

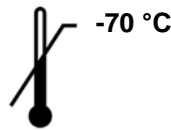
# Prodesse<sup>®</sup> ProGastro<sup>™</sup> Cd

## Istruzioni per l'uso

*Per la rilevazione del Clostridium difficile tossigeno*



100



**REF**

E38VK00/E38VK55

<b>Sommario</b>	
<b>Uso previsto</b> .....	<b>3</b>
<b>Descrizione e spiegazione</b> .....	<b>3</b>
<b>Principi della procedura</b> .....	<b>4</b>
<b>Materiali forniti</b> .....	<b>4</b>
<b>Materiali necessari ma non forniti</b> .....	<b>5</b>
<b>Avvertenze e precauzioni</b> .....	<b>6</b>
<b>Conservazione, manipolazione e stabilità dei reagenti</b> .....	<b>6</b>
<b>Prelievo, manipolazione e conservazione dei campioni</b> .....	<b>7</b>
<b>Preparazione di reagenti e controlli</b> .....	<b>8</b>
<b>Procedura del saggio</b> .....	<b>9</b>
Descrizione del saggio: .....	9
Preparazione: creare il protocollo del saggio di ricerca .....	9
1. Preparare i campioni e il controllo negativo .....	11
2. Isolare l'acido nucleico (Area di preamplificazione I) – Sistema NucliSENS easyMAG .....	13
3. Preparare la reazione PCR (Area di preamplificazione II) .....	15
4. Eseguire il saggio ProGastro Cd .....	16
5. Stampare il referto .....	16
<b>Interpretazione dei risultati dei controlli</b> .....	<b>16</b>
<b>Interpretazione dei risultati dei campioni</b> .....	<b>17</b>
<b>Controllo della qualità</b> .....	<b>17</b>
<b>Limitazioni</b> .....	<b>18</b>
<b>Valori previsti</b> .....	<b>18</b>
<b>Caratteristiche prestazionali</b> .....	<b>19</b>
Efficacia clinica .....	19
Riproducibilità .....	20
Sensibilità analitica .....	21
Reattività .....	21
Specificità analitica .....	21
Interferenza .....	22
Carry-over/Contaminazione crociata .....	23
<b>Smaltimento</b> .....	<b>23</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>23</b>
<b>Informazioni per il contatto</b> .....	<b>24</b>
<b>Legenda dei simboli</b> .....	<b>24</b>
<b>Nota per l'acquirente</b> .....	<b>25</b>

## Usso previsto

Il saggio ProGastro™ Cd è un test diagnostico PCR real-time *in vitro* per la determinazione qualitativa degli acidi nucleici del *Clostridium difficile* tossigeno, isolati e purificati da campioni di feci liquide o morbide prelevate da pazienti sintomatici. Questo test è mirato per il gene della tossina B del *Clostridium difficile* (*tcdB*) e ha lo scopo di facilitare la diagnosi delle infezioni da *Clostridium difficile* tossigeno.

## Descrizione e spiegazione

Il *Clostridium difficile* (*C. diff*) è un bacillo anaerobio gram-positivo che produce spore.<sup>1</sup> Esistono due gruppi principali di *C. diff* comprendenti ceppi tossigeni e non tossigeni. I ceppi tossigeni sono responsabili dell'infezione da *Clostridium difficile* (CDI, *Clostridium difficile* Infection). La presentazione clinica della CDI varia dalla diarrea associata ad antibiotici (AAD), alla colite pseudomembranosa e al megacolon tossico.<sup>1-3</sup> L'infezione avviene per via oro-fecale. La CDI si verifica nei pazienti a seguito di un'alterazione nella normale microflora del colon, spesso provocata da trattamento antibiotico e dopo un'esposizione e un'ingestione di spore e di cellule vegetative.<sup>3</sup> I sintomi della CDI iniziano generalmente due o tre giorni dopo l'inizio del trattamento antibiotico, anche se sono stati osservati casi in cui i sintomi non sono risultati evidenti prima di un periodo variabile da due a dieci settimane dopo la fine della terapia antibiotica.<sup>1,4</sup>

La CDI è una malattia mediata da tossina e la maggior parte dei ceppi di *C. diff* produce due tossine: la Tossina A (un'enterotossina) e la Tossina B (una citotossina). Tuttavia sono stati isolati ceppi di Tossina A-/B+.<sup>5</sup> Nonostante la segnalazione dei ceppi di Tossina A+/B-, l'incidenza di queste varianti appare estremamente bassa, in quanto sono stati osservati pochi casi e soltanto uno è stato confermato.<sup>6</sup> Sebbene i ceppi di Tossina A+/B+ e di Tossina A-/B+ siano presenti nella popolazione, i ceppi di Tossina A+/B+ sono quelli attualmente dominanti.<sup>5</sup>

Sporadicamente si verificano epidemie di CDI dovute alla natura nosocomiale dell'infezione e alla difficoltà di decontaminazione delle spore batteriche dopo il loro ingresso in ambiente ospedaliero.<sup>3</sup> La popolazione a rischio di infezione è costituita principalmente dai pazienti istituzionalizzati (negli ospedali e nelle case di cura) che hanno ricevuto un trattamento antibiotico. La più alta prevalenza di CDI si verifica tra i pazienti anziani e immunocompromessi, con l'80% di casi in soggetti di età superiore a 65 anni, anche se la CDI può insorgere in tutte le fasce di età.<sup>1</sup> Pur essendo generalmente considerata un'infezione legata alle strutture sanitarie, esistono recenti segnalazioni di infezione da *Clostridium difficile* associata alla comunità.<sup>7-10</sup>

## Principi della procedura

Il saggio ProGastro Cd rileva il *Clostridium difficile* tossigeno e un controllo interno mediante un processo di estrazione dell'acido nucleico dai campioni dei pazienti, seguito da amplificazione PCR e rilevazione. Dopo il prelievo di un campione di feci morbide o liquide da un paziente sintomatico, una parte di tale campione è diluito in un tampone per il trasporto e il recupero delle feci (S.T.A.R., *Stool Transport and Recovery*), mentre i solidi sono separati mediante centrifugazione (chiarificazione fecale). Prima dell'estrazione il controllo interno viene aggiunto al campione per il monitoraggio degli inibitori PCR eventualmente presenti. Gli acidi nucleici del campione sono estratti e purificati per mezzo del sistema NucliSENS easyMAG (bioMérieux) e dei reagenti per estrazione magnetica automatica (bioMérieux). Utilizzando lo strumento Cepheid SmartCycler II si aggiungono degli acidi nucleici alla miscela di *C. diff* per la successiva amplificazione PCR e rilevazione.

La miscela di *C. diff* contiene primer e sonde a base di oligonucleotidi per il gene *tcdB* dei ceppi tossigeni del *C. diff*. Le sonde hanno un doppio marcatore con un colorante reporter legato all'estremità 5' e un colorante quencher legato all'estremità 3' (v. tabella seguente). Durante l'amplificazione PCR avviene l'annealing dei primer e delle sonde al template (se presente), seguito dall'estensione del primer e dall'amplificazione del template. L'attività esonucleasica 5'-3' della Taq polimerasi scinde la sonda, separando il colorante reporter dal colorante quencher e generando un aumento del segnale fluorescente. L'entità della fluorescenza in un determinato momento del ciclo dipende dalla quantità del prodotto di amplificazione presente. Lo strumento SmartCycler II e il software controllano il processo, interpretano i dati e, al termine, presentano un referto.

Analita	Gene target	Fluoroforo sonda	Picco assorbanza	Picco emissione	Canale strumentale
<i>Clostridium difficile</i>	<i>tcdB</i> , Tossina B	FAM	495 nm	520 nm	FAM
Controllo interno	NA	Quasar 670	647 nm	667 nm	Cy5

## Materiali forniti

### Kit per saggio ProGastro Cd (cod. art. E38VK00)

Reagenti	Descrizione	Quantità/P rovetta	Colore tappo	Cod. art.	Reazio ni/Prov etta
Miscela <i>C. diff</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Taq DNA polimerasi</li> <li>➤ 2 paia di primer oligonucleotidici</li> <li>➤ 2 sonde oligonucleotidiche</li> <li>➤ Tampone contenente dNTP</li> <li>➤ MgCl<sub>2</sub> e stabilizzatori</li> </ul>	1 ml x 2 provette	Marrone	ESM38	50
Controllo interno (IC) – Controllo interno DNA II	➤ DNA a doppio filamento non infettivo	30 µl	Trasparen te	GCT02	100
Controllo positivo (PC) – Controllo DNA <i>C. diff</i>	➤ Plasmide di DNA non infettivo contenente una parte del gene target ( <i>tcdB</i> )	30 µl	Blu	ECT64	15

### Kit per tampone S.T.A.R. (cod. art. E38VK55)

Reagenti	Descrizione	Quantità/Flacone	Cod. art.	Reazioni/Flacone
Tampone S.T.A.R.	➤ Tampone per trasporto e recupero feci	100 ml	GLS36	200

**Materiali necessari ma non forniti**
**Prodotti in plastica e materiali di consumo**

- Provette per microcentrifuga da 1,5 ml in polipropilene esenti da RNasi/DNasi
- Filtro sterile esente da RNasi/DNasi o puntali per micropipettatore a spostamento positivo (i puntali da 200 µl a foro largo sono utili per pipettare i campioni di feci. Altrimenti è possibile tagliare i puntali standard da 200 µl per pipettare le feci)
- Spatole monouso in plastica per campioni di feci non pipettabili.
- Materiali monouso NucliSENS easyMAG di bioMérieux (puntali per pipette Biohit, strip campioni)
- Piastre non rivestite Greiner Break Four (*bioMérieux, cod. art. 278303*)
- Provette per reazione PCR Cepheid, 25 µl

