



Duplica^{RealTime} Advanced *C. Difficile* A/B Kit

REV: EBR026032_IFU_REV.06D_ENITA

REF: EBR026032 -32 tests

Instructions For Use

INTENDED USE/PURPOSE

Duplica^{RealTime} Advanced *Clostridium Difficile* A/B Kit is an *in vitro* nucleic acid amplification test for the detection of the DNA of *Clostridium Difficile* toxins A and B in stool samples. The device is intended for detecting the presence of an infectious agent and for determining infective disease status.

INTRODUCTION

Clostridium difficile is regarded as an emerging pathogen and in recent years has been recognized as an increasingly important cause of nosocomial disease. It is a Gram positive spore-forming anaerobe and is the causative agent of several antibiotic-associated diarrheal diseases that are induced by treatment with antibiotics or by disruption of the normal gastrointestinal flora. These syndromes are collectively known as *C. difficile* infections or CDI, and include pseudomembranous colitis, toxic megacolon, and may lead to chronic infection, shock and death. Its spore-forming ability and resultant persistence has allowed *C. difficile* to become common in the hospital environment and it is now the leading cause of infectious diarrhoea in hospitals worldwide.

The major virulence factors of *C. difficile* are thought to be toxin A and toxin B. These toxins are encoded by the *tcdA* and *tcdB* genes, respectively, which are located within a 19.6 kb pathogenicity locus, the PaLoc.

Both toxin A and toxin B are proinflammatory and cytotoxic, causing disruption of the actin cytoskeleton and impairment of tight junctions in human intestinal epithelial cells, with resulting fluid accumulation and extensive damage to the large intestine.

PRINCIPLE OF THE TEST

Duplica^{RealTime} Advanced *Clostridium Difficile* A/B Kit is an assay for the DNA-based detection of the *Clostridium Difficile*. The reagents for the amplification are ready-to-use and provided in 3 separate tubes:

- **AMPLIFICATION MIX:** with Hot Start Taq DNA polymerase, nucleotides, MgCl₂ and buffer.
- **OLIGO MIX:** with primers and fluorogenic probes.
- **INTERNAL CONTROL OF AMPLIFICATION:** to check the successful of amplification reaction.

Duplica^{RealTime} Advanced *Clostridium Difficile* A/B Kit is based on specific recognition and amplification of target sequences by PCR, and the simultaneous detection of the accumulated PCR amplification products by fluorescent DNA probes. The probe, designed to detect the target, carries the fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) at the 5' end, while the probe specific for the internal control (IC), is labelled with the fluorophore HEX (hexa-chloro-fluorescein). Both the probes have a non-fluorescent quencher at the 3' end. If excited, the whole probe does not emit fluorescence since the proximity of the quencher to the reporter prevents the emission of the fluorescence from the reporter (quenching effect).

REAGENTS PROVIDED

Each kit contains enough reagents to perform 32 tests when used in 4 analytical sessions with 6 samples, 1 **Positive Control of Amplification (Control 1, C1)**, and 1 **Reaction Blank (BM)** each.

Kit Components

Reagent	Color Code	Storage (range, °C)	Volume (µl)	Quantity (tubes)
Oligo Mix (OM)*	Green Cap	-22÷-18	400	1
Amplification Mix (AM)	Blue Cap	-22÷-18	400	1
Control 1 (C1, Positive C.)	Red Cap	-22÷-18	>50	1
Control 2 (C2, Internal C.)	Yellow Cap	-22÷-18	>50	1
Reaction Blank (BM)	Neutral Cap	-22÷-18	>50	1

***protect the tube from direct light**

STORAGE AND HANDLING

All reagents must be stored at **-22÷-18°C** and can be used until the expiry date printed on the labels. Do not freeze and thaw the products more than six times.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Extraction kit for DNA purification (refer to the specific handbook's section)
- Optical tubes or microplate for Real Time PCR
- Disposable powder-free gloves and laboratory coat
- Variable volumes pipettes (5-20 µl, 20-200 µl and 100-1000 µl)
- Disposable RNase/DNase-free tips with aerosol barriers
- Tube racks
- Vortex
- Desktop centrifuge
- PCR box
- Refrigerator
- Deep freezer
- Thermal cycler for Real Time PCR

The kit has been developed for Real time PCR platforms for use on RotorGene® Q (Qiagen), DX®/CFX (Biorad), AB7500 (Life Technologies) and q16/q32 (Novacyt) thermocyclers.

Other makes and models should be fully tested and evaluated for optimal performance by the user before reporting results.

The equipment should be regularly maintained, in accordance with the manufacturer's instructions, and calibrated to ensure accurate PCR cycling and optimal performance.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with Good Laboratory Practice, define three separate laboratory's areas for: DNA extraction, PCR reaction mix preparation; manipulation of controls provided with the kit. Each area must have dedicated pipettes and laminar flow hood.
- If required, Clonit offers the necessary technical support for the correct use of the kit.
- Carefully read this Instruction for Use before using the kit
- Do not use the reagents after the expiry date
- Thaw and carefully mix the reagents of the kit before use
- Do not mix the reagents from different lots of the product
- Use calibrated and regularly checked pipettes and instrumentation only
- Use dedicated laboratory equipment. Change gloves frequently
- Periodically wipe the working area with 0,5% hypochlorite
- Use powder-free gloves. Do not leave fingerprints on optical section of PCR Tubes.
- Materials containing or potentially containing infectious agents must always be manipulated in a separated microbiological safety room under a Biohazard biological hood.

