

Hướng dẫn sử dụng

RealStar[®]

Clostridium difficile PCR Kit 2.0

03/2019 VI

RealStar®

Clostridium difficile PCR Kit 2.0

Để sử dụng với

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)



172013



96



03 2019



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Mục lục

1.	Mục đích sử dụng	6
2.	Thành phần bộ kit	6
3.	Bảo quản	6
4.	Vật liệu và thiết bị cần thiết nhưng không được cung cấp	7
5.	Kiến thức khái quát.....	8
6.	Mô tả sản phẩm	9
6.1	Hệ thống realtime PCR	11
7.	Cảnh báo và thận trọng	11
8.	Quy trình	13
8.1	Chuẩn bị mẫu.....	13
8.2	Pha hóa chất phản ứng (Master Mix).....	14
8.3	Thiết lập phản ứng.....	15
9.	Lập trình hệ thống realtime PCR	16
9.1	Cài đặt.....	16
9.2	Bộ phận phát hiện huỳnh quang (thuốc nhuộm).....	17
9.3	Chương trình nhiệt độ và ghi nhận màu thuốc nhuộm	17
10.	Phân tích dữ liệu	17
10.1	Tính hợp lệ của các lần chạy xét nghiệm chẩn đoán.....	18
10.1.1	Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán hợp lệ (định tính).....	18
10.1.2	Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán không hợp lệ (định tính).....	18
10.2	Diễn giải kết quả	19
10.2.1	Phân tích định tính	19

11.	Đánh giá hiệu suất	19
11.1	Độ nhạy phân tích	20
11.2	Độ đặc hiệu phân tích	21
11.3	Độ đúng (Precision)	23
12.	Hạn chế	24
13.	Kiểm soát chất lượng	25
14.	Hỗ trợ kỹ thuật	25
15.	Tài liệu	25
16.	Thương hiệu và tuyên bố miễn trừ trách nhiệm	26
17.	Giải thích các ký hiệu	27

1. Mục đích sử dụng

RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 là xét nghiệm chẩn đoán *in vitro*, dựa trên công nghệ realtime PCR để phát hiện định tính và phân biệt giữa DNA đặc hiệu cho độc tố A (*tcdA*) và độc tố B (*tcdB*) của *Clostridium difficile*.

2. Thành phần bộ kit

Màu nắp	Thành phần	Số lọ	Thể tích [μl/lọ]
Xanh lam	Master A	8	60
Tím	Master B	8	180
Xanh lá cây	Internal Control	1	1000
Đỏ	Positive Control	1	250
Trắng	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = chứng nội

Positive Control = chứng dương

Water (PCR grade) = nước (chuẩn PCR)

3. Bảo quản

- Sản phẩm RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 được vận chuyển với đá khô. Các thành phần của bộ kit cần được bảo quản đông lạnh. Nếu có từ một thành phần trở lên không đông lạnh tại thời điểm nhận hoặc các ống bị hỏng trong quá trình vận chuyển, vui lòng liên hệ với Altona Diagnostics GmbH để được hỗ trợ.
- Tất cả các thành phần phải được bảo quản ở nhiệt độ -25 °C đến -15 °C tại thời điểm nhận.
- Tránh đông - rã đông hóa chất phản ứng Master Mix (nhiều hơn hai lần) vì điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của xét nghiệm. Các hóa chất cần được chia vào các ống nhỏ (aliquot) và bảo quản lạnh trong trường hợp chúng được sử dụng một cách không liên tục.

- Bảo quản trong điều kiện nhiệt độ từ +2 °C đến +8 °C trong vòng không quá 2 giờ.
- Không để hóa chất phản ứng Master A và Master B tiếp xúc với ánh sáng.

4. Vật liệu và thiết bị cần thiết nhưng không được cung cấp

- Hệ thống realtime PCR thích hợp (xem chương 6.1 Hệ thống realtime PCR)
- Hệ thống hoặc bộ kit tách chiết nucleic acid thích hợp (xem chương 8.1 Chuẩn bị mẫu)
- Máy ly tâm để bàn có rôto dùng cho ống phản ứng 2 ml
- Máy ly tâm có rôto dùng cho đĩa microtiter trong trường hợp sử dụng đĩa phản ứng 96 giếng
- Máy vortex
- Các đĩa phản ứng 96 giếng hoặc ống phản ứng phù hợp với nắp đậy (quang học) tương ứng
- Pipet (có thể điều chỉnh)
- Đầu tip có lọc (dùng một lần)
- Găng tay không bột (dùng một lần)

LƯU Ý



Vui lòng đảm bảo rằng tất cả các thiết bị được sử dụng đã được cài đặt, hiệu chuẩn, kiểm tra và bảo trì theo hướng dẫn và khuyến nghị của nhà sản xuất.