**Reagenti**

- Reagenti NucliSENS easyMAG di bioMérieux (*Tampone 1 cod. art. 280130, Tampone 2 cod. art. 280131, Tampone 3 cod. art. 280132, Silice magnetica cod. art. 280133 e Tampone di lisi cod. art. 280134*)
- Acqua ultrapura (esente da RNasi/DNasi)
- Controllo estrazione - raccomandato (*campione positivo precedentemente caratterizzato o campione simulato*)

**Attrezzature**

- Congelatore a  $\leq -70$  °C
- Agitatore vortex
- Microcentrifuga da banco a 13.000 g con alloggiamenti per provette per microcentrifuga da 1,5 ml in polipropilene
- Sistema NucliSENS easyMAG di bioMérieux con software versione 1.0.1 o 2.0
- Pipettatore multicanale Biohit
- Strumento real-time Cepheid SmartCycler II con software Dx versione 1.7b o 3.0a/3.0b
- Micropipettatori (capacità comprese tra 1-10 µl, 10-200 µl e 100-1000 µl)
- Minicentrifuga con adattatore per provette di reazione Cepheid
- Blocco di raffreddamento Cepheid
- Bagno ad acqua o incubatrice
- Ghiaccio/Contenitore del ghiaccio o blocco freddo a -20 °C
- Cabina di sicurezza biologica

## Avvertenze e precauzioni

- ⇒ Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.
- ⇒ L'uso di questo prodotto deve essere limitato al personale dotato di competenze nelle tecniche di PCR real-time.
- ⇒ Questo saggio deve essere eseguito su campioni di feci fresche liquide o morbide.
- ⇒ Le caratteristiche prestazionali non sono state determinate per pazienti di età inferiore a 2 anni.
- ⇒ I campioni devono essere considerati come infetti, ricorrendo a procedure di laboratorio sicure come quelle descritte in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (Sicurezza biologica nei laboratori microbiologici e biomedici) dei CDC/NIH (*Center of Disease Control/National Institute of Health*) e nel documento CLSI M29 *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections* (Protezione degli operatori di laboratorio dalle infezioni acquisite sul posto di lavoro). Pulire a fondo e disinfettare tutte le superfici con candeggina al 10%. Prima dello smaltimento, autoclavare gli eventuali rifiuti biologicamente pericolosi generati dal contatto con i campioni clinici.
- ⇒ Per tutte le procedure usare dei puntali con barriera aerosol o a spostamento positivo.
- ⇒ Pianificare, organizzare e segregare sempre in anticipo il flusso di lavoro. Il flusso di lavoro in laboratorio deve procedere in modo unidirezionale, iniziando dall'area di preamplificazione e passando all'area di amplificazione/rilevazione.
  - Iniziare le attività di preamplificazione con la preparazione dei reagenti e procedere con la preparazione dei campioni.
  - Disporre i materiali forniti e le attrezzature per separare l'area di preparazione dei reagenti da quella di preparazione dei campioni; non sono ammessi movimenti crociati tra le due aree.
  - Non usare le attrezzature e i materiali forniti impiegati per la preparazione dei reagenti per le attività di preparazione dei campioni o per pipettare o trattare altre fonti di acido nucleico.
  - Tenere sempre tutti i materiali forniti e le attrezzature da amplificazione nell'area di amplificazione/rilevazione.
  - Indossare sempre guanti monouso in ciascuna area e cambiarli prima di accedere a un'area diversa.
  - Non aprire le provette dei campioni dopo la PCR.
- ⇒ Aver cura di preservare la purezza dei reagenti del kit. Evitare la contaminazione da parte del controllo positivo, del controllo interno e dei campioni rispettando le buone pratiche di laboratorio.
- ⇒ Non usare i reagenti dopo la data di scadenza.
- ⇒ Non mescolare i reagenti con numeri di lotto diversi, né sostituirli con quelli di altri produttori.
- ⇒ Le schede tecniche di sicurezza (MSDS, *Material Safety Data Sheet*) sono disponibili sul sito web Gen-Probe Prodesse, Inc., [www.gen-probe.com](http://www.gen-probe.com), nella pagina **Package Inserts** (Istruzioni per l'uso).

## Conservazione, manipolazione e stabilità dei reagenti

- ⇒ Conservare tutti i reagenti (aperti e non aperti), tranne il tampone S.T.A.R., a  $\leq -70$  °C. Una volta aperto, il tampone S.T.A.R. deve essere conservato a temperatura ambiente.
- ⇒ **I controlli e le aliquote dei controlli devono essere scongelati e conservati sempre su ghiaccio durante la preparazione e l'uso.**
- ⇒ Controllare sempre la data di scadenza sulle provette dei reagenti. **Per gli stock intermedi del controllo positivo e del controllo interno, osservare la data di scadenza sulla provetta del controllo dello stock originario.** Non esporre i controlli a più di un (1) ciclo di congelamento-scongelo.
- ⇒ I reagenti ProGastro Cd sono spediti congelati e devono giungere in tale stato. La miscela di *C. diff* e i controlli devono essere conservati congelati dopo il ricevimento. Nel caso in cui non siano congelati al ricevimento o le provette abbiano subito danni durante il trasporto, rivolgersi al Servizio clienti per l'assistenza. Il tampone S.T.A.R. deve essere conservato a temperatura ambiente dopo il ricevimento.

- Uno studio interno ha dimostrato che le prestazioni della miscela di *C. diff* non subiscono deterioramenti fino a un massimo di 5 cicli di congelamento-scongelo.
- Prima di iniziare qualsiasi procedura di test verificare visivamente che il volume dei reagenti sia corretto.
- Proteggere la miscela di *C. diff* dalla luce.



*Ai laboratori con un numero di campioni più ridotto si consiglia di aliquotare i componenti del kit allo scopo di mantenere meno di 5 cicli di congelamento/scongelo.*

**Raccomandazione****Prelievo, manipolazione e conservazione dei campioni**
**Prelievo dei campioni**

Le procedure standard di prelievo e manipolazione delle feci sono indicate per l'ottenimento delle feci fresche. Le feci fresche devono essere sistemate in un contenitore sterile con tappo a vite adeguatamente sigillato.

**Trasporto dei campioni**

Assicurarsi che durante il trasporto dei campioni di feci umane siano rispettate tutte le normative vigenti in materia di trasporto di agenti eziologici.

**Conservazione dei campioni**

Conservare i campioni refrigerati (2-8 °C) per un massimo di 48 ore prima del test. Qualora la chiarificazione delle feci non possa essere eseguita entro 48 ore dal prelievo, i campioni dovranno essere conservati a ≤ -70 °C.

**Conservazione dell'acido nucleico purificato**

Conservare gli acidi nucleici purificati a ≤ -70 °C.


**Nota**

*Il prelievo, la conservazione e il trasporto inadeguati o inappropriati dei campioni possono produrre risultati falsi negativi.*

## Preparazione di reagenti e controlli

### Reagenti



Nota

Preparare i reagenti per il sistema NucliSENS easyMAG di bioMérieux rispettando le istruzioni del produttore.

### Controlli



Raccomandazione

- ❖ Per gli stock intermedi di controlli positivi e interni, osservare la data di scadenza indicata sulla provetta originaria.
- ❖ I controlli e le aliquote dei controlli devono essere scongelati e conservati sempre su ghiaccio/blocco freddo durante la preparazione e l'uso. Si consiglia di preparare i controlli nell'area per la preparazione dei campioni, come la cabina di sicurezza biologica.

### Controllo positivo (PC)



Nota

In ogni serie occorre includere il controllo positivo.

1. Scongellare il controllo positivo (provetta con tappo blu) su ghiaccio.
2. Creare delle provette con stock intermedi di controllo positivo ricorrendo al seguente schema di diluizione: (mescolare bene)

$$25 \mu\text{l di controllo positivo} + 225 \mu\text{l di acqua ultrapura} = 250 \mu\text{l di volume totale}$$

3. Preparare 15 aliquote di 15  $\mu\text{l}$  ciascuna, etichettarle e conservarle a  $\leq -70$  °C. Assicurarsi che le aliquote non subiscano più di un (1) ciclo di congelamento-scongellamento.
4. Diluire lo stock intermedio di controllo positivo immediatamente prima di allestire la reazione PCR (v. **Punto 3 (a)** della **Procedura del saggio**).



Nota

Non aggiungere il controllo interno al controllo positivo. Non prendere il controllo positivo mediante la procedura di isolamento dell'acido nucleico.

### Controllo interno (IC)

1. Scongellare il controllo interno (provetta con tappo trasparente) su ghiaccio.
2. Creare delle provette con stock intermedio di controllo interno ricorrendo al seguente schema di diluizione: (mescolare bene)

$$28 \mu\text{l di controllo interno} + 252 \mu\text{l di tampone S.T.A.R.} = 280 \mu\text{l di volume totale}$$

3. Preparare 8 aliquote di 35  $\mu\text{l}$  ciascuna, etichettarle e conservarle a  $\leq -70$  °C (una volta diluita alla concentrazione di lavoro, una aliquota produrrà un volume sufficiente per l'aggiunta a 30 campioni). Preparare delle aliquote di volumi maggiori o minori secondo il numero di campioni previsti in una singola serie di estrazione. Assicurarsi che le aliquote non subiscano più di un (1) ciclo di congelamento-scongellamento.
4. Diluire lo stock intermedio del controllo interno alla concentrazione di lavoro immediatamente prima dell'aggiunta ai campioni. Aggiungere il volume corretto della concentrazione di lavoro del controllo interno a ogni campione prima dell'isolamento dell'acido nucleico (v. **Punto 1 (b)** della **Procedura del saggio**).