- In case of damaged package, contact the technical support before using the kit
- Do not use the product when stored at temperatures other than those indicated on the labels or described in this Instructions For Use.
- In case of spillage of the kit contents, please refer to the specific Material Safety Data Sheet (MSDS, available on request).
- The kit reagents, individual protective equipment, used materials, biological samples and test residuals must be disposed in accordance with local regulations.
- Patient Drug treatment may interfere with the final result of the molecular biology analysis.

OPERATING PROCEDURE

a) Specimens handling

- Collect the stool specimens into a clean, sealed container with no preservative.
- The specimens should be stored between +2°C and +8°C and ideally tested immediately or within 24 hours. Alternatively, the specimens should be frozen immediately upon receipt and stored up to ten days at -20°C or colder. A single freeze thaw cycle should not affect the results.

b) Specimen Preparation

- Mix stool as completely as possible.
- Clonit recommends Copan Fecal Swab for sample preparation. Open the swab's pouch; remove the tube and the swab and collect the specimen.
- For solid stools: Collect a small 3-4 mm diameter portion of mixed stool.
- Unscrew the cap aseptically and insert the swab into the tube; break the applicator at the point indicated by the colored line; replace the cap on the tube and screw the cap tightly.
- For liquid or semi-liquid stool: twist three times the swab into the specimen (in case of semi-liquid stool do not collect more than 3-4 mm diameter of mixed stool).
- Unscrew the cap aseptically and insert the swab into the tube; break the applicator at the point indicated by the colored line; replace the cap on the tube and screw the cap tightly.

c) DNA purification

- Vortex the tube containing the swab for 5-10 seconds until the solution becomes homogeneous.
- Collect 200 µl of the transport media and process with the Duplic α ®Prep equipment.
- Samples should be purified on the same day of the collection

For DNA purification Clonit recommends to use:

-Duplic α Prep NA Body Fluid kit (ref. EDI004200) with Duplic α PREP Automatic Extractor (ref. EDI001). Other extraction reagents and methods should be fully tested and evaluated for optimal performance by the user before reporting results.

d) Thermalcycler Setup

Important points before starting: Refer to the specific handbook of the equipment used to set the thermal profile indicated in the **Thermal Profile Table**. We recommend to switch on the instrument and to set the thermal profile before preparing the reaction mix.

*N.B.: before starting the run is recommended to save the file as "**Advanced Clostridium Difficile A/B Test**"; this way it is possible to save the Thermal Profile and settings and recall them in subsequent runs.*

Rotor-Gene® Q platform

- Start the software and on the box *New Run* select *Advanced*
- Select a *new template* in *Empty Run* or a pre-existing one
- Select the Rotor Type of your instrument and then *Next*
- Type 25 µl in the reaction volume and then *Next*
- Select *Edit Profile* and set up the correct Thermal Profile as indicated in the table below
- Select *Gain Optimisation* and then flag the option *Perform Optimisation before 1st acquisition*
- On *Channel Settings* select the green/yellow fluorophores and tube position "1" to perform the optimization. Then close the window and select *Next* and *Start Run*

DX®/CFX platform

- Select *Create a new Experiment*
- In the *Protocol* section select *Create New* to set the thermal profile
- In *Plate Editor*: set FAM and as *Fluorophores* and define the sample name.

Applied Biosystems® 7500 platform

- Select *Create a new Experiment*
- In the *Experiment Properties* select *Quantitation-Standard curve* as experiment type and *Taqman® Reagents* as reagent type
- Select the Run Mode (*7500* or *7500 Fast*) and the Ramp Speed (*Standard*)
- In the *Setup* menu select *Run Method* to set the thermal profile
- In the *Setup* menu select *Plate Setup-Define Targets and Samples* to select Samples and assign VIC target to internal control (C2) and FAM to the positive control (C1). Leave the default value (*NFQ-MGB*) as quencher type
- In *Define Samples* insert the sample name
- Select the used wells in *Plate Setup-Assign Targets and Samples*
- Select *None* as passive reference

q16/q32 platform

- Select "New" and select the correct type of assay (the run conditions are automatically loaded and do not need to be entered manually).
- In "Samples" enter the sample name.
- The positive and negative controls are required to be placed in the specific well positions as indicated by the software.
- For the Q32 instrument ensure that positions A1, A8, D1, D8 will contain a tube to balance the heated lid.
- To start the run select the "Start Run" option, choose the file location to save the run file and the appropriate instrument.
- To start the run from a USB drive, when asked to select an instrument select "Start run from USB" and select the drive where the USB is located. The USB drive can now be placed in the instrument and the run will start automatically (confirmed by a sound in Q16 or by LEDs in Q32 changing from orange to blue).

Thermal Profile Table (common for all the supported platforms)

TIME	TEMPERATURE	CYCLES
5 min	95 °C	1
15 sec	95 °C	X 15 Fluorescent Acquisition off
60 sec	63 °C	
15 sec	95 °C	X 45 Fluorescent Acquisition on
60 sec	53 °C	

d) PCR mix preparation

The total reaction volume is **26 µl**.