LƯU Ý



Nên sử dụng rôto 72 giếng cùng với các ống phản ứng 0,1 ml thích hợp trong trường hợp sử dụng Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) hoặc Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Kiến thức khái quát

Clostridium difficile là một loại vi khuẩn kỵ khí tạo bào tử thuộc chi *Clostridium*. Loài vi khuẩn này gồm một cấu trúc quần thể đa dạng với hàng trăm loại chủng khác nhau. Đây là vi khuẩn gram dương có bộ gen mạch vòng lớn khoảng 4,3 Mb. [1]

Vi khuẩn này thường lây truyền qua đường phân-miệng trong quá trình nằm viện, nguyên nhân là do cách ly bệnh nhân bị nhiễm bệnh không đúng cách và thói quen vệ sinh kém. Tuy nhiên, không phải tất cả bệnh nhân nhiễm bệnh đều có triệu chứng. *Clostridium difficile* không thể phát triển trong hệ vi khuẩn đường tiêu hóa bình thường, khỏe mạnh do bị các vi khuẩn khác làm suy yếu sự phát triển. Sau khi mất đi hệ vi khuẩn bình thường do sử dụng thuốc kháng sinh, có thể xảy ra phát triển quá mức và xâm chiếm lan ra toàn bộ đại tràng. [2]

Sau khi cư trú trong ruột kết, vi khuẩn này có thể tạo ra một hoặc hai độc tố gây bệnh - độc tố A và độc tố B. Việc sản sinh độc tố này được kích hoạt bởi *quorum sensing*. Các độc tố được sản sinh này phá vỡ sự kết dính của tế bào niêm mạc (*tcdA*) và gây chết tế bào (*tcdB*), có thể dẫn đến nhiều bệnh lý khác nhau, từ tiêu chảy nhẹ đến các biến chứng viêm nhiễm đe dọa tính mạng như viêm đại tràng giả mạc hoặc phình đại tràng nhiễm độc. Trong số các ca nhập viện vì tiêu chảy do mắc *Clostridium difficile*, 1,5 % ca bệnh gây tử vong, trong đó bệnh nhân cao tuổi là đối tượng có nguy cơ cao nhất. [2, 3]

Bệnh nhân bị nhiễm bệnh này được điều trị bằng kháng sinh và các biện pháp hỗ trợ để chống mất nước và mất điện giải. Tuy nhiên, dạng bào tử của *Clostridium difficile* có đặc điểm kháng kháng sinh, gây cản trở quá trình điều trị và có thể dẫn đến tái phát các triệu chứng sau khi ngừng điều trị bằng kháng sinh. [2] *Clostridium difficile* là nguyên nhân hàng đầu gây tiêu chảy do kháng sinh và các ca nhiễm bệnh liên quan đến chăm sóc sức khỏe ở các nước phát triển với tác động rất cao đến kinh tế. Trong bối cảnh số ca nhiễm bệnh nghiêm trọng tiếp tục gia tăng trong những thập kỷ qua, nhu cầu phát hiện và điều trị nhanh chóng và chính xác gia tăng để giảm tỷ lệ tử vong, giảm chi phí y tế và chi phí kiểm soát tình trạng nhiễm bệnh. [4]

- [1] Knight DR, Elliot B, Chang BJ, Perkins TT, Riley TV (2015) Diversity and Evolution in the Genome of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Rev. 28: 721-741.
- [2] Tonna I and Welsby PD (2005). Pathogenesis and treatment of Clostridium difficile infection. Postgrad Med J. 81: 367-369.
- [3] Kirk JA, Banerji O, Fagan RP (2017). Characteristics of the Clostridium difficile cell envelope and its importance in therapeutics. Microb Biotechnol. 10: 76-90.
- [4] Peng Z, Ling L, Stratton CW, Li C, Polage CR, Wu B, Tang Y-W (2018). Advances in the diagnosis and treatment of Clostridium difficile infections. Emerg Microbes Infect. Doi: 10.1038/s41426-017-0019-4.