### Controllo negativo (NC)

1. Usare il tampone S.T.A.R. come controllo negativo.
2. Aggiungere il volume corretto della concentrazione di lavoro del controllo interno al controllo negativo prima dell'isolamento dell'acido nucleico (v. **Punto 1 (c)** della **Procedura del saggio**).

### Controllo di estrazione (raccomandato)

La buona pratica di laboratorio raccomanda di includere un controllo di estrazione positivo in ogni serie di isolamento dell'acido nucleico. Il controllo di estrazione può consistere in un campione clinico precedentemente determinato come positivo al *C. diff* tossigeno mediante il saggio ProGastro Cd o un campione simulato. Il controllo di estrazione deve essere trattato come un campione.

Per creare un campione simulato:

1. Procurarsi un ceppo tossigeno di *C. diff*, disponibile in commercio.
2. Aggiungere il *C. diff* in feci negative a una concentrazione tale da ottenere un valore Ct pari a circa 20 – 40.
3. Chiarificare le feci addizionate (v. **Punto 1 (a)** del **Procedura del saggio**).
4. Preparare delle aliquote da 30 µl delle feci chiarificate, etichettarle e conservarle a ≤ -70 °C.

## Procedura del saggio

### Descrizione del saggio:

**Preparazione: creare il protocollo del saggio di ricerca per lo strumento Cepheid SmartCycler mediante il software Dx (solo la prima volta).**

1. **Preparare i campioni e il controllo negativo.**
2. **Isolare l'acido nucleico (Area di preamplificazione I) – sistema NucliSENS easyMAG di bioMérieux con reagenti per estrazione magnetica automatica**
3. **Allestire la reazione della PCR real time (Area di preamplificazione II)**
4. **Eseguire il saggio ProGastro Cd.**
5. **Stampare il referto.**



Nota

- ❖ Istruzioni fornite per lo strumento Cepheid SmartCycler II con software Dx versione 1.7b e 3.0a/3.0b.
- ❖ NON derogare alle impostazioni del protocollo definite in questa sezione.

### Preparazione: creare il protocollo del saggio di ricerca per lo strumento Cepheid SmartCycler mediante il software Dx (solo la prima volta)



Raccomandazione

- ❖ Il protocollo viene creato solo per il primo utilizzo e non deve essere ricreato per ogni serie di campioni.
- ❖ Consultare il manuale dell'operatore del software SmartCycler Dx per assistenza nella definizione dei protocolli del saggio.
- ❖ Per **definire** e **modificare** i protocolli del saggio di ricerca, l'utente deve disporre dei diritti amministrativi di accesso. In caso contrario i campi saranno disabilitati.



Nota

Il software Cepheid Dx interpreta i dati e indica la serie come VALIDA o NON VALIDA, secondo i risultati dei controlli positivo e negativo.

**Creazione del protocollo del saggio ProGastro Cd:**

- a. Lanciare l'applicazione software Cepheid Dx.
- b. Fare clic sulla casella **Define Assays** (Definisci saggi) nella parte superiore della schermata.
- c. Fare clic sulla casella **New Assay** (Nuovo saggio) nell'angolo inferiore sinistro della schermata (Dx 3.0a/3.0b: fare clic sulla casella **New** (Nuovo) nell'angolo inferiore sinistro della schermata).
- d. Inserire **Saggio ProGastro Cd** come protocollo del saggio nella finestra visualizzata.
- e. Fare clic su **OK**.
- f. Al centro della schermata **Define Assays** (Definisci saggi), selezionare **FTTC25** per **Dye Set** (Set coloranti) (per Dx 3.0a/3.0b: fare clic sulla scheda **Analysis Settings** (Impostazioni analisi) al centro della schermata e selezionare **FTTC25** per **Dye Set** (Set coloranti)).
- g. Selezionare **NC fails if: Any target criterion is positive** (NC non riuscito se: qualsiasi criterio target positivo) (per Dx 3.0a/3.0b: si tratta dell'impostazione predefinita nella scheda **Control Settings** (Impostazioni controlli)).
- h. Selezionare la casella **Require Lot Number** (Richiedi numero di lotto) (per Dx 3.0a/3.0b: fare clic sulla scheda **Advanced Settings** (Impostazioni avanzate) e selezionare la casella **Require Lot Number** (Richiedi numero di lotto)).
- i. Selezionare la casella **Use Patient IDs** (Usa ID paziente) (per Dx 3.0a/3.0b: nella scheda **Advanced Settings** (Impostazioni avanzate), verificare che la casella "Use Patient IDs" sia **deselezionata** per impostazione predefinita).
- j. Inserire i **parametri del termociclatore** nella sezione relativa al protocollo (metà inferiore della schermata **Define Assay** (Definisci saggio)).

Stadio 1			Stadio 2			Stadio 3		
Attesa			Ripetere 5 volte			Ripetere 40 volte		
Attesa			2- Ciclo termico			2- Ciclo termico		
Temp.	Sec.	Ottica	Temp.	Sec.	Ottica	Temp.	Sec.	Ottica
95	600	OFF	95	30	OFF	95	10	OFF
			55	60	ON	55	60	ON

**Gli stadi 4 – 10 restano INUTILIZZATI**

- k. Inserire le informazioni nella scheda **Analysis Settings** (Impostazioni analisi), come segue:
  - Le caselle grigie indicano impostazioni predefinite.

**Impostazioni delle analisi**

Canale	Nome colorante	Target	Uso	Analisi curva	Impost. soglia	Soglia manuale	Soglia autom.	Ciclo min. autom..	Ciclo max. autom..	Ciclo min. valido	Ciclo max. valido	Sottraz. fondo	Ciclo min. fondo.	Ciclo max. fondo.	Media boxCar	Soglia endpoint	NC IC %	Delta IC
1	FAM*	C. diff	Saggio**	Curva primaria	Soglia manuale	30	NA	5	10	13.0	45.0	On	5	40	0	30	10.0/ NA†	NA
2	TET*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	TxR*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	Cy5*	Controllo interno	Controllo interno	Curva primaria	Soglia manuale	32	NA	5	10	13.0	45.0	On	5	40	0	32	10.0/ NA†	NA

Canale 1 = C. diff; Canale 2 = non utilizzato; Canale 3 = non utilizzato; Canale 4 = controllo interno

\* Se i nomi dei coloranti non sono corretti, verificare che sia utilizzato il set di coloranti FTTC25

\*\* Dx 3.0a/3.0b = Target

† Dx 1.7b = 10; Dx 3.0a/3.0b = NA



**l.** Inserire le informazioni nella scheda **Control Settings** (Impostazioni controlli).

- ❖ Usare PC1 (Pos Cntrl 1) per il controllo positivo.
- ❖ Inserire **0** replicati per inattivare i controlli positivi PC2 e PC3.
- ❖ Usare NC1 (Neg Cntrl 1) per il controllo negativo.
- ❖ Inserire **0** replicati per inattivare i controlli negativi NC2 e NC3.
- ❖ Le caselle grigie indicano impostazioni predefinite.
- ❖ Inserire il controllo di estrazione (se usato) come un campione nella serie PCR. Non definirlo nella scheda per le impostazioni dei controlli.

#### Impostazioni dei controlli

ID controlli	Nome controlli	Replicato	Ciclo min. valido C. diff	Ciclo max. valido C. diff	Soglia endpoint C. diff	IC +/-	Ciclo min. valido IC	Ciclo max. valido IC	Soglia endpoint IC
<b>PC1</b>	Pos Cntrl 1	1	26	45	30	-	15	45	32
<b>PC2</b>	Pos Cntrl 2	0	13	45	10	+	13	45	10
<b>PC3</b>	Pos Cntrl 3	0	13	45	10	+	13	45	10
<b>NC1</b>	Neg Cntrl 1	1	15	45	30	+	28	43	32
<b>NC2</b>	Neg Cntrl 2	0	13	45	10	+	13	45	10
<b>NC3</b>	Neg Cntrl 3	0	13	45	10	+	13	45	10

**m.** Confermare nella scheda **Probe Check Settings** (Impostazioni controllo sonda).



*Il controllo della sonda non è utilizzato nel protocollo del saggio ProGastro Cd.*

#### Impostazioni del controllo sonda

Canale	Nome colorante	Prb1 Min	Prb1 Max	Prb2 Min	Prb2 Max	Prb3 Min	Prb3 Max	Delta 12 Min	Delta 12 Max	Delta 23 Min	Delta 23 Max	Delta 13 Min	Delta 13 Max
1	FAM	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	TET	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	TxR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	Cy5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

**n.** Selezionare **Save Assay** (Salva saggio).

### 1. Preparare i campioni e il controllo negativo (area di preamplificazione)

#### a. Preparare le feci chiarificate

- i. TENERE SEMPRE LE FECI FRESCHE SU GHIACCIO.**
- ii.** Verificare che il tampone S.T.A.R. sia trasparente e incolore. Quando il tampone è conservato a temperatura ambiente possono formarsi dei precipitati bianchi. In tal caso riscaldare la soluzione a 30-40 °C in bagno ad acqua o incubatrice fino alla dissoluzione dei precipitati.
- iii.** I campioni di feci devono essere mescolati bene prima del campionamento mediante agitazione o miscelazione con un puntale per pipette. Usare un nuovo puntale per pipette per ciascun campione.