For each experiment prepare a PCR mix for the positive control (**C1**), the **Reaction Blank (BM)** and **n+1** samples. The internal control of amplification (**C2**) should be added directly to the PCR MIX, prior the aliquotation. The reagents of the PCR mix have to be mixed as indicated in the table below:

REAGENT	VOLUME (µl)
Amplification mix	10
Oligo mix	10
Internal Control (C2)	1
Extracted DNA	5

The PCR mix has to be freshly prepared every time

After its preparation, aliquot **21 µl of Master Mix** in the tubes or in the microplates well for PCR then add

in each tube/well **5 µl** from the **extracted DNA** or **Control 1 DNA**, place in order the tubes/microplate in the instrument and start the program of amplification. At the end of the program remove the tubes/microplate from the thermalcycler.

e) ANALYSIS and INTERPRETATION of RESULTS

Important points before starting: For a detailed description on how to analyze data, refer to *System User's manuals*. **Always visually inspect the amplification plot for each sample tested versus C_T values obtained with the software.**

Results interpretation

Refer to the instrument-specific user guide to visualize the amplification plots for the entire plate/rotor. Detailed analysis of raw data depends on the real-time PCR instrument used. Baseline noise levels should either be set automatically or at predefined cycles. For q16/q32 instruments, the calculated **CT** (C_q) values can be found in the Results section. Thresholds for C_q determination are automatically applied by the software and cannot be changed.

- The fluorescence in each channel indicates the hybridisation of the specific probes:
 - o **Channel 1 for FAM/Green= Target probe**
 - o **Channel 2 for HEX/Cy3/Yellow= Internal Control probe.**
- If a sample shows a fluorescence in **FAM/Green (C_T>0)**, the sample is positive and the signal detected by **HEX/Cy3/Yellow** fluorophore (C_T≥0) is not relevant.
- When no signal at fluorophore **FAM/Green (C_T=0)** is detected, to confirm the negative result, the completed amplification of internal control and therefore the appearance of a fluorescent signal at **HEX/Cy3/Yellow (C_T>0)** fluorophore level, must be verified. Only in this case we can state that the sample is negative.
- Condition in which no signal is detected indicates PCR inhibition. The sample must be repeated and a dilution 1:10 of the target DNA is suggested.

Please be aware that:

- The Blank is positive in the **HEX/Cy3/Yellow** channel, but negative in the **FAM/Green** channel.
- The Positive Control is positive in both the **FAM/Green** and the **HEX/Cy3/Yellow** channels. The **HEX/Cy3/Yellow** signal, due to competition with **FAM/Green** probe, may arise later or be absent. In this case the **HEX/Cy3/Yellow** signal is not relevant and the run is valid.

If all these conditions have been met, the run is valid and it is possible to analyse the data; otherwise the run is not valid. It is responsibility of the user to validate the run.

Results Interpretation Table

FAM/Green	HEX/CY3/Yellow	Results
C _T > 0	Not relevant (C _T ≥ 0)	POSITIVE
C _T = 0	C _T > 0	NEGATIVE
C _T = 0	C _T = 0	INHIBITION

ANALYTICAL AND CLINICAL PERFORMANCE

a) ANALYTICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The **Analytical Sensitivity** of the test was determined using purified and quantified genomic DNA of known concentration. Test was carried out in four different days on twenty replicates; the analytical sensitivity obtained is less than 10 copies/reaction.

The **Analytical Specificity** of Duplica^{Real Time} *Advanced C. Difficile A/B* Kit is foremost granted by the selection of the primers and probes, as well as the selection of stringent reaction conditions. The primers and probes have been checked for possible homologies against the major genetic data banks. The analytical specificity was evaluated by experimentally testing the cross-reactivity of the Duplica^{Real Time} *Advanced C. Difficile A/B* Kit against potentially interfering microorganisms. None of the following

pathogens demonstrated reactivity: *Aspergillus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Legionella ssp.*, *Adenovirus*, *Chlamydia trachomatis*, *Campylobacter jejuni*.

b) CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The clinical sensitivity and specificity were tested on 47 biological samples comparing the kit with a reference test (Xpert C. difficile Method). The results demonstrated an overall sensitivity of 100% and specificity of 100%.

c) INTRA-ASSAY PRECISION

In order to demonstrate the reproducibility of the test within the same analytical session, 2 positive samples, 2 negative samples, 1 positive control and 1 negative control were tested in 4 replicates in the same run. Results show 100% of accuracy between expected and obtained results. CV% is below 10% in agreement with the acceptance criteria.

d) INTER-ASSAY PRECISION

In order to demonstrate the reproducibility of the test among different analytical sessions, 2 positive samples, 2 negative samples, 1 positive control and 1 negative control were tested as single replicates in 4 independent runs. Results show 100% of accuracy between expected and obtained results. CV% is below 10% in agreement with the acceptance criteria.

BIBLIOGRAPHY

"Toxin B is essential for Virulence of Clostridium difficile", Nature-07822 – D.Lyras et al., 2009

TROUBLESHOOTING

Problem 1: Weak or no signal of Positive Control, C1.

1. The PCR conditions did not comply with the instructions. All sample results are IVALID:
 - Check the amplification protocol and select the fluorescence channel reported in the manual.
2. Deterioration of dyes and/or primers. The reagents storage conditions did not comply with the instructions:
 - Check storage conditions.

