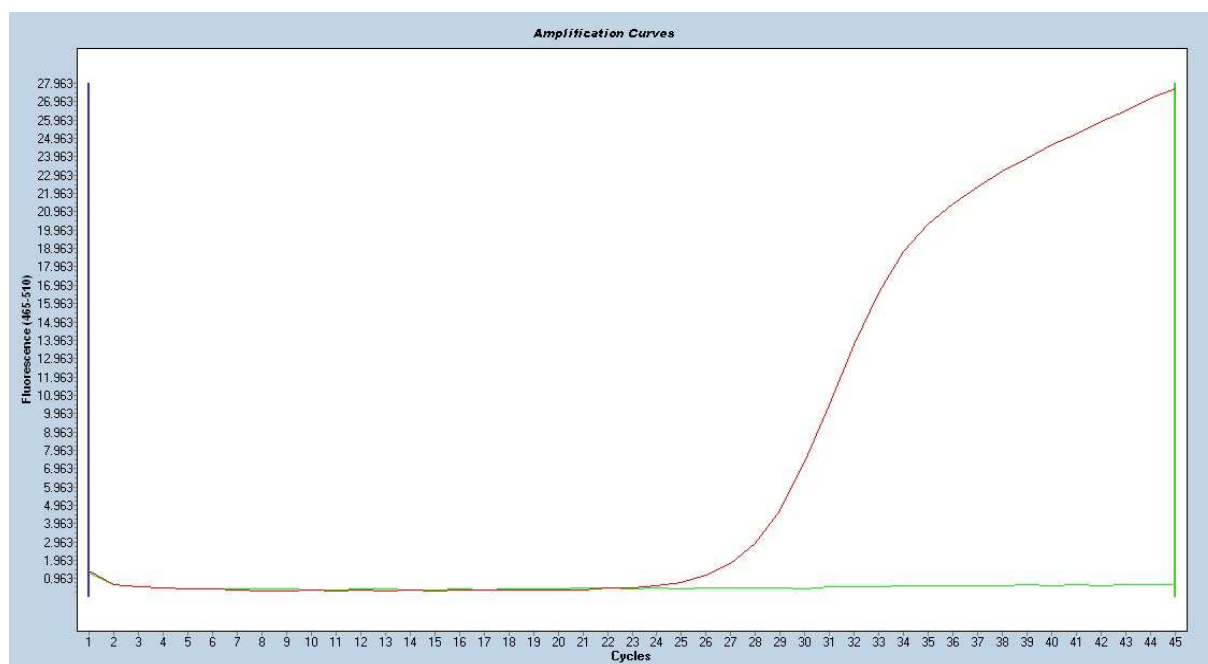


Fig. 1: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (gene tossina A/B di *C. difficile*) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

Tab. 11: Interpretazione del campione

Geni target		
Geni tossina A/B di <i>C. difficile</i>	ICD	Risultato
positivo	positivo/negativo	Geni tossina A/B di <i>C. difficile</i> rivelati
negativo	positivo	Geni target non rivelati
negativo	negativo	Non valido

La presenza di geni delle tossine A/B di *C. difficile* è attestata se sia il DNA del campione sia l' **Internal Control DNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

La presenza di geni delle tossine A/B di *C. difficile* è inoltre attestata se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma nessun segnale per l' **Internal Control DNA** nel sistema di rivelazione. La rivelazione del controllo di amplificazione interno non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell' **Internal Control DNA** sia debole o assente.

La presenza dei geni delle tossine A/B di *C. difficile* non è attestata se il DNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma nel sistema di rivelazione è presente un segnale per l' **Internal Control DNA**. La rivelazione dell' **Internal Control DNA** esclude l'inibizione della reazione di PCR.

Un campione non è valido se né il DNA del campione né l' **Internal Control DNA** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. In questo caso il campione contiene un inibitore della PCR o si è verificato un errore nella procedura di estrazione. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per campioni fecali e colturali.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rivelazione di nuove varianti e determinare un risultato falso negativo con il test RIDA[®] GENE CD Toxin A/B.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rivelazione (LoD) possono essere rivelati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza dei geni delle tossine A/B (tcdA/tcdB) di *C. difficile*.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

Il test RIDA® GENE CD Toxin A/B di PCR real-time multiplex ha un limite di rivelazione maggiore o uguale a 10 copie di DNA per reazione.

La figura 2 seguente mostra una serie di diluizioni di geni delle tossine A/B di *C. difficile* ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl ciascuna) su LightCycler® 480II