6. Mô tả sản phẩm

RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 là xét nghiệm chẩn đoán *in vitro*, dựa trên công nghệ realtime PCR để phát hiện định tính và phân biệt giữa DNA đặc hiệu cho độc tố A (*tcdA*) và độc tố B (*tcdB*) của *Clostridium difficile*.

Xét nghiệm bao gồm một hệ thống khuếch đại dị thể (nội chuẩn) để xác định chất ức chế PCR tiềm năng và để xác nhận tính toàn vẹn của hóa chất trong bộ kit.

Công nghệ realtime PCR sử dụng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để khuếch đại các trình tự mục tiêu đặc hiệu và các đầu dò đặc hiệu mục tiêu để phát hiện DNA đã được khuếch đại. Các đầu dò được dán nhãn bằng thuốc nhuộm có gắn đầu huỳnh quang và đầu dập (quencher).

Các đầu dò đặc hiệu cho DNA của *tcdA* được đánh dấu huỳnh quang Cy[®]5 trong khi các đầu dò đặc hiệu cho DNA của *tcdB* được đánh dấu huỳnh quang FAM[™]. Đầu dò đặc hiệu cho chất nội chuẩn (IC) được đánh dấu huỳnh quang JOE[™].

Việc sử dụng các đầu dò mang thuốc nhuộm riêng biệt giúp phát hiện đồng thời DNA đặc hiệu cho *tcdA* và DNA đặc thù cho *tcdB* cũng như phát hiện chất nội chuẩn trong các kênh nhận diện tương ứng của hệ thống realtime PCR.

Xét nghiệm này bao gồm hai quá trình trong một ống nghiệm:

- PCR khuếch đại DNA mục tiêu và chất nội chuẩn
- Phát hiện đồng thời các sản phẩm khuếch đại PCR bằng đầu dò được đánh dấu thuốc nhuộm huỳnh quang

RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 bao gồm:

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

Internal Control = chứng nội

Positive Control = chứng dương

Water (PCR grade) = nước (chuẩn PCR)

Master A và Master B chứa tất cả các thành phần (đệm PCR, DNA polymerase, muối magiê, đoạn mồi và đầu dò) để cho phép khuếch đại qua trung gian PCR và phát hiện DNA đặc hiệu cho *tcdA*, DNA đặc hiệu cho *tcdB* và chất nội chuẩn (Internal Control) trong một lần thiết lập phản ứng.

6.1 Hệ thống realtime PCR

RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 đã được phát triển và kiểm định theo được sử dụng với các hệ thống realtime PCR sau:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

7. Cảnh báo và thận trọng

Đọc kỹ hướng dẫn sử dụng trước khi sử dụng sản phẩm.

- Trước khi sử dụng lần đầu, hãy kiểm tra sản phẩm và các thành phần nhằm đảm bảo:
 - Sự nguyên vẹn
 - Đủ số lượng, loại và dung tích (xem chương 2. Thành phần bộ kit)
 - Ghi nhãn chính xác
 - Vẫn trong trạng thái đông lạnh khi đến nơi
- Việc sử dụng sản phẩm này chỉ giới hạn ở nhân sự được hướng dẫn và đào tạo chuyên sâu về các kỹ thuật realtime PCR và quy trình chẩn đoán *in vitro*.
- Mẫu bệnh phẩm phải luôn được xử lý dưới dạng mẫu truyền nhiễm và/hoặc nguy hiểm sinh học theo đúng quy trình an toàn phòng thí nghiệm.
- Đeo găng tay bảo vệ không bột dùng một lần, áo khoác phòng thí nghiệm và kính bảo vệ mắt khi xử lý mẫu vật.

