


RIDA[®] GENE CD Toxin A/B
real-time PCR

Art. Nr.: PG0825
100 Reaktionen

Für die *in-vitro* Diagnostik.

 -20 °C



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Verwendungszweck

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

2. Erläuterung

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 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 toxigene 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 real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis der *Clostridium difficile* Toxin-Gene A (tcdA) und B (tcdB) in humanen Stuhlproben.

Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von Toxin A und Toxin B 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 1100 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x 11 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x 1800 µl	orange
N	PCR Water	1x 500 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 5 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 Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit für Stuhlproben (z.B. RTP[®] Pathogen Kit (STRATEC Molecular)) oder DNA-Extraktionssysteme für Stuhlproben (z.B. Maxwell[®] 16 (Promega), NucliSENS easy[®]MAG[™] (bioMérieux))
- Real-time PCR-Gerät:
 - Roche: LightCycler[®] 2.0, LightCycler[®] 480II
 - Cepheid: SmartCycler[®]
 - Applied Biosystems: ABI 7500
 - Abbott: m2000rt
 - Stratagene: Mx3000P, Mx3005P
 - QIAGEN: Rotor-Gene Q
- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit II (PG0002) bei Verwendung des LightCycler[®] 2.0 (Roche)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe

7. Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für die *in-vitro* Diagnostik.
- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- 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.

8. Testdurchführung

8.1 Probenvorbereitung

8.1.1 DNA-Isolierung aus Stuhlproben

Für die DNA-Isolierung aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Isolierungskit (z.B. RTP[®] Pathogen Kit (STRATEC Molecular)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®]16 (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 3.000 rpm 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 (ICD), die entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden kann.

Wird die Internal Control DNA (ICD) nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der ICD dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab.3).

Wird die Internal Control DNA (ICD) als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der ICD während der Extraktion eingesetzt werden. Die ICD soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden.

8.2 Herstellung des Master-Mix

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

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab.2, Tab.3). Vor der Benutzung den Reaction Mix, die Taq-Polymerase, die Positive Control, das PCR Water und die ICD auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab.2: 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	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq-Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

Tab.3: 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	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq-Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

8.3 Herstellung des PCR-Mix

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

Negativkontrolle: Je 5 µl PCR Water zum vorgelegten Master-Mix als Negativkontrolle pipettieren.

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

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

Positivkontrolle: Je 5 µl Positive Control zum vorgelegten Master-Mix in die dafür vorgesehenen Reaktionsgefäße pipettieren.

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

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz abzentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab.4, Tab.5).

8.4 Geräteeinstellungen

Tab.4: Real-time PCR Profil für LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II, SmartCycler® und Rotor-Gene Q

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

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

Tab.5: Real-time PCR Profil für Mx3000P, Mx3005P, ABI 7500 und m2000rt

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

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

8.5 Detektionskanaleinstellung

Tab.6: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

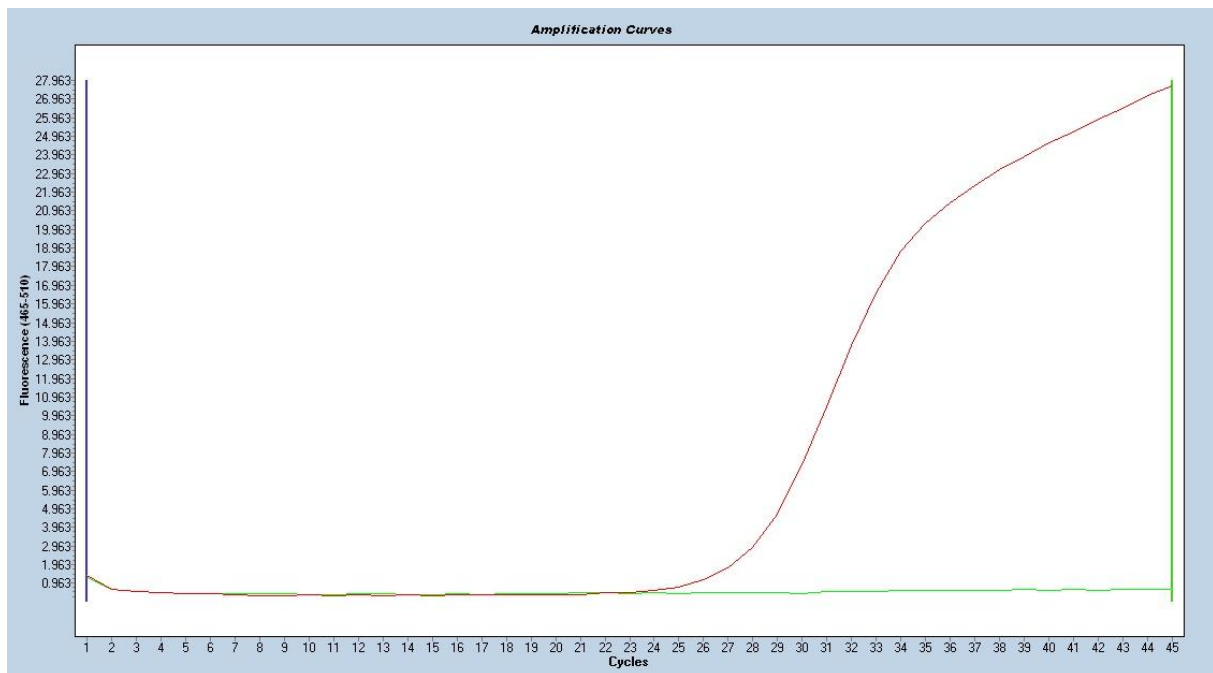
Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Dark-Quencher	Bemerkung
Roche LightCycler® 2.0	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	530	+	RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) wird benötigt
	ICD	560	+	
Roche LightCycler® 480II	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	465/510	+	Eine Color Compensation wird nicht benötigt
	ICD	533/580	+	
Cepheid SmartCycler®	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	Kanal 1	+	-
	ICD	Kanal 2	+	
ABI 7500	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	none	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	none	
Abbott m2000rt	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B	FAM	none	-
	ICD	VIC	none	
Stratagene Mx3000P/ 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	+	-
	ICD	Yellow	+	