Problem 2: Weak or no signal of the Internal Control, C2 in unknown samples AND Reaction Blank BM.

1. The PCR was inhibited:
 - Make sure to use a recommended DNA purification method and carefully follow the manufacturer's instructions.
2. Pipetting error due to omitted reagents or samples:
 - Repeat the analysis starting from the PCR.
3. Deterioration of dyes and/or primers. The reagents storage conditions did not comply with the instructions:
 - Check storage conditions.
4. Very low starting amount and/or low purity of genomic DNA. Improper DNA extraction:
 - Repeat the DNA purification.
5. Wrong channel/filter was chosen. The PCR conditions did not comply with the instructions:
 - Check the PCR conditions and select the fluorescence channels reported in the protocol for the Unknown Sample detection.

Problem 3: FAM signal in Reaction Blank BM.

1. Contamination during PCR preparation procedure. All samples results are INVALID:
 - Decontaminate the working area and all instruments.
 - Pipette the controls C1 and C2 at last.
 - Repeat the PCR preparation using a new set of reagents.

Problem 4: No FAM and HEX signals in unknown sample.

1. The PCR was inhibited:

- Make sure to use a recommended DNA purification method and carefully follow the manufacturer's instructions.

Problem 5: Wide Fluctuations in fluorescence values.

1. The PCR Master Mix is not well prepared:
 - Carefully repeat the PCR preparation procedure.
2. Air bubbles trapped in the PCR tubes:
 - Check the presence of air bubbles before starting a new run.

Problem 6: Absence of any fluorescent signal.

1. Verify the performance of the thermal cycler:
 - Calibrate the equipment.
2. Deterioration of dyes and/or primers. The storage conditions did not comply with the instructions:
 - Check storage conditions.
 - Check the expiry date of the kit.

Problem 7: The thermal cycler gives an error message.

1. Refer to the real-time PCR instrument user manual or contact the local technical support of the real-time PCR instrument company.

Problem 8: The kit reagents left out of the storage range temperature.

1. These reagents must be stored **as indicated** for a proper execution of the test. The performance of the product is not guaranteed if the reagents have not been properly stored.

This page left intentionally blank



Duplica^{RealTime} Advanced *C. Difficile* A/B Kit

REV. EBR026032_IFU_REV.06D_ENITA

REF: EBR026032- 32 test

Istruzioni Per l'Uso

FINALITA' E SCOPO D'USO

Duplica^{RealTime} Advanced *Clostridium Difficile* A/B Kit è un test di amplificazione di acidi nucleici *in vitro* per la ricerca dei geni codificanti le tossine A e B di *Clostridium difficile* da feci. Il dispositivo è destinato alla rilevazione della presenza di un agente infettivo e alla determinazione dello stato di malattia infettiva.

INTRODUZIONE

Clostridium difficile è considerato un patogeno emergente e negli ultimi anni è stato riconosciuto come causa sempre più importante di infezioni nosocomiali. Si tratta di un Gram positivo – sporigeno - anaerobio ed è l'agente eziologico di diverse malattie diarroiche indotte dal trattamento con antibiotici o dalla rottura della normale flora gastrointestinale. Queste sindromi sono note collettivamente come infezioni da *C. difficile* o CDI, e comprendono la colite pseudomembranosa, megacolon tossico, e possono portare a infezione cronica, shock e morte. La sua capacità di sporificare e la conseguente persistenza ha permesso a *C. difficile* di diventare molto comune negli ambienti ospedalieri ed è oggi la principale causa di diarrea infettiva negli ospedali di tutto il mondo.

Si pensa che fra i principali fattori di virulenza di *C. difficile* ci siano le tossine A e B. Queste tossine sono codificate dai geni *tcdA* e *tcdB*, rispettivamente, che si trovano all'interno del locus patogenico PaLoc di 19,6 kb.

Sia la tossina A che B sono pro-infiammatorie e citotossiche e causano la rottura dei filamenti di actina nel citoscheletro e danni delle giunzioni strette nelle cellule epiteliali intestinali umane, con conseguente accumulo di liquidi e ingenti danni all'intestino crasso.

PRINCIPIO DEL TEST

Duplica^{RealTime} Advanced *Clostridium Difficile* A/B Kit è un test molecolare basato sul riconoscimento del DNA di *Clostridium Difficile*. I reagenti per la reazione di amplificazione sono pronti all'uso e suddivisi in tre mix di reazione:

- **AMPLIFICAZIONE MIX:** contenente Hot Start Taq DNA polimerasi, nucleotidi, MgCl₂ e buffer.
- **OLIGO MIX:** contenente i primers e le sonde fluorogeniche.
- **CONTROLLO INTERNO:** permette di verificare l'avvenuta reazione di amplificazione.

Duplica^{RealTime} Advanced *Clostridium Difficile* A/B Kit è basato sul riconoscimento specifico e amplificazione di sequenze target di PCR e sulla rilevazione simultanea dei prodotti di PCR tramite sonde fluorescenti. Vengono usate due sonde marcate con un differente fluoroforo per ogni sequenza investigata; in particolare la sonda per il target specifico porta all'estremità 5' il fluoroforo FAM (6-carbossi-fluoresceina) mentre l'altra sonda, che va a rilevare il controllo interno, ha legato il fluoroforo HEX (esa-cloro-fluoresceina). Entrambe le sonde hanno all'estremità 3' un quencher non fluorescente. In seguito ad eccitazione, la sonda integra non emette fluorescenza, in quanto la vicinanza del quencher al reporter impedisce a quest'ultimo l'emissione della fluorescenza (effetto di quenching).