- Không để vi khuẩn và nuclease (DNase/RNase) nhiễm vào mẫu thử và các thành phần của bộ kit.
- Luôn sử dụng đầu tip dùng một lần, có lọc và không chứa DNase/RNase.
- Luôn đeo găng tay bảo vệ không bột dùng một lần khi xử lý các bộ phận của bộ kit.
- Sử dụng các khu vực làm việc riêng và tách biệt cho các hoạt động (i) chuẩn bị mẫu; (ii) thiết lập phản ứng và (iii) khuếch đại/phát hiện. Quy trình làm việc trong phòng thí nghiệm nên tiến hành theo một hướng nhất quán. Luôn đeo găng tay dùng một lần ở từng khu vực và thay găng tay trước khi vào một khu vực khác.
- Để vật tư và dụng cụ ở các khu vực làm việc riêng biệt và không di chuyển các vật dụng này từ khu vực này sang khu vực khác.
- Bảo quản vật liệu dương tính và/hoặc có khả năng dương tính tách biệt với tất cả các thành phần khác của bộ kit.
- Không mở các ống/đĩa phản ứng sau khi khuếch đại để tránh nhiễm bản các amplicon.
- Có thể sử dụng các chất kiểm chuẩn bổ sung theo hướng dẫn hoặc yêu cầu trong các quy định hoặc tổ chức kiểm định của địa phương, tiểu bang và/hoặc liên bang.
- Không hấp tiệt trùng (autoclave) các ống phản ứng sau khi thực hiện kỹ thuật PCR vì cách làm này không làm giảm nucleic acid đã khuếch đại và sẽ có nguy cơ làm nhiễm bản khu vực phòng thí nghiệm.
- Không sử dụng các thành phần của bộ kit đã hết hạn sử dụng.
- Thải bỏ mẫu và chất thải xét nghiệm theo các quy định an toàn tại địa phương.

8. Quy trình

8.1 Chuẩn bị mẫu

DNA tách chiết được là là nguyên liệu ban đầu cho RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0.

Chất lượng DNA tách chiết được có tác động lớn đến hiệu suất của toàn bộ hệ thống xét nghiệm. Nên đảm bảo hệ thống tách chiết nucleic acid tương thích với công nghệ realtime PCR. Các bộ kit và hệ thống sau đây phù hợp cho việc tách chiết nucleic acid:

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

Các hệ thống và bộ kit tách chiết nucleic acid thay thế cũng có thể thích hợp. Người dùng cần kiểm định tính phù hợp của quy trình tách chiết nucleic acid để sử dụng với RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0.

Nếu sử dụng quy trình chuẩn bị mẫu dạng cột ly tâm có đệm rửa chứa ethanol, thì cần thực hiện thêm bước ly tâm trong 10 phút ở tốc độ khoảng 17.000 x g (~ 13.000 rpm) (sử dụng ống thu mới) trước khi rửa giải nucleic acid.

THẬN TRỌNG



Nếu hệ thống chuẩn bị mẫu của bạn đang sử dụng đệm rửa có chứa ethanol, cần loại bỏ mọi dấu vết ethanol trước khi rửa giải nucleic acid. Ethanol là chất ức chế realtime PCR mạnh.

THẬN TRỌNG

Việc sử dụng giá thể RNA là rất quan trọng đối với hiệu quả tách chiết và tính ổn định của nucleic acid tách chiết được.

Để biết thêm thông tin và được hỗ trợ kỹ thuật về cách xử lý trước và chuẩn bị mẫu, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của chúng tôi (xem chương 14. Hỗ trợ kỹ thuật).

8.2 Pha hóa chất phản ứng (Master Mix)

Tất cả hóa chất và mẫu phải được rã đông hoàn toàn, trộn (bằng pipet hoặc vortex nhẹ) và ly tâm trong thời gian ngắn trước khi sử dụng.

RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 có chứa chất nội chuẩn (IC) dị loại, có thể được sử dụng như một chất kiểm soát ức chế PCR hoặc như một biện pháp kiểm soát quy trình chuẩn bị mẫu (tách chiết nucleic acid) và làm chất kiểm soát ức chế PCR.

- ▶ Trong trường hợp IC được sử dụng như một chất kiểm soát ức chế PCR nhưng không phải là chất kiểm soát quy trình chuẩn bị mẫu, vui lòng thiết lập hóa chất phản ứng Master Mix theo sơ đồ hút nhả pipet sau:

Số lượng phản ứng (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control	1 µl	12 µl
Thể tích master mix (hoá chất phản ứng)	21 µl	252 µl

- ▶ Nếu IC được sử dụng làm chất kiểm chuẩn cho quy trình chuẩn bị mẫu và như một chất kiểm soát ức chế PCR, thêm IC vào quy trình tách chiết nucleic acid.