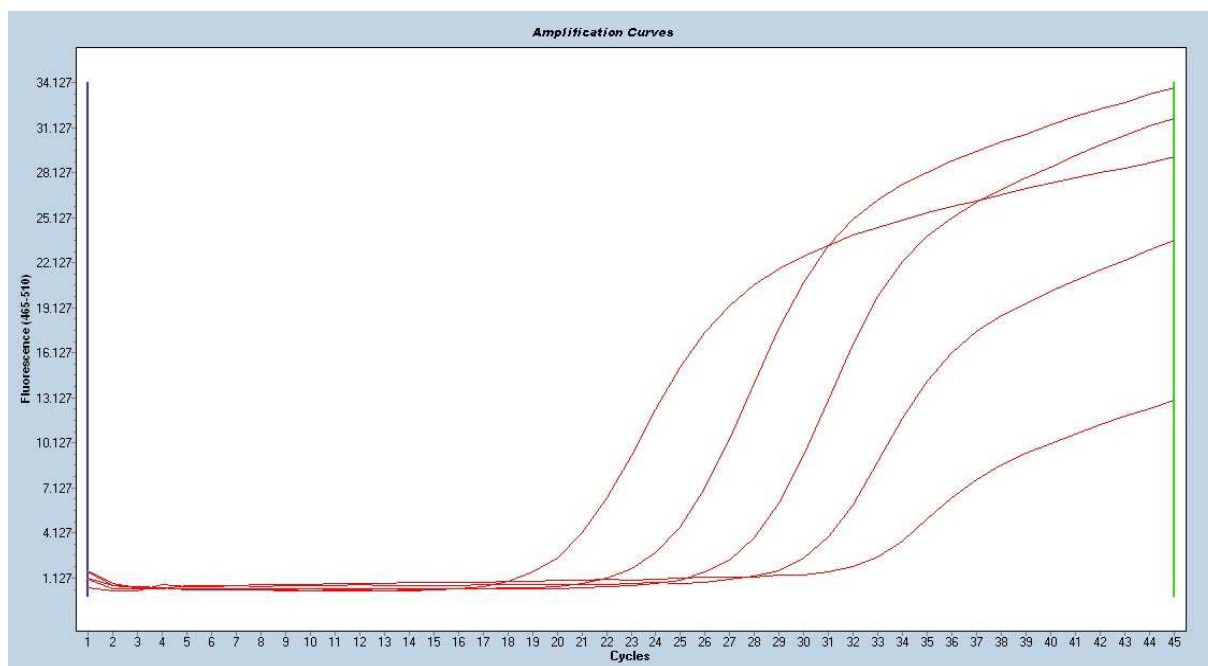


Fig. 2: Serie di diluizioni di geni delle tossine A/B di *C. difficile* ($10^5 - 10^1$ copie di DNA / μl) sul LightCycler® 480II

Il limite di rivelabilità dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA e dalla concentrazione del DNA.

13.2 Specificità analitica

Il test RIDA® GENE CD Toxin A/B di PCR real-time multiplex è specifico per *Clostridium difficile* nei campioni di feci umane. Non è stata rilevata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tab. 12):

Tab. 12: Test di reattività crociata

Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Norovirus GI	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Norovirus GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium sordelli</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Astrovirus	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Rotavirus	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>E.coli</i> (O157:H7)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E.coli</i> (O26:H-)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> sottosp. <i>fetus</i>	-	<i>E.coli</i> (O6)	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland1	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-		

13.3 Reattività analitica

La reattività del test di PCR real-time multiplex RIDA® GENE CD Toxic A/B è stata testata con *Clostridium difficile* (vedere Tab. 13). Tutti i ceppi di *Clostridium difficile* testati sono stati rivelati con il test di PCR real-time multiplex RIDA® GENE CD Toxic A/B o mediante allineamento di sequenze.

Tab. 13: Test di reattività analitica










<i>Clostridium difficile</i>					
<i>C. difficile</i> ribotipo 001	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 023	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 075	+
<i>C. difficile</i> ribotipo 002	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 027	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 078	+
<i>C. difficile</i> ribotipo 012	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 046	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 0126	+
<i>C. difficile</i> ribotipo 017	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 056	+	<i>C. difficile</i> ribotipo 0131	+
<i>C. difficile</i> ribotipo 020	+				
<i>C. difficile</i> tossinotipo 0	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo X	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XXI	+
<i>C. difficile</i> tossinotipo I	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XIa	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XXII	+
<i>C. difficile</i> tossinotipo II	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XIb	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XXIV	+
<i>C. difficile</i> tossinotipo IIIa	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XIc	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XXV	+
<i>C. difficile</i> tossinotipo IIIb	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XI d	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XXVI	+
<i>C. difficile</i> tossinotipo IIIc	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XII	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XXVII	+
<i>C. difficile</i> tossinotipo IV	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XIII	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XXVIII	+
<i>C. difficile</i> tossinotipo V	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XIVa	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XXIX	+
<i>C. difficile</i> tossinotipo VI	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XIVb	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XXX	+
<i>C. difficile</i> tossinotipo VII	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XVI	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XXXI	+
<i>C. difficile</i> tossinotipo VIII	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XVII	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XXXII	+
<i>C. difficile</i> tossinotipo IXa	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XVIII	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XXXIII	+
<i>C. difficile</i> tossinotipo IXb	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XIX	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XXXIV	+
<i>C. difficile</i> tossinotipo IXc	+	<i>C. difficile</i> tossinotipo XX	+		

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
29/01/2013	Versione di rilascio
22/05/2018	Revisione generale
22/05/2018	4. Contenuto della confezione 5. Istruzioni di conservazione 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari 8. Raccolta e conservazione di campioni 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici nel testo

Non pertinente

16. Bibliografia

1. Hall IC and O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935, 49: 390–402.
2. Bartlett JG, et al. Antibiotica-associated pseudomembranous colitis due to a toxin-producing clostridia. *N Engl J Med*, 1978; 298:531-543.
3. Bartlett JG and Gerding DN. Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *CID* 2008, 46: S12-18.
4. Bartlett JG. Narrative Review: The new Epidemic of *Clostridium difficile*-Associated Enteric Disease. *Ann Intern Med* 2006; 145:758-764.