- iv.** Usando un puntale per pipette con filtro a foro largo da 200 µl (o un puntale con filtro da 200 µl con l'estremità tagliata per ottenere un puntale dal foro più largo) preparare una diluizione 1:5 di feci con il tampone S.T.A.R., aggiungendo 100 µl di ciascun campione in singole provette da microcentrifuga da 1,5 ml contenenti 400 µl di tampone S.T.A.R.. Se il campione risulta troppo denso da pipettare, usare una spatola monouso per campionare circa 100 µl (le dimensioni di un piccolo pisello) e aggiungerlo al tampone da 400 µl di tampone S.T.A.R..
- v.** Miscelare agitando fino a raggiungere l'omogeneità.
- vi.** Con alcuni campioni di feci dense può essere necessario aggiungere altro tampone S.T.A.R. per produrre feci chiarificate. Se necessario, aggiungere ulteriore tampone S.T.A.R. con incrementi di 100 µl per ottenere una consistenza che permetta di avere feci chiarificate pipettabili.
- vii.** Centrifugare il campione a 13.000 g per 1 minuto.
- viii.** Pipettare il supernatante evitando il particolato, quindi collocare in una nuova provetta per microcentrifuga da 1,5 ml. Questo supernatante è dato dalle feci chiarificate. Non è necessario tenere le feci chiarificate su ghiaccio.
- ix.** Le feci chiarificate possono essere conservate a 2-8 °C per un massimo di 7 giorni prima dell'aggiunta di IC e dell'estrazione.

**b. Aggiungere il controllo interno ai campioni di feci chiarificate.**

- i.** Scongela su ghiaccio il numero appropriato di aliquote dello stock intermedio del controllo interno (un volume sufficiente per ogni campione, controllo negativo e controllo di estrazione).
- ii.** Preparare una diluizione 1:10 dello stock intermedio del controllo interno nel modo seguente:

$$\begin{array}{rcccl}
 30 \mu\text{l di stock intermedio} & & & & \\
 \text{del controllo interno} & + & 270 \mu\text{l di tampone} & = & 300 \mu\text{l di concentrazione di} \\
 & & \text{S.T.A.R.} & & \text{lavoro del controllo interno}
 \end{array}$$

- iii.** Aggiungere 10 µl della concentrazione di lavoro del controllo interno in ogni contenitore di campioni nel dispositivo monouso easyMAG.
- iv.** Rimuovere 20 µl da ciascun campione di feci chiarificate e pipettarli nello specifico contenitore per campioni nel dispositivo monouso easyMAG in cui deve essere purificato. Pipettare su e giù almeno 5 volte per mescolare. Usare un nuovo puntale per pipette per ciascun campione.



**Nota**

*Durante la miscelazione, assicurarsi di non introdurre bolle d'aria o contaminare i contenitori di campioni vicini*

- v.** Conservare gli eventuali campioni rimanenti di feci chiarificate a 2-8 °C per non più di una settimana. In caso di periodi più lunghi i campioni devono essere conservati a ≤ -70 °C.

**c. Aggiungere il controllo interno al controllo negativo.**

- i.** Includere un (1) controllo negativo in ogni serie di estrazione.
- ii.** Aggiungere 10 µl della concentrazione di lavoro del controllo interno nel contenitore del campione nel monouso easyMAG.
- iii.** Aggiungere 20 µl di tampone S.T.A.R. nello specifico contenitore per campioni nel dispositivo monouso easyMAG in cui deve essere purificato. Pipettare su e giù almeno 5 volte per mescolare.
- iv.** Scartare il volume residuo del controllo interno - NON riutilizzare.



*Non riutilizzare il controllo interno.*

**Non riutilizzare**

## 2. Isolare l'acido nucleico (Area di preamplificazione I)– sistema NucliSENS easyMAG di bioMérieux con reagenti per estrazione magnetica automatica

### a. Avviare lo strumento e il software.

Accendere lo strumento easyMAG e, non appena il LED diventa verde, accendere il computer ed eseguire il login nel software.

### b. Preparare il software per una serie.

Per preparare una serie, toccare l'icona **"Impostazioni"**  nella barra degli strumenti principale, che diventerà l'icona **"Parametri Applicazione"** e scegliere le seguenti impostazioni della serie:

**Richiesta predefinita:** 1.0.6 o 2.0.1 generici (rispettivamente per le versioni software 1.0.1 o 2.0)

**Prefisso del nome della serie:** N/A (lasciare quello predefinito)

**Prefisso dell'ID del campione:** N/A (lasciare quello predefinito)

**Tipo di campione:** Primario (lisi on-board)



**Default On-board Lysis Dispensing (Dispensazione predefinita lisi on-board):** Sì

**Default On-board Lysis Incubation (Incubazione predefinita lisi on-board):** Sì



**Guida per l'aggiunta del campione:** Off

**Tracciabilità del reagente:** Off

### c. Immettere le informazioni sul tampone.

Toccare l'icona **"Strumento"**  per passare all'icona **"Inventario dei reagenti"**  e immettere i codici a barre del tampone, eseguendo innanzitutto una scansione della posizione dello strumento (A, B, C o D) e, quindi, del suo tampone corrispondente. Per esempio, scansionare la posizione A, quindi scansionare il flacone del tampone di lisi in tale posizione, quindi passare alla posizione B e al suo flacone corrispondente.

### d. Creare una lista di lavoro.

*i.* Toccare l'icona **"Uso giornaliero"**  che passerà all'icona **"Richieste di estrazione"**  e selezionare le seguenti impostazioni:

**ID Campione:** inserire manualmente il nome del campione.

**Matrice:** feci


**Richiesta:** 1.0.6 o 2.0.1 generici (rispettivamente per le versioni software 1.0.1 o 2.0)

**Volume (ml):** 0,030 (immettere il volume del campione)






**Eluato (µl):** 110

**Tipo:** Primario

**Priorità:** Normale

*ii.* Premere **Invio** sulla tastiera o toccare l'icona **"Nuova richiesta di estrazione"**  dopo ogni aggiunta manuale di campione. Le impostazioni succitate resteranno predefinite per ogni inserimento successivo fino a quando non si passerà a una pagina diversa.

### e. Creare una serie e aggiungere campioni da una lista di lavoro.


Toccare l'icona **"Organizzazione serie"** , quindi l'icona **"Create Run"**  (Crea serie) che farà comparire la finestra **Nuova serie**. In questa finestra occorrerà denominare correttamente la serie e verificare che la casella di **numerazione automatica** resti vuota (DESELEZIONATA) e che sia selezionato **Sì** nell'opzione per la dispensazione di lisi on-board e su quella per l'incubazione di lisi on-board. Toccare **OK** per chiudere la finestra **Nuova serie** e passare alla schermata **"Organizzazione serie"**. Assegnare i campioni alla serie usando le icone (frecche)  di posizionamento. Toccare l'icona **"Caricamento serie"**  e selezionare la serie. Se necessario stampare la lista di lavoro con l'icona **"Stampare lista di lavoro"** . Questa lista di lavoro sarà utile per tenere traccia dell'ordine dei campioni da caricare nei contenitori dei campioni.

**f. Caricare i campioni, compreso il controllo negativo. Caricare i puntali di aspirazione ed eseguire la scansione del codice a barre sulle strip dei campioni.**

Inserire i puntali di aspirazione richiesti per la serie di estrazione. Inserire le strip dei campioni nell'ordine corretto riportato nella lista di lavoro, quindi eseguire la scansione della posizione delle strip dei campioni sullo strumento e, infine, della stessa strip. Per esempio, scansionare la posizione A, quindi la strip del campione in quella posizione, poi la posizione B ed eventualmente la C. Dopo la scansione delle strip dei campioni, l'indicatore sullo schermo passerà dal colore rosso al verde.

**g. Eseguire la dispensazione di lisi on-board.**

Al termine del caricamento dei campioni e dei puntali, e una volta eseguita la scansione delle strip,


chiudere il coperchio e toccare l'icona "Dispensare lisi" . Lo strumento dispenserà il tampone di lisi e incuberà per 10 minuti.

**h. Preparare la silice magnetica da aggiungere nei contenitori dei campioni.**

Durante i 10 minuti di incubazione della lisi usare il pipettatore multicanale Biohit per preparare la silice magnetica. Questa procedura dovrà essere eseguita per ogni contenitore dei campioni usati nella serie (1, 2 o 3 volte).

- i.* Impostare il pipettatore sul **Programma 1** e collocare il puntale per pipette Biohit sulla posizione 1. Il Programma 1 permette di aspirare e dispensare 550 µl di liquido. La silice magnetica è preparata secondo un rapporto di 1:1 con acqua ultrapura per usi biologici.
- ii.* Usando il Programma 1 del pipettatore, premere il pulsante **Avvio** per aspirare e dispensare 550 µl d'acqua in una provetta da microcentrifuga. Agitare brevemente la provetta di silice magnetica per miscelare e usare il Programma 1 del pipettatore per aspirare e dispensare 550 µl di silice magnetica nella stessa provetta per microcentrifuga in cui è stata aggiunta l'acqua. Espellere il puntale, tappare la provetta e agitare per miscelare.
- iii.* Impostare il pipettatore sul **Programma 2** e collocare il puntale per pipette Biohit nella posizione 1. Il Programma 2 trasferirà 8 volumi della miscela precedente negli 8 contenitori di una strip su una piastra ELISA (1 strip per ogni contenitore di campioni). Premere il pulsante **Avvio** per aspirare la miscela. Premere ancora il pulsante **Avvio** per dispensare, dopo avere impostato correttamente la pipetta per la dispensazione.
- iv.* Premere il pulsante **Avvio** per 8 volte, in modo da dispensare la miscela rimanente in ciascuno degli 8 contenitori della strip di una piastra ELISA, quindi espellere il puntale.
- v.* Al termine dei 10 minuti di incubazione della lisi, impostare il pipettatore sul **Programma 3** e collocare 8 puntali per pipette Biohit sul pipettatore multicanale (o sul numero totale di campioni presenti nella specifica strip). Assicurarsi che i puntali con filtro siano collegati correttamente al pipettatore multicanale per prevenire errori dovuti a perdite. Il Programma 3 miscela la soluzione di silice magnetica nella piastra ELISA, aspirandola per la distribuzione nei contenitori della strip dei campioni, dove sarà miscelata. Premere il pulsante **Avvio** una volta. La pipetta miscelerà la silice nella piastra ELISA e la aspirerà per aggiungerla nel contenitore dei campioni. Prima di collocarla nel contenitore dei campioni, verificare che ogni puntale contenga lo stesso volume di miscela di silice. Porre il pipettatore sopra la strip dei contenitori dei campioni, in modo tale che i puntali si trovino sotto il livello del liquido di ogni campione, quindi premere di nuovo il pulsante **Avvio** per aspirare 800 µl da ciascun contenitore dei campioni ed eseguire 3 cicli di miscelazione con 1000 µl di campione/silice magnetica nel puntale Biohit. A questo punto, assicurarsi di tenere ferma la pipetta al di sotto dell'interfaccia liquido/aria durante la miscelazione, in modo da non introdurre bolle nel campione.
- vi.* Ripetere per ogni strip di campione nella serie.