COMPOSIZIONE DEL KIT

Questo kit è stato realizzato per poter eseguire 32 reazioni se utilizzato in 4 sessioni analitiche con 6 campioni, 1 **Controllo Positivo (Controllo 1, C1)**, e 1 **Bianco di Reazione (BM)** ciascuna.

Componenti del kit

Reagenti	Codice Colore	Conservazione (range, °C)	Volume (µl)	Quantità (tubi)
Oligo Mix (OM)*	Tappo Verde	-22÷-18	400	1
Amplification Mix (AM)	Tappo Blu	-22÷-18	400	1
Controllo 1 (C1, C. Positivo)	Tappo Rosso	-22÷-18	>50	1
Controllo 2 (C2, C. Interno)	Tappo Giallo	-22÷-18	>50	1
Bianco di Reazione (BM)	Tappo Neutro	-22÷-18	>50	1

*la provetta deve essere conservata lontano dalla luce

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Tutti i reagenti devono essere conservati a **-22÷-18°C** fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. Non scongelare e ricongelare il prodotto più di sei volte.

MATERIALE NECESSARIO NON FORNITO

- Kit di estrazione per la purificazione del DNA (fare riferimento alla sezione specifica del relativo manuale d'uso)
- Tubi ottici o micropiastre ottiche per Real Time PCR
- Guanti senza talco e camice da laboratorio monouso
- Micropipette (5 -20 µl, 20-200 µl e 100-1000 µl)
- Puntali con filtro RNasi/DNasi-free
- Porta provette
- Vortex
- Centrifuga da tavolo
- PCR box
- Refrigeratore
- Congelatore
- Termociclatore per Real Time PCR

Il kit è stato validato per le piattaforme di Real time PCR: RotorGene® Q (Qiagen), DX®/CFX (Biorad), AB7500 (Life Technologies) e q16/q32 (Novacyt). Altre marche e modelli devono essere pienamente testati e valutati per prestazioni ottimali da parte dell'utente prima di refertare i risultati.

La strumentazione deve essere mantenuta regolarmente, in accordo con le istruzioni del produttore, e calibrato in modo da assicurare prestazioni ottimali.

PRECAUZIONI E RACCOMANDAZIONI

- È buona pratica suddividere il laboratorio in tre aree distinte: estrazione del DNA, preparazione della miscela di PCR, e manipolazione dei controlli forniti con il kit. Ogni area deve essere completa di cappa a flusso laminare e di un set di pipette dedicato.
- Clonit offre se richiesto ai suoi clienti il supporto tecnico necessario per il corretto utilizzo del kit
- Leggere attentamente questo manuale di Istruzioni Per l'Uso prima di utilizzare il kit
- Non utilizzare reagenti dopo la data di scadenza
- Scongelare e miscelare attentamente i reagenti prima dell'utilizzo
- Non mescolare reagenti provenienti da lotti diversi del prodotto
- Usare pipette e strumentazione tarata e controllata regolarmente
- Usare attrezzatura di laboratorio dedicata e cambiare spesso i guanti
- Pulire regolarmente l'area di lavoro con ipoclorito al 0,5%
- Utilizzare i guanti senza talco ed evitare di lasciare impronte sui tappi ottici per PCR.
- I materiali contenenti o sospettati di contenere agenti infettivi devono essere sempre manipolati all'interno di una stanza a sicurezza microbiologica e sotto una cappa biologica Biohazard.
- In caso di imballo danneggiato del kit, prima dell'utilizzo contattare l'assistenza tecnica
- Non utilizzare il prodotto se conservato in condizioni ambientali diverse da quelle riportate in etichetta e descritte nella specifica sezione di questo manuale di Istruzioni Per l'Uso.
- In caso di sversamento del contenuto del kit riferirsi alla Scheda di Sicurezza specifica del prodotto (Material Safety Data Sheet, MSDS; disponibile su richiesta).
- I reagenti del kit, le misure di protezione individuali, i materiali utilizzati, e i residui dei campioni biologici e del test vanno smaltiti in conformità con le norme in vigore nel Paese di utilizzo.
- Il trattamento farmacologico potrebbe interferire con il risultato finale.

PROTOCOLLO OPERATIVO

a) Gestione del campione

- Raccogliere il campione di feci in un contenitore pulito, sigillato e senza sostanze conservanti.
- I campioni dove essere conservati fra +2°C e +8°C e idealmente testati immediatamente o nell'arco di 24 ore. In alternativa, i campioni devono essere immediatamente congelati al ricevimento, e conservati fino ad un massimo di 10 giorni ad una temperatura uguale o inferiore a -20°C.

b) Preparazione del campione

- Miscelare le feci il più possibile.
- Per la preparazione dei campioni Clonit raccomanda Copan Fecal Swab. Aprire la confezione del tampone; rimuovere il tubo ed il tampone e raccogliere il campione.
- Per campioni solidi: raccogliere una porzione di 3-4 mm di feci mescolate.
- Svitare il tappo asetticamente e inserire il tampone nel tubo; rompere l'applicatore nel punto indicato dalla linea colorata; reinserire il tappo sul tubo e avvitarlo strettamente.
- Per campioni liquidi e semiliquidi: ruotare tre volte il tampone nel campione (in caso di feci semiliquide non raccogliere feci con un diametro maggiore di 3-4 mm).
- Svitare il tappo asetticamente e inserire il tampone nel tubo; rompere l'applicatore nel punto indicato dalla linea colorata; reinserire il tappo sul tubo e avvitarlo strettamente.

c) Purificazione del DNA

- Vortexare la provetta contenente il tampone per 5-10 secondi fino a che la soluzione diventa omogenea.
- Raccogliere 200 µl di mezzo di trasporto e processare con lo strumento Duplica[®]Prep
- I campioni dovrebbero essere purificati lo stesso giorno della raccolta.