- ▶ Bất kể phương pháp/hệ thống nào được sử dụng để tách chiết nucleic acid, **không được** thêm trực tiếp IC vào bệnh phẩm. IC phải luôn được thêm vào hỗn hợp bệnh phẩm/đệm ly giải. Thể tích IC phải thêm vào luôn luôn và chỉ phụ thuộc vào thể tích của sản phẩm rửa giải. Thể tích này chiếm 10 % thể tích sản phẩm rửa giải. Chẳng hạn, nếu nucleic acid sẽ được rửa giải trong 60 µl dung dịch đệm rửa giải hoặc nước thì cần thêm 6 µl IC mỗi mẫu vào hỗn hợp bệnh phẩm/đệm ly giải.
- ▶ Trường hợp IC được thêm vào trong quá trình chuẩn bị mẫu, vui lòng thiết lập hóa chất phản ứng Master Mix theo sơ đồ hút nhả pipet sau:

Số lượng phản ứng (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Thể tích master mix (hoá chất phản ứng)	20 µl	240 µl

THẬN TRỌNG

Nếu IC (chất nội chuẩn) được thêm vào trong quá trình chuẩn bị mẫu, thì chỉ ít chứng âm cần bao gồm IC.

THẬN TRỌNG

Bất kể sử dụng phương pháp/hệ thống nào để tách chiết nucleic acid, không được bổ sung trực tiếp IC vào bệnh phẩm.

8.3 Thiết lập phản ứng

- ▶ Pipet 20 µl Master Mix cho vào các giếng cần sử dụng của đĩa phản ứng 96 giếng hoặc ống phản ứng có độ quang học phù hợp.
- ▶ Thêm 10 µl mẫu (sản phẩm rửa giải từ quá trình tách chiết nucleic acid) hoặc 10 µl chất kiểm chuẩn (đối chứng âm hoặc đối chứng dương).

Thiết lập phản ứng	
Hóa chất phản ứng	20 µl
Mẫu hoặc chất kiểm chuẩn	10 µl
Tổng thể tích	30 µl

- ▶ Đảm bảo sử dụng các chứng dương và ít nhất một chứng âm nằm trong master mix (hóa chất phản ứng) được sử dụng trong từng lần chạy.
- ▶ Trộn kỹ các mẫu và chất kiểm chuẩn với Master Mix bằng cách hút nhả pipet.
- ▶ Đậy đĩa phản ứng 96 giếng bằng nắp đậy thích hợp hoặc màng dán quang học và đóng các ống phản ứng bằng nắp đậy thích hợp.
- ▶ Ly tâm đĩa phản ứng 96 giếng trong máy ly tâm có rotor dành cho đĩa microtiter trong 30 giây với tốc độ khoảng 1.000 x g (~ 3.000 rpm).

9. Lập trình hệ thống realtime PCR

Để biết thông tin cơ bản về việc cài đặt và lập trình các hệ thống realtime PCR khác, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng hệ thống tương ứng.

Để tham khảo hướng dẫn lập trình chi tiết liên quan đến việc sử dụng RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 trên một số hệ thống realtime PCR cụ thể, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của chúng tôi (xem chương 14. Hỗ trợ kỹ thuật).

9.1 Cài đặt

- ▶ Xác định các thông số cài đặt sau:

Cài đặt	
Thể tích phản ứng	30 µl
Tốc độ gia nhiệt	Mặc định
Tham chiếu thụ động	Không

9.2 Bộ phận phát hiện huỳnh quang (thuốc nhuộm)

- Xác định bộ phận hiện huỳnh quang (thuốc nhuộm):

Mục tiêu	Bộ phận phát hiện	Chất phát huỳnh quang (reporter)	Chất dập huỳnh quang (quencher)
DNA đặc hiệu cho <i>tcdA</i>	<i>tcdA</i>	Cy®5	(Không)
DNA đặc hiệu cho <i>tcdB</i>	<i>tcdB</i>	FAM™	(Không)
Chứng nội	IC	JOE™	(Không)

9.3 Chương trình nhiệt độ và ghi nhận màu thuốc nhuộm

- Xác định chương trình nhiệt độ và ghi nhận màu thuốc nhuộm:

	Bước	Số chu kỳ lặp lại	Ghi nhận tín hiệu	Nhiệt độ [°C]	Thời gian [phút:giây]
Biến tính	Giữ	1	-	95	02:00
Khuếch đại	Chu kỳ	45	-	95	00:15
			Có	58	00:45
			-	72	00:15

10. Phân tích dữ liệu

Để biết thông tin cơ bản về phân tích dữ liệu trên một số hệ thống realtime PCR cụ thể, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng của hệ thống tương ứng.