**i. Avviare la serie.**

Toccare l'icona **Avvio**  per iniziare la serie. Lo strumento eseguirà 5 lavaggi, il riscaldamento e l'eluizione. Gli acidi nucleici purificati devono essere trasferiti in provette di conservazione appropriate (provette da microcentrifuga da 1,5 ml) su ghiaccio entro 30 minuti dal termine dell'estrazione, allo scopo di evitare la contaminazione da parte della silice magnetica attaccata alla parete anteriore del o dei contenitori dei campioni. In caso di periodi più lunghi, i campioni devono essere conservati a ≤ -70 °C.



Nota

- ❖ *Non conservare gli acidi nucleici purificati nei contenitori dei campioni.*
- ❖ *Non usare gli acidi nucleici di campioni con analisi errate.*

### 3. Preparare la reazione PCR real time – (Area di preamplificazione II)



Nota

Avviare il saggio SmartCycler ProGastro Cd entro un'ora dallo scongelamento della miscela di *C. diff*.

#### a. Diluire il controllo positivo.

- i.* Includere il controllo positivo in ogni serie. Scongela su ghiaccio 1 aliquota dello stock intermedio del controllo positivo.
- ii.* Aggiungere 45 µl di acqua ultrapura in una provetta da microcentrifuga da 1,5 ml.
- iii.* Trasferire 5 µl dello stock intermedio del controllo positivo alla provetta di cui al punto *ii*. Agitare brevemente per miscelare.
- iv.* Tenere la provetta su ghiaccio.
- v.* Scartare il volume residuo del controllo positivo intermedio diluito - NON riutilizzare.



Non  
riutilizzare

*Non riutilizzare lo stock intermedio del controllo positivo.*

#### b. Scongela la miscela di *C. diff* e aggiungere 20 µl alle provette SmartCycler.

- i.* Tenere la miscela di *C. diff* su ghiaccio e proteggere dalla luce prima dell'aggiunta nelle provette SmartCycler.
- ii.* Caricare il numero richiesto di provette nel blocco di raffreddamento Cepheid.
- iii.* Pipettare 20 µl della miscela di *C. diff* nella parte superiore delle provette dello SmartCycler.
- iv.* Conservare la miscela rimanente di *C. diff* Mix a ≤ -70 °C.

#### c. Aggiungere 5 µl dell'acido nucleico di ogni campione alle singole provette SmartCycler contenenti la miscela di *C. diff*.

- i.* Dopo l'aggiunta dell'acido nucleico nella provetta SmartCycler, pipettare su e giù 2 o 3 volte per miscelare.
- ii.* Chiudere la provetta. Usare uno nuovo puntale per pipette per ciascun campione.

#### d. Aggiungere 5 µl del controllo positivo diluito in una provetta SmartCycler separata contenente la miscela di *C. diff*.

- i.* Dopo l'aggiunta del controllo positivo nella provetta SmartCycler, pipettare su e giù 2 o 3 volte per miscelare.
- ii.* Chiudere la provetta.
- iii.* Scartare il volume residuo dei controlli positivi diluiti - NON riutilizzare.



Non  
riutilizzare

*Non riutilizzare il controllo positivo diluito.*

#### e. Aggiungere 5 µl di acido nucleico del controllo di estrazione in una provetta SmartCycler separata contenente la miscela di *C. diff*.

- ii.* Dopo l'aggiunta del controllo di estrazione nella provetta SmartCycler, pipettare su e giù 2 o 3 volte per miscelare.
- ii.* Chiudere la provetta.

**f. Aggiungere 5 µl di acido nucleico del controllo negativo nell'ultima provetta SmartCycler contenente la miscela di C. diff.**

- i.* Dopo l'aggiunta dell'acido nucleico del controllo negativo nella provetta SmartCycler, pipettare su e giù 2 o 3 volte per miscelare.
- ii.* Chiudere la provetta.

**g. Centrifugare tutte le provette**

- i.* Apporre l'etichetta appropriata sul tappo delle provette SmartCycler.
- ii.* Centrifugare tutte le provette per 5-10 secondi con l'apposita microcentrifuga Cepheid adattata per alloggiare le provette SmartCycler.
- iii.* Ricollocare le provette nel blocco di raffreddamento.

**h. Tenere le provette sul blocco di raffreddamento prima di caricarle nello strumento SmartCycler II.**

**4. Eseguire il saggio ProGastro Cd (area di amplificazione/rilevazione)**

- a.** Creare una nuova serie cliccando sull'icona **Create Run** (Crea serie) nella parte superiore della schermata. Comparirà la schermata *Create Run* (Crea serie).
- b.** In **Run Name** (Nome serie), nel riquadro sinistro della schermata *Create Run* (Crea serie), inserire un codice unico di identificazione della serie.
- c.** Fare clic sulla freccia **Assay** (Saggio), nel riquadro sinistro della schermata *Create Run* (Crea serie) e selezionare il protocollo **ProGastro Cd Assay** (Saggio ProGastro Cd) dal menu a discesa.
- d.** In **Assay Information** (Informazioni saggio), nel riquadro sinistro della schermata *Create Run* (Crea serie), inserire il **numero di lotto** e la **data di scadenza** del kit saggio ProGastro Cd.
- e.** Nel riquadro sinistro della schermata *Create Run* (Crea serie), inserire il numero di campioni (incluso il controllo di estrazione) e fare clic su **Apply** (Applica). Comparirà la **tabella dei siti** e il software SmartCycler Dx selezionerà automaticamente i siti **I-Core**.
- f.** Inserire il codice del campione nella colonna **Sample ID** (ID campione) della **tabella dei siti**.
- g.** Inserire tutte le provette di reazione in un sito I-Core dello SmartCycler premendo con forza le provette e chiudendo tutti i coperchi. Verificare che il controllo positivo (PC1) e il controllo negativo (NC1) siano caricati nei siti I-Core corretti specificati dal software.
- h.** Selezionare il pulsante **Start Run** (Avvia serie) situato nell'angolo inferiore sinistro della schermata. Verificare che i LED dei rispettivi siti I-Core siano accesi.

**5. Stampare il referto**

- a.** Fare clic su **Report** (Referto), nella parte inferiore della schermata, per aprire la finestra **Report Preview** (Anteprima referto).
- b.** **Stampare** il referto risultante.

**Interpretazione dei risultati dei controlli**

**Convalida della serie**



Nota

Il software SmartCycler Dx interpreterà automaticamente i risultati del controllo positivo (PC1) e del controllo negativo (NC1) per determinare se la serie sia valida.

Per una serie VALIDA occorre soddisfare le seguenti condizioni:

ID campione <sup>1</sup>	Risultato saggio	Risultato IC	Avvertenza/Codice errore	Tipo campione	Ct IC	Risultato C. diff	Ct C. diff
Pos Cntrl 1	Valido	NA		PC1	0	Valido	26 – 45
Neg Cntrl 1	Valido <sup>2</sup>	Superato		NC1	28 – 43	Valido	0

<sup>1</sup> Le colonne e i dati non usati per l'interpretazione non sono inclusi.

<sup>2</sup> (Tipico) In caso di saggio non valido comparirà il codice di errore 4098.

### Serie di saggi non valida

In caso di mancata conformità alle condizioni per una serie valida (controllo positivo risultante non positivo nello specifico intervallo Ct o controllo negativo non valido), preparare tutte le nuove reazioni utilizzando gli acidi nucleici purificati residui e una nuova diluizione del controllo positivo (iniziando la PCR dal **Punto 3** della **Procedura del saggio**) o iniziare dai campioni originari o dalle feci chiarificate usando una nuova diluizione del controllo positivo (iniziando dal **Punto 1** della **Procedura del saggio**).

### Interpretazione dei risultati dei campioni

Il software SmartCycler Dx determina automaticamente i risultati dei campioni. L'interpretazione dei risultati dei campioni del saggio è la seguente:

ID campione <sup>1</sup>	Risultato saggio	Risultato IC	Avvertenza/Codice errore	Risultato C. diff	Interpretazione dei risultati
ID campione	Negativo	Superato		<b>NEG</b>	<i>C. diff</i> tossigeno <b>non rilevato</b>
ID campione	Positivo	NA*		<b>POS</b>	Acido nucleico di <i>C. diff</i> tossigeno <b>rilevato</b>
ID campione	Indefinito	Non superato		<b>NEG</b>	Indefinito - Inibizione PCR o fallimento del reagente. Ripetere il test dalle feci chiarificate o prelevare e testare un nuovo campione.
ID campione	Non valido		4098 <sup>2</sup>	ND	Non determinato - Codice errore 4098

<sup>1</sup> Le colonne e i dati non usati per l'interpretazione non sono inclusi

<sup>2</sup> In caso di saggio non valido comparirà il codice errore 4098

\* La rilevazione del controllo interno non è richiesta ai fini di un risultato positivo nel canale di rilevazione Cy5. Titoli elevati di *C. diff* possono provocare un segnale ridotto o assente del controllo interno.