9. Interpretation der Ergebnisse

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

Die Positivkontrolle liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien / μl vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

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



Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 7.

Tab. 7: Probenauswertung

Probe	ICD	Ergebnis
-	+	Probe negativ
+	+	Probe positiv
+	-	Probe positiv, Konkurrenz
-	-	Inhibition der PCR

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Probe keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt und die zugehörige Internal Control DNA (ICD) positiv ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion bzw. ein Fehler im Extraktionsverfahren kann durch die Detektion der Internal Control DNA (ICD) ausgeschlossen werden.

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Probe eine Amplifikation im Nachweissystem und in der dazugehörigen Internal Control DNA (ICD) zeigt.

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Probe eine Amplifikation im Nachweissystem, jedoch keine für die Internal Control DNA (ICD) zeigt. Der Nachweis der Internal Control DNA (ICD) ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control DNA (ICD) führen können.

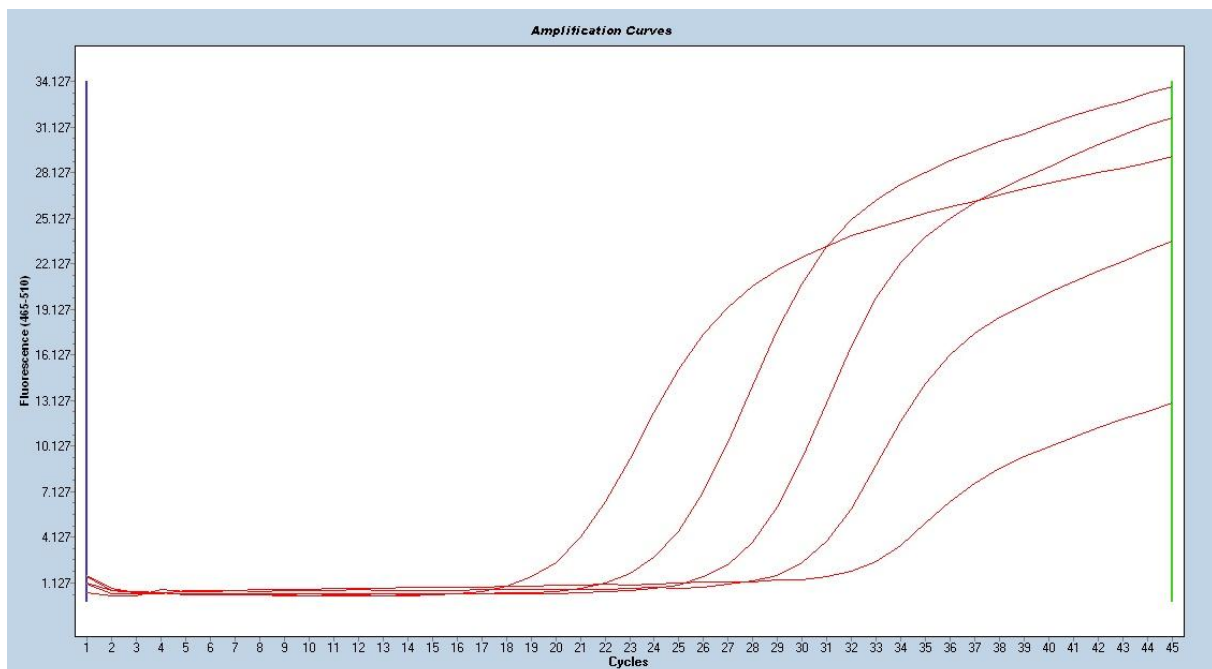
Eine Probe ist nicht auswertbar, wenn die Probe und die Internal Control DNA (ICD) im Nachweissystem keine Amplifikation zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR Wasser verdünnt und erneut amplifiziert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

10. Testmerkmale

10.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®]GENE CD Toxin A/B real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien/ Reaktion (s. Abb. 2).

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



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

10.2 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE CD Toxin A/B real-time PCR ist spezifisch für *Clostridium difficile* in humanen Stuhlproben. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 8):

Tab. 8: Kreuzreaktivitätstestung

<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	Enteropathogene <i>E.coli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	Enterotoxische <i>E.coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Shigatoxin bildende <i>E.coli</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		

11. Grenzen des Verfahrens

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 Stuhlproben 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 Sondenbindungsregion 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 *C. difficile* Toxin A/B-Gene (tcdA/tcdB) vorhanden sind.

12. 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.