Để tham khảo hướng dẫn chi tiết về phân tích dữ liệu được tạo ra từ RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 trên một số hệ thống realtime PCR cụ thể, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của chúng tôi (xem chương 14. Hỗ trợ kỹ thuật).

10.1 Tính hợp lệ của các lần chạy xét nghiệm chẩn đoán

10.1.1 Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán hợp lệ (định tính)

Một lần chạy xét nghiệm chẩn đoán **định tính** được coi là **hợp lệ** khi thoả mãn các điều kiện kiểm soát sau:

Mã kiểm chuẩn	Kênh nhận diện		
	Cy ⁵	FAM™	JOE™
Đối chứng dương (<i>tcdA</i> và <i>tcdB</i>)	+	+	+/-*
Đối chứng âm	-	-	+

* Sự hiện diện hay vắng mặt của một tín hiệu trong kênh JOE™ không liên quan đến tính hợp lệ của lần chạy thử nghiệm.

10.1.2 Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán không hợp lệ (định tính)

Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán **định tính** được coi là **không hợp lệ** khi (i) quá trình chạy chưa hoàn tất hoặc (ii) không đáp ứng bất kỳ điều kiện kiểm soát nào đối với một lần chạy chẩn đoán **hợp lệ**.

Trong trường hợp lần chạy xét nghiệm chẩn đoán bị coi là **không hợp lệ**, lặp lại xét nghiệm bằng cách sử dụng nucleic acid tinh khiết còn lại hoặc bắt đầu lại từ các mẫu ban đầu.

10.2 Diễn giải kết quả

10.2.1 Phân tích định tính

Kênh nhận diện			Diễn giải kết quả
Cy [®] 5	FAM™	JOE™	
+	+	+*	Phát hiện DNA đặc hiệu cho <i>tcdA</i> và <i>tcdB</i> .
+	-	+*	Phát hiện DNA đặc hiệu cho <i>tcdA</i> .
-	+	+*	Phát hiện DNA đặc hiệu cho <i>tcdB</i> .
-	-	+	Không phát hiện thấy DNA đặc hiệu cho <i>tcdA</i> và <i>tcdB</i> . Mẫu không chứa đủ lượng DNA đặc hiệu cho <i>tcdA</i> hoặc <i>tcdB</i> để có thể phát hiện.
-	-	-	PCR bị ức chế hoặc hóa chất bị hỏng. Lặp lại xét nghiệm với mẫu ban đầu hoặc thu thập và xét nghiệm mẫu mới.

* Việc phát hiện chất nội chuẩn (IC) trong kênh nhận diện JOE™ là không bắt buộc đối với các kết quả dương tính trong kênh nhận diện Cy[®]5 hoặc kênh nhận diện FAM™. Tải lượng cao DNA của *tcdA* và/hoặc *tcdB* trong mẫu có thể làm giảm hoặc mất tín hiệu chất nội chuẩn (IC).

11. Đánh giá hiệu suất

Việc đánh giá hiệu suất của RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 được thực hiện bằng cách sử dụng DNA của chủng *Clostridium difficile* ATCC® BAA-1804™ đã biết trước hàm lượng từ Hệ thống Chủng chuẩn của Hoa Kỳ có chứa cả hai mục tiêu [độc tố A (*tcdA*) và độc tố B (*tcdB*)].

11.1 Độ nhạy phân tích

Độ nhạy phân tích của RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 được định nghĩa là nồng độ (bản sao/μl sản phẩm rửa giải) của các phân tử DNA đặc hiệu cho *tcdA* hoặc *tcdB* có thể được phát hiện với tỷ lệ dương tính là 95 %. Độ nhạy phân tích được xác định bằng cách phân tích dãy pha loãng bậc liên tiếp của *tcdA* DNA và *tcdB* DNA.