### Controllo della qualità

- ➔ I requisiti di controllo della qualità devono essere conformi alle normative locali, regionali e/o nazionali o ai requisiti di accreditamento e alle procedure di controllo di qualità standard del laboratorio. Si raccomanda all'utente di consultare il documento CLSI C24-A3, *Statistical Quality Control for Quantitative Measurements: Principles and Definitions*: [Linee guida approvate – Terza edizione] o altre linee guida pubblicate per le raccomandazioni generali relative al controllo di qualità. Per ulteriori indicazioni sulle pratiche appropriate per il controllo di qualità, consultare la normativa 42 CFR 493.1202(c).
- ➔ Le procedure di controllo della qualità hanno lo scopo di monitorare le prestazioni dei reagenti e del saggio.

Tipo di controllo	Usato per monitorare...
Positivo	Sostanziale fallimento del reagente e dell'integrità di primer e sonda
Negativo	Contaminazione del reagente e/o ambientale
Estrazione	Lisi e procedura di estrazione non riuscite
Interno	Inibizione PCR in singoli campioni e fallimento del reagente o errore di processo

- ➔ Diluire e testare il controllo positivo e il controllo interno prima di analizzare i campioni con ogni nuovo lotto del kit, in modo da garantire che tutti i reagenti e i componenti del kit funzionino correttamente.
- ➔ La buona pratica di laboratorio prescrive di aggiungere un controllo di estrazione positivo (campione clinico precedentemente determinato come positivo al *C. diff* tossigeno per mezzo del saggio ProGastro Cd o un campione simulato) in ogni serie di isolamento di acidi nucleici. Il controllo di estrazione deve essere trattato come un campione.
- ➔ Non eseguire mai il controllo positivo mediante isolamento di acidi nucleici.
- ➔ Includere sempre un controllo negativo (*contenente controllo interno*) e il controllo positivo in ogni serie di amplificazione/rilevazione eseguita.

- Il fallimento dei controlli (positivo, negativo e/o di estrazione) invalida la serie e i risultati non possono essere refertati. È necessario ripetere il test partendo dall'acido nucleico purificato e usando una nuova aliquota del controllo positivo. Se i risultati del test ripetuto sono ancora non validi, questi non dovranno essere refertati e il test dovrà essere ripetuto partendo dal campione originale, da feci chiarificate o prelevando un nuovo campione da testare.

## Limitazioni

- **Una volta scongelata la miscela di *C. diff*, la serie deve essere iniziata entro un'ora.**
- Questo test rileva, ma non differenzia, il ceppo NAP1 (Ribotipo 027) da altri ceppi tossigeni del *C. diff*.
- Un operatore sanitario qualificato deve interpretare i risultati del saggio insieme alla storia clinica del paziente, ai segni clinici e ai sintomi e ai risultati di altri test diagnostici.
- I target dell'analita (acido nucleico batterico) possono persistere *in vivo*, indipendentemente dalla presenza della tossina. La rilevazione del target dell'analita non implica che il corrispondente organismo sia l'agente eziologico dei sintomi clinici.
- La rilevazione dell'acido nucleico batterico dipende dal corretto prelievo del campione, dalla manipolazione, dal trasporto, dalla conservazione e dalla preparazione (inclusa l'estrazione). La mancata osservanza delle procedure corrette in una qualsiasi di queste fasi può condurre a risultati non corretti. Esiste il rischio di valori falsi negativi dovuti a prelievo, trasporto o manipolazione non adeguati dei campioni.
- Esiste il rischio di valori falsi negativi dovuti alla presenza di varianti di sequenze nei target batterici del saggio, errori procedurali, inibitori di amplificazione nei campioni o numeri insufficienti di microrganismi per l'amplificazione.
- Questo test è mirato per il gene *tcdB*, responsabile della produzione della Tossina B. Tale test non può rilevare i ceppi del *C. diff* che non contengono il gene *tcdB*.
- Il *C. difficile* tossigeno variante senza il gene *tcdB* o con una proteina non funzionante della Tossina B è molto raro. Il saggio ProGastro Cd è mirato per il gene *tcdB* e non è dato sapere se possa rilevare i ceppi varianti di Tossina A+/Tossina B-.

## Valori previsti

La prevalenza dell'infezione da *C. difficile* può variare fra le strutture sanitarie. Le variabili che influiscono sulla frequenza della malattia sono la popolazione di pazienti, il tipo di struttura e l'epidemiologia. Il *C. difficile* è responsabile di circa il 20% di tutti i casi di diarrea associata ad antibiotici e l'incidenza totale della malattia è pari a circa lo 0,1 - 2% tra tutti i pazienti ospedalizzati<sup>1</sup>. Nello studio prospettico multicentrico ProGastro Cd la prevalenza tra pazienti sintomatici variava tra il 10,4% e il 15,8% secondo il centro, con una media complessiva del 13,4%. Il numero e la percentuale dei casi positivi al *C. diff* rilevati dal saggio ProGastro Cd durante questo studio, stratificati secondo la fascia di età dei pazienti, sono riportati nella seguente tabella:

Fascia d'età	Totale (N)	N° totale di positivi al <i>C. diff</i> secondo il saggio ProGastro Cd	Prevalenza osservata
2 – 5 anni	60	8	13,3%
6 – 10 anni	43	5	11,6%
11 – 15 anni	67	11	16,4%
16 – 21 anni	53	9	17,0%
22 – 59 anni	292	37	12,7%
≥ 60 anni	256	33	12,9%
Totale	771	103	13,4%

**Caratteristiche prestazionali**
**Efficacia clinica**

Le caratteristiche prestazionali del saggio ProGastro Cd sono state determinate nel corso di uno studio prospettico in 3 laboratori clinici statunitensi tra luglio e ottobre 2008. I campioni usati per questo studio erano residui di campioni di feci fresche prelevati per il test di routine del *Clostridium difficile* da pazienti di età superiore ai due anni in ciascun centro. Il metodo di riferimento era il saggio della citotossina in coltura tissutale (CTA). I dettagli demografici di questa popolazione di pazienti sono riepilogati nella seguente tabella:

Età	Numero di soggetti (percentuale sul totale)
2 – 5 anni	60 (7,8 %)
6 – 21 anni	163 (21,1%)
22 – 59 anni	292 (37,9%)
≥ 60 anni	256 (33,2%)

Un totale di 771 nuovi campioni di feci è stato sottoposto a test con il saggio ProGastro Cd mediante CTA. Nessuno dei 771 campioni risultava inibito al momento del test con saggio ProGastro Cd.

		CTA		Totale	Commenti
		Positivo	Negativo		
<b>Saggio ProGastro Cd</b>	<b>Positivi</b>	66	37 <sup>a</sup>	<b>103</b>	Sensibilità 91,7% (83,0% - 96,1%) CI al 95%
	<b>Negativi</b>	6 <sup>b</sup>	662	<b>668</b>	Specificità 94,7% (92,8% – 96,1%) CI al 95%
	<b>Totale</b>	<b>72</b>	<b>699</b>	<b>771</b>	

Le analisi della discrepanza dei campioni, laddove i risultati del saggio ProGastro Cd e della CTA erano in disaccordo, sono state eseguite mediante un algoritmo predeterminato che includeva un test molecolare (PCR) (mirato a una regione diversa del gene *tcdB* rispetto a quella del saggio ProGastro Cd) e da un sequenziamento genetico bidirezionale, un saggio immunologico enzimatico (EIA) e una coltura seguita da PCR e sequenziamento bidirezionale.

<sup>a</sup> 34 campioni positivi secondo l'analisi della discrepanza. Di questi, 33 erano positivi per sequenziamento e uno (1) era positivo per coltura seguita da sequenziamento.

<sup>b</sup> Quattro (4) campioni positivi secondo l'analisi della discrepanza. Di questi, uno (1) era positivo per sequenziamento, uno (1) era positivo per EIA e due (2) erano positivi per coltura seguita da sequenziamento.

## Riproducibilità

La riproducibilità del saggio ProGastro Cd è stata valutata in 3 centri di analisi. La riproducibilità è stata esaminata mediante un pannello di 6 campioni simulati che comprendeva campioni medio-positivi, basso-positivi (prossimi al limite di rilevazione del saggio,  $\geq 95\%$  positivi) e "alto-negativi" ( $< 5\%$  positivi). I pannelli e i controlli sono stati testati in ogni centro da 2 operatori per 5 giorni (6 campioni e 4 controlli X 2 operatori X 5 giorni X 3 centri = 300). La percentuale complessiva di concordanza con i risultati previsti per il saggio ProGastro Cd è stata del 99,0%.