Per la purificazione del DNA Clonit raccomanda:

Duplica[®]Prep NA Body Fluid kit (ref. EDI004200) per Duplica[®]PREP Automatic Extractor (ref. EDI001).

Altri reagenti e metodi di estrazione devono essere pienamente testati e valutati per prestazioni ottimali da parte dell'utente prima di refertare i risultati.

d) Programmazione del termociclatore

Importante prima dell'allestimento della corsa: Riferirsi al Manuale Utente per istruzioni dettagliate sul funzionamento del sistema e per inserire il profilo termico riportato nella tabella: **Profilo Termico**. Si consiglia di accendere lo strumento e di impostare il profilo termico prima di preparare la miscela di reazione.

NB: prima di iniziare la corsa si consiglia di salvare il file come "Advanced Clostridium Difficile A/B Test" in questo modo è possibile salvare il profilo termico con le relative impostazioni e di richiamarle in esecuzioni successive.

Piattaforma Rotor-Gene[®] Q

- Avviare il programma e selezionare *Advanced* nella finestra *New Run*
- Selezionare *new template* in *Empty Run* oppure un template già esistente
- Selezionare il Tipo di Rotore dello strumento in uso e poi *Next*
- Indicare 25 µl come volume di reazione e poi *Next*
- Selezionare *Edit Profile* impostare il profilo termico come indicato in tabella
- Selezionare *Gain Optimisation* e attivare la funzione *Perform Optimisation before 1st acquisition*
- In *Channel Settings* selezionare *green/yellow fluorophores* e la posizione "1" per effettuare l'ottimizzazione. Chiudere la finestra e selezionare *Next*, infine *Start Run*.

Piattaforma DX[®]/CFX

- Selezionare *Create a new Experiment*
- Nella sezione *Protocol* impostare il profilo termico in *Create New* come indicato in tabella
- Selezionare i campioni e impostare i fluorofori FAM e HEX nel menu *Plate Editor*.

Piattaforma Applied Biosystems® 7500

- Selezionare *Create a New Experiment*
- Nella sezione Experiment Properties definire il nome e il tipo di esperimento (*Quantitation-Standard Curve*)
- Impostare il tipo di tecnologia (*Taqman® Reagents*), la modalità di esecuzione (Run Mode: 7500 o 7500 Fast) e la velocità di ramping (Ramp Speed: Standard)
- Nel menu *Setup* selezionare *Run Method* e impostare il profilo termico come indicato in tabella
- Nel menu *Setup* selezionare *Plate Setup-Define Targets and Samples* per selezionare i campioni e assegnare il target VIC al controllo interno (C2) e FAM al controllo positivo (C1).
- Nella sezione *Define Samples* inserire il nome del campione
- Selezionare i pozzetti in uso in *Plate Setup-Assign Targets and Samples*
- Selezionare None nella tendina Select the dye to use as the passive reference

Piattaforma q16/q32

- Selezionare *New* e scegliere il protocollo appropriato (le condizioni della corsa saranno caricate automaticamente senza la necessità di impostarle manualmente).
- Nella sezione *Samples* inserire i nomi dei campioni.
- I controlli positivi e negativi devono essere posizionati negli specifici pozzetti indicati dal software.
- Per lo strumento q32 assicurarsi che le posizioni A1, A8, D1, D8 conterranno una provetta in modo da bilanciare il coperchio riscaldato.
- Per iniziare la corsa selezionare l'opzione *Start Run*, e in seguito scegliere il percorso dove salvare il file e lo strumento appropriato.
- Per iniziare una corsa da un drive USB, nella scelta dello strumento selezionare *Start run from USB* e in seguito scegliere la lettera dell'unità contenete il drive USB. Inserire il drive USB nello strumento. La corsa inizierà automaticamente (confermato da un suono nel Q16 o dal cambiamento di colore dei led da arancione a blu nel Q32).

Tabella: Profilo Termico (comune per le piattaforme)

TEMPO	TEMPERATURA	CICLI
5 min	95 °C	1
15 sec	95 °C	X 15 Acquisizione fluorescenza off
60 sec	63 °C	
15 sec	95 °C	X 45 Acquisizione fluorescenza on
60 sec	53 °C	

d) Preparazione della PCR mix

Il volume totale della reazione è di **26 µl**.