Bảng 2: Kết quả PCR được sử dụng để tính toán độ nhạy phân tích đối với việc phát hiện DNA đặc hiệu cho *tcdA*

Nồng độ đầu vào [bản sao/μl]	Số mẫu lặp	Số mẫu dương tính	Tỉ lệ biểu hiện [%]
100,000	24	24	100,000
31,620	24	24	100,000
10,000	24	24	100,000
3,162	24	24	100,000
1,000	24	24	100,000
0,316	24	23	95,833
0,200	24	21	87,500
0,100	24	14	58,333
0,032	24	7	29,167
0,010	24	4	16,667
0,0032	24	1	4,167

Bảng 3: Kết quả PCR được sử dụng để tính toán độ nhạy phân tích đối với việc phát hiện DNA đặc hiệu cho *tcdB*

Nồng độ đầu vào [bản sao/μl]	Số mẫu lặp	Số mẫu dương tính	Tỉ lệ biểu hiện [%]
100,00	24	24	100,000
31,62	24	24	100,000
10,00	24	24	100,000
3,162	24	24	100,000
1,000	24	24	100,000
0,316	24	24	100,000
0,200	24	21	100,000
0,100	24	10	41,667
0,032	24	5	20,833
0,010	24	2	8,333
0,0032	24	1	4,167

Độ nhạy phân tích của RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 được xác định bằng phân tích probit:

- Đối với việc phát hiện DNA đặc hiệu cho *tcdA*, độ nhạy phân tích là 0,46 bản sao/μl [khoảng tin cậy 95% (CI): 0,28–0,96 bản sao/μl]
- Đối với việc phát hiện DNA đặc hiệu cho *tcdB*, độ nhạy phân tích là 0,47 bản sao/μl [khoảng tin cậy 95% (CI): 0,30–0,93 bản sao/μl]

11.2 Độ đặc hiệu phân tích

Mức độ phản ứng (Reactivity)

Độ đặc hiệu phân tích đối với mức độ phản ứng của RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 được đánh giá bởi một nhóm DNA bộ gen chiết xuất từ các chủng *C. difficile* sản sinh nhiều loại độc tố khác nhau.

RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 có thể phát hiện và phân biệt DNA của các chủng *C. difficile* sản sinh nhiều loại độc tố khác nhau:

- ATCC® BAA-1875™ *Clostridium difficile* (sự hiện diện của gen tcdB được xác nhận bằng PCR)
- ATCC® BAA-1875™ *Clostridium difficile* (sự hiện diện của gen tcdA và tcdB được xác nhận bằng PCR)
- ATCC® BAA-1801™ *Clostridium difficile* (không có gen tcdA và tcdB được xác nhận bằng PCR)

Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu phân tích của RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 được đánh giá bằng cách xét nghiệm một nhóm bộ gen RNA/DNA tách chiết được từ các tác nhân gây bệnh đường tiêu hóa khác nhau và hệ vi khuẩn cộng sinh được tìm thấy trong ruột và phân.

RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 không phản ứng chéo với bất kỳ mầm bệnh nào trong số các mầm bệnh sau:

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

11.3 Độ đúng (Precision)

Độ đúng (precision) của RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 được xác định là biến động trong một lần xét nghiệm, biến động giữa các lần xét nghiệm và biến động giữa các lô sản xuất khác nhau. Biến động tổng số được tính toán bằng cách kết hợp 3 phân tích.

Dữ liệu về sự biến động được thể hiện dưới dạng độ lệch chuẩn và hệ số biến thiên dựa trên các giá trị chu kỳ ngưỡng (C_t). Trên mỗi mẫu, ít nhất có 6 mẫu lặp được phân tích về sự biến động trong mỗi xét nghiệm, biến động giữa các xét nghiệm và biến động giữa các lô.

Bảng 4: Dữ liệu chính xác để phát hiện DNA đặc hiệu cho *tcdA* và *tcdB*

<i>tcdA</i> và <i>tcdB</i>		Chu kỳ ngưỡng trung bình (C_t)	Độ lệch chuẩn	Hệ số biến thiên [%]
Biến động trong mỗi xét nghiệm	<i>tcdA</i>	30,91	0,15	0,49
	<i>tcdB</i>	30,59	0,15	0,47
Biến động giữa các xét nghiệm	<i>tcdA</i>	30,77	0,18	0,58
	<i>tcdB</i>	30,82	0,20	0,64
Biến động giữa các lô	<i>tcdA</i>	30,57	0,13	0,41
	<i>tcdB</i>	30,63	0,12	0,39
Biến động tổng số	<i>tcdA</i>	30,68	0,12	0,39
	<i>tcdB</i>	30,75	0,21	0,68