ID membro pannello	Centro 1			Centro 2			Centro 3			Concordanza totale con i risultati previsti (%)	Intervallo di confidenza 95%	Media totale valore $C_T$	Totale %CV
	Concordanza con i risultati previsti	MEDIA $C_T$	%CV	Concordanza con i risultati previsti	MEDIA $C_T$	%CV	Concordanza con i risultati previsti	MEDIA $C_T$	%CV				
Alto negativi <sup>1</sup>	19/20	35,2	1,52	20/20	35,3	1,05	20/20	35,5	1,30	59/60 (98,3%)	91,1% - 99,7%	35,3	1,35
Basso Positivi	19/20	36,2	1,04	20/20	36,2	1,30	20/20	36,3	0,75	59/60 (98,3%)	91,1% - 99,7%	36,2	1,05
Medio-positivi	19/20	34,1	0,99	20/20	33,8	0,89	20/20	33,9	1,07	59/60 (98,3%)	91,1% - 99,7%	33,9	1,04
Controllo positivo	10/10	36,7	3,45	10/10	34,6	1,03	10/10	34,1	1,22	30/30 (100%)	88,7% - 100%	35,1	3,88
Controllo matrice positivo	10/10	26,8	1,26	10/10	26,5	0,43	10/10	26,4	0,76	30/30 (100%)	88,7% - 100%	26,6	1,05
Controllo negativo <sup>1</sup>	10/10	35,0	0,98	10/10	35,0	1,44	10/10	35,4	1,46	30/30 (100%)	88,7% - 100%	35,1	1,38
Controllo matrice negativo <sup>1</sup>	10/10	35,1	1,06	10/10	35,2	1,03	10/10	35,6	2,62	30/30 (100%)	88,7% - 100%	35,3	1,80
<b>Concordanza totale Tutti</b>	<b>97/100 (97%)</b>			<b>100/100 (100%)</b>			<b>100/100 (100%)</b>			<b>297/300 (99,0%)</b>	<b>97,1% - 99,7%</b>		

<sup>1</sup> Per il controllo interno (IC) è calcolato il valore  $C_t$  medio.

Un altro studio sulla riproducibilità è stato eseguito per valutare i campioni che presentavano una concentrazione intermedia, al di sotto del LoD del saggio, ma al di sopra degli "alto-negativi" testati durante lo studio di riproducibilità originario. La percentuale di positivi nei campioni intermedi è risultata pari al 42,2% in tutti i siti. Questo risultato era atteso, in quanto la concentrazione intermedia avrebbe dovuto essere positiva nell'intervallo 5 - 95%. Infatti i campioni avevano una concentrazione inferiore rispetto alla concentrazione LoD ( $\geq 95\%$  positivi) e superiore a quella "alto-negativa" ( $< 5\%$  positivi).

ID membro pannello	Centro 1			Centro 2			Centro 3			Concordanza totale con i risultati previsti (%)	Intervallo di confidenza 95%	Media totale valore $C_T$	Totale %CV
	Concordanza con i risultati previsti	MEDIA $C_T$	%CV	Concordanza con i risultati previsti	MEDIA $C_T$	%CV	Concordanza con i risultati previsti	MEDIA $C_T$	%CV				
Intermedio	13/30*	40,4	2,10	12/30*	40,5	3,50	13/30*	40,5	2,07	38/90* (42,2%)	32,5% - 52,5%	40,5	2,55
Controllo positivo	10/10	35,2	0,88	10/10	34,4	0,37	10/10	35,1	2,64	30/30 (100%)	88,7% - 100%	34,9	1,88
Controllo matrice positivo	10/10	26,5	0,78	10/10	26,5	0,86	10/10	26,3	1,12	30/30 (100%)	88,7% - 100%	26,4	1,00
Controllo negativo <sup>1</sup>	10/10	34,9	1,30	10/10	35,1	1,33	10/10	35,0	1,26	30/30 (100%)	88,7% - 100%	35,0	1,28
Controllo matrice negativo <sup>1</sup>	10/10	35,4	1,29	10/10	35,1	1,72	10/10	35,6	1,43	30/30 (100%)	88,7% - 100%	35,4	1,55

\* Numero positivo

<sup>1</sup> Per il controllo interno (IC) è calcolato il valore  $C_t$  medio.

### Sensibilità analitica

La sensibilità analitica (limite di rilevazione o "LoD") del saggio ProGastro Cd è stata determinata mediante diluizioni seriali di fattore 10 di due ceppi di *C. diff* aggiunti a feci fresche e trattate secondo le istruzioni per l'uso. La concentrazione LoD di ogni ceppo batterico è stata confermata estraendo e testando 20 replicati. Porzioni delle stesse diluizioni seriali sono state coltivate e quantificate in unità di CFU/ml, quindi utilizzate per determinare le CFU/reazione. La sensibilità analitica (LoD) è stata definita come la concentrazione minima a cui  $\geq 95\%$  di tutti i replicati risultava positivo.

Ceppo batterico	LoD
<b>NAP1</b> , Ribotipo 027, Tossinotipo III (Tox A+/B+), isolato clinico	9 CFU/reazione
<b>ATCC 43598</b> , Ceppo 1470, Tossinotipo VIII, (Tox A-/B+)	29 CFU/reazione

Inoltre, la sensibilità analitica è stata determinata mediante DNA genomico quantificato che è stato diluito serialmente e sottoposto a PCR secondo le istruzioni per l'uso. La sensibilità analitica del saggio ProGastro Cd è di 5 copie genomiche/reazione.

### Reattività

Per valutare la reattività del saggio ProGastro Cd, sono stati usati, oltre ai ceppi impiegati nello studio di sensibilità analitica (LoD), altri 35 isolati ben caratterizzati, in rappresentanza di almeno 25 ceppi diversi, 5 tossinotipi diversi, 9 tipi diversi all'analisi dell'enzima di restrizione (REA), 5 sierogruppi diversi e 3 ribotipi diversi. I ceppi sono stati testati in triplicati, a una concentrazione tripla per il LoD di ciascun ceppo. Inoltre tutti i ceppi risultavano reattivi al saggio ProGastro Cd.

### Specificità analitica

La specificità analitica del saggio ProGastro Cd è stata valutata testando un pannello di 50 colture composte da ceppi di 41 batteri, 8 virus e 1 lievito, rappresentanti i comuni patogeni o microrganismi gastrointestinali. Un ceppo tossigeno (NAP1) è stato incluso nel pannello di specificità come controllo positivo dello studio. I batteri e il lievito sono stati testati a concentrazioni di  $1,35 \times 10^8$  org/ml. I virus sono stati testati a concentrazioni comprese tra  $10^{3,5}$  e  $10^{6,5}$  TCID<sub>50</sub>/ml. Le colture sono state addizionate con controllo interno ed estratte mediante lo strumento NucliSENS easyMAG di bioMérieux, quindi testate in triplicato. Il saggio ProGastro Cd non ha evidenziato reazioni crociate con alcuno degli organismi di specificità testati.

Ceppi	Concentrazione†	Risultato ProGastro Cd
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,45 McFarland	-
<i>Bacillus cereus</i>	0,45 McFarland	-
<i>Bacillus subtilis</i>	0,45 McFarland	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	0,45 McFarland	-
<i>Campylobacter coli</i>	0,45 McFarland	-
<i>Campylobacter fetus</i>	0,45 McFarland	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	0,45 McFarland	-
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0,45 McFarland	-
<i>Clostridium bifementans</i>	0,45 McFarland	-
<i>Clostridium difficile</i> (ATCC 43593 non tossigeno)	0,45 McFarland	-
<i>Clostridium difficile</i> (ATCC 43601 non tossigeno)	0,45 McFarland	-
<i>Clostridium difficile</i> (ATCC 43603 non tossigeno)	0,45 McFarland	-
<i>Clostridium difficile</i> (ATCC 700057 non tossigeno)	0,45 McFarland	-
<i>Clostridium difficile</i> (ceppo 3232 non tossigeno)	0,45 McFarland	-
<i>Clostridium difficile</i> (ceppo Loyola 02 NAP1 non tossigeno)	$3,3 \times 10^{-4}$ McFarland ( $1 \times 10^5$ org/ml)	+
<i>Clostridium haemolyticum</i>	0,45 McFarland	-
<i>Clostridium histolyticum</i>	0,45 McFarland	-
<i>Clostridium novyi</i>	0,45 McFarland	-
<i>Clostridium perfringens</i>	0,45 McFarland	-
<i>Clostridium septicum</i>	0,45 McFarland	-
<i>Clostridium sordellii</i>	0,05 McFarland*	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	0,45 McFarland	-
<i>Clostridium tetani</i>	0,45 McFarland	-

Ceppi	Concentrazione†	Risultato ProGastro Cd
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,45 McFarland	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,45 McFarland	-
<i>Escherichia coli</i>	0,45 McFarland	-
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	0,45 McFarland	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,45 McFarland	-
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0,45 McFarland	-
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	0,45 McFarland	-
<i>Proteus vulgaris</i>	0,45 McFarland	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,45 McFarland	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,45 McFarland	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	0,45 McFarland	-
<i>Shigella flexneri</i>	0,45 McFarland	-
<i>Shigella sonnei</i>	0,45 McFarland	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,45 McFarland	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,45 McFarland	-
<i>Vibrio cholerae</i>	0,45 McFarland	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0,45 McFarland	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,45 McFarland	-
Adenovirus 18	1x10 <sup>3,5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
Adenovirus 40	1x10 <sup>5,5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
Coxsackie B4	1x10 <sup>4,5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
Citomegalovirus	1x10 <sup>4,25</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
Echovirus 11	1x10 <sup>6,5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
Enterovirus 68	1x10 <sup>3,5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
Norovirus	Isolato clinico**	-
Rotavirus	1x10 <sup>3,5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
<i>Candida albicans</i>	0,45 McFarland	-

† Batteri e funghi testati a 0,05 o 0,45 McFarland (1,5 x 10<sup>7</sup> org/ml o 1,35 x 10<sup>8</sup> org/ml). Virus testati alla massima concentrazione disponibile in TCID<sub>50</sub>/ml.

\* Concentrazioni superiori di *Clostridium sordellii* hanno presentato una inibizione del controllo interno. Nessuna reazione crociata nel canale FAM osservata a 0,45 McFarland.

\*\* Il Norovirus coltivato e titolato non era disponibile; sono stati testati acidi nucleici da un campione clinico positivo (test PCR real-time del *Milwaukee Public Health Lab* con un valore C<sub>T</sub> = 20,5).