Per ogni esperimento preparare una mix di PCR per il controllo positivo (**C1**), il **Bianco di Reazione (BM)** e **n+1** campioni. Il controllo interno di amplificazione (**C2**) deve essere aggiunto direttamente alla mix di PCR, prima che questa venga aliquotata. La mix deve essere preparata miscelando i reagenti come indicato in tabella:

REAGENTI	VOLUME (µl)
Amplification mix	10
Oligo mix	10
Controllo Interno C2	1
DNA Estratto	5

Non conservare la mix di PCR ma prepararla fresca ogni volta

Terminata la preparazione della mix, aliquotare **21 µl** della **Master Mix** nelle provette o nei pozzetti della micropiastra per PCR e aggiungere in ogni provetta/pozzetto **5 µl** di **DNA estratto** o **Controllo Positivo**; disporre le provette o la piastra all'interno dello strumento e avviare il programma di amplificazione precedentemente impostato. Al termine del protocollo di amplificazione, rimuovere le provette o la piastra dal termociclatore.

e) ANALISI ed INTERPRETAZIONE dei RISULTATI

Importante prima dell'analisi della corsa: Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, riferirsi al Manuale Utente. **Valutare sempre visivamente, per ciascun campione testato, le curve di amplificazione rispetto ai valori di C_T ottenuti con il software d'analisi.**

Interpretazione dei Risultati

Fare riferimento al manuale d'uso specifico per la piattaforma in uso per visualizzare le curve di amplificazione di tutti i campioni in analisi. L'analisi dettagliata dei dati grezzi dipende dallo strumento utilizzato. La linea di base del rumore di fondo del segnale fluorescente può essere settata sia in automatico sia a un numero di cicli predefinito. Per le piattaforme q16/q32, i valori di C_T (C_q) calcolati si trovano nella sezione *Results*. Le threshold per il calcolo del C_q vengono applicate automaticamente dal software e non possono essere modificate.

- La fluorescenza di ogni canale indica l'ibridazione di una sonda specifica per un target:
 - o **Canale 1 per FAM/Green= sonda associata al Target**
 - o **Canale 2 per HEX/Cy3/Yellow= sonda associata al Controllo Interno.**
- Quando si registra un segnale a livello del fluoroforo FAM/Green ($C_T > 0$), il campione è sicuramente positivo, ed il segnale rilevato dal fluoroforo **HEX/Cy3/Yellow** ($C_T \geq 0$) non è rilevante.
- Quando non si registra segnale a livello di Fluoroforo **FAM/Green** ($C_T = 0$), per confermare la negatività del risultato, si deve verificare la corretta amplificazione del controllo interno e quindi la comparsa di un segnale di fluorescenza a livello del Fluoroforo **HEX/Cy3/Yellow** ($C_T > 0$). Solo in questo caso si può refertare il campione come negativo.
- Se nessun segnale viene rilevato, la PCR è stata inibita. Il campione deve essere ripetuto, si suggerisce di effettuare una diluizione 1:10 del DNA target.

È importante verificare che:

- Il Bianco deve essere positivo nel canale **HEX/Cy3/Yellow** e negativo nel canale **FAM/Green**.
- Il Controllo Positivo deve essere positivo sia nel canale **FAM/Green** che nel canale **HEX/Cy3/Yellow**. Il segnale **HEX/Cy3/Yellow** può uscire tardivamente o non uscire affatto per competizione. Solo in questo caso la presenza del segnale **HEX/Cy3/Yellow** non è rilevante e la corsa comunque valida.

Se si verificano tutte queste condizioni la corsa è valida ed è possibile analizzare i dati, altrimenti la corsa non è valida. È responsabilità dell'operatore validare la corsa controllando che queste condizioni si siano verificate.

Tabella di Interpretazione dei Risultati

FAM/Green	HEX/Cy3 /Yellow	Risultato
$C_T > 0$	Non rilevante ($C_T \geq 0$)	POSITIVO
$C_T = 0$	$C_T > 0$	NEGATIVO
$C_T = 0$	$C_T = 0$	INIBIZIONE

PERFORMANCE ANALITICHE E CLINICHE

a) SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica del test è stata determinata utilizzando DNA genomico purificato e quantificato a concentrazione nota. Il test è stato eseguito in quattro giorni diversi su 20 replicati: la sensibilità analitica ottenuta è risultata inferiore alle 10 copie/reazione.

La Specificità analitica del kit Duplica^{Real Time} *Advanced C. Difficile A/B* Kit è stata garantita dal corretto design di primers e sonde e dalle condizioni stringenti in cui viene effettuata la prova. Primers e sonde sono stati controllati per possibili omologie con altre sequenze pubblicate in diverse banche dati, senza mai riscontrare appaiamenti aspecifici. La Specificità analitica è stata valutata testando sperimentalmente la cross-reattività del kit Duplica^{Real Time} *Advanced C. Difficile A/B* Kit contro potenziali microrganismi interferenti. Nessuno dei seguenti patogeni ha dato segnali di cross-reattività: *Aspergillus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Legionella ssp.*, *Adenovirus*, *Chlamydia trachomatis*, *Campylobacter jejuni*.

b) SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ CLINICA

La sensibilità e specificità clinica sono state testate su 47 campioni biologici confrontando il kit con uno standard di riferimento (Xpert C. difficile). I risultati hanno dimostrato una sensibilità del 100% e una specificità del 100%.

c) PRECISIONE INTRA-ASSAY

Al fine di dimostrare la riproducibilità del kit all'interno della stessa sessione analitica, 2 campioni positivi, 2 campioni negativi, 1 controllo positivo e 1 controllo negativo sono stati testati in 4 replicati nella stessa prova. I risultati mostrano una accuratezza del 100% tra i risultati attesi e quelli ottenuti. Il CV% è inferiore al 10% in accordo con i criteri di accettazione.

d) PRECISIONE INTER-ASSAY

Al fine di dimostrare la riproducibilità del kit tra diverse sessioni analitiche, 2 campioni positivi, 2 campioni negativi, 1 controllo positivo e 1 controllo negativo sono stati testati come singoli replicati in 4 prove indipendenti. I risultati mostrano una accuratezza del 100% tra i risultati attesi e quelli ottenuti. Il CV% è inferiore al 10% in accordo con i criteri di accettazione.

BIBLIOGRAFIA

"Toxin B is essential for Virulence of Clostridium difficile", Nature-07822 – D.Lyras et al., 2009

TROUBLESHOOTING

Problema 1: Segnale debole o assente nel controllo nel Controllo Positivo, C1.

1. Le condizioni di PCR non rispecchiano le istruzioni riportate:
 - Verificare il protocollo di amplificazione e selezionare il canale di fluorescenza riportato nel manuale.
2. Deterioramento dei fluorofori/primers. Le condizioni di stoccaggio dei reagenti non sono conformi alle istruzioni riportate nel manuale d'uso.

Problema 2: Segnale debole o assente nel Controllo Interno, C2 in campioni ignoti E nel bianco di Reazione, BM.

1. La PCR è stata inibita:
 - Assicurarsi di utilizzare un metodo di estrazione di DNA validato e seguire attentamente le istruzioni riportate nel manuale d'uso del produttore.
2. Errore nel pipettaggio per omissione di un reagente o del campione:
 - Ripetere l'analisi partendo dalla PCR.
3. Deterioramento dei fluorofori/primers. Le condizioni di stoccaggio non sono conformi alle istruzioni riportate nel manuale d'uso:
 - Verificare le condizioni di conservazione del kit.
4. Quantità di DNA insufficiente e/o di bassa purezza. Estrazione di DNA inefficiente:
 - Ripetere l'estrazione del DNA.
5. Selezione del canale/filtro sbagliato. Le condizioni di preparazione di PCR non sono conformi alle istruzioni riportate nel manuale d'uso:
 - Verificare le condizioni di PCR e selezionare i canali di fluorescenza riportati nel protocollo per la rilevazione del campione ignoto.

Problema 3: Presenza di segnale FAM nel Bianco di Reazione BM.

1. Contaminazione durante la procedura di estrazione del DNA. Tutti i risultati sono da considerarsi INVALIDI:
 - Decontaminare il piano di lavoro e tutti gli strumenti.
 - Manipolare i controlli C1 e C2 solo alla fine.
 - Ripetere la PCR utilizzando un nuovo set di reagenti.

Problema 4: Nessun segnale di FAM e HEX in campioni ignoti

1. La PCR è stata inibita:
 - Assicurarsi di utilizzare un metodo di estrazione di DNA validato e seguire attentamente le istruzioni riportate nel manuale d'uso del produttore.

Problema 5: Ampie fluttuazioni nei valori di fluorescenza.

1. La Master Mix di PCR non è stata miscelata bene:
 - Ripetere attentamente la procedura di preparazione della PCR.
2. Presenza di bolle d'aria nei tubi/piastra di PCR:
 - Eliminare le eventuali bolle presenti prima di iniziare una nuova corsa.

Problema 6: Assenza completa di segnale.

1. Controllare le prestazioni del termociclatore:
 - Effettuare la calibrazione dello strumento.
2. Deterioramento dei fluorofori/primers. Le condizioni di stoccaggio non sono conformi alle istruzioni riportate nel manuale d'uso:
 - Verificare le condizioni di conservazione del kit.
 - Verificare la data di scadenza del kit.

Problema 7: Il termociclatore dà un messaggio di errore.

1. Consultare il manuale di Istruzioni Per l'Uso dello strumento o contattare il supporto tecnico.

Problema 8: I reagenti del kit sono stati lasciati fuori dall'intervallo di temperatura di stoccaggio.

1. Questi reagenti devono essere conservati **come indicato** per una corretta esecuzione del test. Le prestazioni del prodotto non sono garantite se questi reagenti non sono stati correttamente conservati.

Legenda dei Simboli Utilizzati Key to symbols used			
	Codice del prodotto <i>Catalogue number</i>		Limitazioni di temperatura <i>Temperature limitation</i>
	Dispositivo medico diagnostico in vitro <i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i>		Revisione <i>Revision</i>
	Numero di lotto <i>Batch code</i>		Leggere le istruzioni d'uso <i>Consult instructions for use</i>
	Data di scadenza <i>Use by</i>		Sufficiente per un <n> di test <i>Contains sufficient for <n> tests</i>
	Fabbricante <i>Manufacturer</i>		Conforme ai requisiti della Direttiva 98\79\CE <i>According to 98/79/CE Directive</i>



CLONIT S.r.l.

Headquarter: Via Varese 20 – 20121 Milano

Production Site: Via Umberto Saba, 25 - 20081 Abbiategrasso (MI)

Tel. + 39. (0)2.56814413 fax. +39. (0)2.56814515

www.clonit.it - info@clonit.it