### Interferenza

Sangue, mucina, grassi fecali, farmaci da banco e da prescrizione (Kaopectate, Imodium AD, Pepto Bismol, Vancomicina e Metronidazolo) e un agente di contrasto radiologico (solfato di bario) sono stati addizionati alle aliquote di un pool di feci fresche, insieme a un ceppo coltivato e titolato di *C. difficile* (*C. diff*). Il *C. diff* è stato aggiunto secondo una concentrazione di 2 volte il limite di rilevazione (LoD) del test. Ai campioni addizionati sono state poi aggiunte quantità clinicamente rilevanti di sostanze potenzialmente inibenti. I campioni sono stati chiarificati e addizionati con il DNA del controllo interno (IC). L'acido nucleico dei campioni è stato estratto con lo strumento NucliSENS easyMAG di bioMérieux. Gli acidi nucleici sono stati testati in reazioni triplicate con ProGastro Cd sul Cepheid SmartCycler II. La seguente tabella mostra le sostanze potenzialmente interferenti usate in questo studio.

Sostanza interferente	Ingrediente attivo	Concentrazione testata
Sangue intero	N/A	40% (volume/volume)
Mucina	Proteina purificata della mucina	3,5% (peso/volume)
Grassi fecali (acido stearico e palmitico)	N/A	40% (peso/volume)
Kaopectate	Subsalicilato di bismuto	10% (volume/volume)
Pepto Bismol	Subsalicilato di bismuto	10% (volume/volume)
Imodium AD	Loperamide HCl	10% (volume/volume)
Metronidazolo	N/A	12,5 mg/ml
Vancomicina	N/A	12,5 mg/ml
Solfato di bario	N/A	5% (peso/volume)

Nessuna delle sostanze esogene o endogene potenzialmente interferenti ha interferito con la rilevazione del *C. diff* alla concentrazione prossima al LoD del saggio ProGastro Cd.

### **Carry-over/Contaminazione crociata**

Per valutare il livello di carry-over/contaminazione crociata con il saggio ProGastro Cd sono stati sottoposti a test campioni alto-positivi di *Clostridium difficile* (*C. diff*) in serie, alternati a campioni alto-negativi di *C. diff*, nel corso di cinque (5) serie separate di estrazione e PCR. I campioni alto-positivi rappresentavano la fascia superiore dei valori Ct ottenuti nelle sperimentazioni cliniche sul ProGastro Cd (Ct inferiore = 25,4). I campioni alto-negativi consistevano di feci negative addizionate con una concentrazione di *C. diff* inferiore (ma prossima) alla concentrazione analitica LoD, in modo che > 95% dei campioni avrebbe dovuto risultare negativo. I campioni sono stati trattati ed estratti in maniera alternata "alto-positiva/basso-negativa" tramite NucliSENS easyMAG di bioMérieux, quindi elaborati e analizzati in modo alternato sul Cepheid SmartCycler II. Tre campioni su cinquantacinque alto-negativi testati presentavano una potenziale contaminazione da *C. diff*. Poiché i campioni alto-negativi includevano una piccola quantità di *C. diff* rilevabile non oltre il 5% delle volte, non è possibile dedurre che questi risultati possano effettivamente rientrare in questa categoria. La potenziale contaminazione avrebbe potuto verificarsi durante la preparazione dei campioni, l'estrazione, il trasferimento dell'acido nucleico purificato dal contenitore del campione alla provetta per microcentrifuga oppure durante le reazioni PCR.

### **Smaltimento**

Smaltire i materiali pericolosi o biologicamente contaminati in conformità alle pratiche della struttura sanitaria.

### **Bibliografia**

1. Kuijper, E.J., Coignard, B. e Tull, P. *Emergence of Clostridium difficile-Associated Disease in North America and Europe*, "Clinical Microbiology and Infection", Vol. 12, Supplemento 6, ott. 2006: 2-18.
2. Rupnik, M., Brazier, J. S., Duerden, B. I., Grabnar, M. e Stubbs. S. L. J., *Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of Clostridium difficile strains and description of novel toxinotypes*, "Microbiology", Vol. 147, 2001: 439-447.
3. Miller, A. D., Smith, K. M., Winstead, P. S. e Martin, C., *A Clostridium difficile-Associated Diarrhea: A Review and Update on Changes in Disease Virulence and Treatment Response*, "Pharmacy and Therapeutics", Vol. 31(9), sett. 2006: 510-520.
4. Bartlett J. G, *Clostridium difficile: history of its role as an enteric pathogen and current state of knowledge about the organism*, "Clin. Infect. Dis.", 1994; 18 (Suppl. 4): S265-S272.
5. Elliott, B., Chang, B. J., Golledge, C. L. e Riley, T. V. *Clostridium difficile – associated diarrhea*, "Internal Medicine Journal", Vol. 37, 2007: 561-568.
6. Cohen, S. H., Tang Y. J, Hansen, B. e Silva, J., *Isolation of a Toxin B-Deficient Mutant Strain of Clostridium difficile in a Case of Recurrent C. difficile*, "Clinical Infectious Diseases", Vol. 26, feb. 1998: 410-412.
7. Huang, H., Weintraub, A., Fang, H. e Nord, C., *Community acquired Clostridium difficile infection due to a moxifloxacin susceptible ribotype 027 strain*, "Scandinavian Journal of Infectious Diseases", Vol. 41, apr. 2009: 158-159.
8. Noren, T., Åkerlund, T., Bäck, E., Sjöberg, L., Persson, I., Alriksoon, I., *et al. Molecular epidemiology of hospital associated and community acquired Clostridium difficile infection in a Swedish county*, "Journal of Clinical Microbiology", Vol. 42, 2004: 3635-3643.
9. Bauer, M.P., Goorhuis, A., Koster, T., Numan-Ruberg, S.C., Hagen, E.C., Debast, S.B., *et al., Community-onset Clostridium difficile-associated diarrhoea not associated with antibiotic usage*, "Netherlands Journal of Medicine", Vol. 66, 2008: 207-211.
10. Wilcox, M.H. Mooney, L., Bendall, R., Settle, C.D. e Fawley, W.N., *A case-control study of community associated Clostridium difficile infection*, "**Journal of Antimicrobial Chemotherapy**", Vol. 62, 2008: 388-396.

## Informazioni per il contatto

Le informazioni per il contatto sono disponibili su [www.gen-probe.com](http://www.gen-probe.com).



Gen-Probe Prodesse, Inc.  
W229 N1870 Westwood Drive  
Waukesha, WI 53186

**Servizio clienti**  
**Supporto tecnico**

**Telefono:** +1-800-523-5001  
**Telefono:** +1-888-484-4747









**E-mail:** [customerservice@gen-probe.com](mailto:customerservice@gen-probe.com)  
**E-mail:** [technicalsupport@gen-probe.com](mailto:technicalsupport@gen-probe.com)



Emergo Europe  
Molenstraat 15  
2513 BH L'Aia  
Paesi Bassi

## Legenda dei simboli

Sulla confezione e sull'etichetta possono comparire i seguenti simboli:

Simbolo	Definizione	Simbolo	Definizione
REF	Numero di riferimento o numero di catalogo		Contenuto sufficiente per < n > test
	Codice lotto o numero di lotto		Non riutilizzare
	Usare entro la data o Data di scadenza		Produttore
	Limite superiore di temperatura per la conservazione		Rappresentante autorizzato
	Contenuto		

**Nota per l'acquirente**

La procedura descritta nel presente protocollo contiene informazioni proprietarie. Con l'acquisto di questo prodotto all'utente è concessa una licenza limitata, da parte di Gen-Probe Prodesse, Inc., per l'uso di tali informazioni. L'utente di questo prodotto acconsente a non utilizzare alcune di queste informazioni proprietarie in alcun'altra applicazione e a non comunicare (in forma orale o scritta) queste metodologie proprietarie ad altre persone o istituzioni.

L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO CONCEDE ALL'ACQUIRENTE, IN CONFORMITÀ AD ALCUNI BREVETTI ROCHE, IL DIRITTO ALL'USO ESCLUSIVO PER LA FORNITURA DI SERVIZI DIAGNOSTICI IN VITRO. L'ACQUISTO NON DÀ DIRITTO AD ALCUN BREVETTO GENERALE O LICENZA DI ALTRO TIPO, A PARTE QUESTO SPECIFICO DIRITTO DI USO.

Le tecnologie coloranti Black Hole Quencher (BHQ) e Quasar sono soggette a brevetti esistenti o in corso di registrazione e sono concesse in licenza e vendute in accordo con Biosearch Technologies, Inc. (Novato, CA). I marchi registrati "Black Hole Quencher" e "Quasar" sono concessi in licenza da Biosearch Technologies, Inc.

Questo prodotto e il suo uso sono coperti dal brevetto USA 5.851.767 e dalle sue controparti estere.

GEN-PROBE e design sono un marchio registrato di Gen-Probe Incorporated.

PRODESSE e PROGASTRO sono marchi registrati di Gen-Probe Prodesse, Inc.

BIOHIT è un marchio registrato di Biohit Oyj (Helsinki, Finlandia). QUASAR è un marchio registrato di Biosearch Technologies, Inc. GREINER è un marchio registrato di Greiner Bio-One International AG. CEPHEID e SMARTCYCLER sono marchi registrati di Cepheid. NUCLISENS e EASYMAG sono marchi registrati di bioMérieux, Inc. BIOMERIEUX è un marchio registrato di bioMérieux S.A. Kaopectate (stilizzato) e IMODIUM sono marchi registrati di Johnson & Johnson. PEPTO-BISMOL è un marchio registrato di The Procter & Gamble Company. Qualsiasi altro nome commerciale eventualmente presente in queste istruzioni per l'uso appartiene al rispettivo proprietario.

Copyright 2009 - 2010, Gen-Probe Prodesse, Inc. Tutti i diritti riservati.