Bảng 5: Dữ liệu chính xác để phát hiện chất nội chuẩn

Chứng nội	Chu kỳ ngưỡng trung bình (C _t)	Độ lệch chuẩn	Hệ số biến thiên [%]
Biến động trong mỗi xét nghiệm	26,37	0,08	0,30
Biến động giữa các xét nghiệm	26,28	0,12	0,47
Biến động giữa các lô	26,17	0,06	0,23
Biến động tổng số	26,24	0,12	0,45

12. Hạn chế

- Cần tuân thủ nghiêm ngặt hướng dẫn sử dụng để thu được kết quả tối ưu.
- Việc sử dụng sản phẩm này chỉ giới hạn ở nhân sự được hướng dẫn và đào tạo chuyên sâu về các kỹ thuật realtime PCR và quy trình chẩn đoán *in vitro*.
- Cần phải có quy định thực hành tốt phòng thí nghiệm (GLP) để thực hiện đúng xét nghiệm này. Cần hết sức cẩn thận để bảo vệ độ tinh khiết của các thành phần trong bộ kit và các lần thiết lập phản ứng. Tất cả các hóa chất phải được giám sát chặt chẽ về tạp chất và tình trạng nhiễm chéo. Bất kỳ loại hóa chất nào nghi ngờ có vấn đề đều phải được thải bỏ.
- Cần thiết lập các quy trình thu thập, vận chuyển, bảo quản và xử lý mẫu thích hợp để thực hiện tối ưu xét nghiệm này.
- Xét nghiệm này không được sử dụng trực tiếp trên mẫu vật. Các phương pháp tách chiết nucleic acid thích hợp phải được tiến hành trước khi sử dụng xét nghiệm này.
- Sự xuất hiện của chất ức chế PCR (ví dụ như heparin) có thể gây ra kết quả âm tính giả hoặc không hợp lệ.
- Các đột biến tiềm ẩn trong vùng mục tiêu của bộ gen *tcdA* và *tcdB* được bao bọc bởi các đoạn môi và/hoặc đầu dò được sử dụng trong bộ dụng cụ có thể dẫn đến việc không phát hiện được sự hiện diện của mầm bệnh.
- Với xét nghiệm chẩn đoán, kết quả RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 phải được diễn giải dựa trên tất cả các phát hiện lâm sàng và kết quả xét nghiệm.

13. Kiểm soát chất lượng

Theo Hệ thống Quản lý Chất lượng của Altona Diagnostics GmbH được chứng nhận EN ISO 13485, mỗi lô RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 đều được kiểm tra theo các thông số kỹ thuật đã ấn định trước để đảm bảo chất lượng sản phẩm nhất quán.

14. Hỗ trợ kỹ thuật

Để được cung cấp dịch vụ hỗ trợ khách hàng, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của chúng tôi:

Email: support@altona-diagnostics.com

Số điện thoại: +49-(0)40-5480676-0

15. Tài liệu

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

16. Thương hiệu và tuyên bố miễn trừ trách nhiệm

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Tên, nhãn hiệu đã đăng ký v.v. được sử dụng trong tài liệu này, ngay cả khi không được đánh dấu cụ thể như vậy, không thể coi là không được pháp luật bảo vệ.

















RealStar® Clostridium difficile PCR Kit 2.0 là bộ kit chẩn đoán đã được gắn nhãn CE theo chỉ thị 98/79/EC của Châu Âu về chẩn đoán *in vitro* (trong ống nghiệm).

Sản phẩm chưa được Bộ Y tế Canada cấp phép và chưa được FDA cho phép hoặc phê duyệt.

Không hiện diện ở tất cả các quốc gia.

© 2023 altona Diagnostics GmbH; bảo lưu mọi quyền.

17. Giải thích các ký hiệu

Biểu tượng	Giải thích
	Thiết bị y tế chẩn đoán <i>in vitro</i>
	Mã lô
	Màu nắp
	Số catalogue
	Nội dung
	Mã số
	Thành phần
	Mã giao dịch toàn cầu của sản phẩm
	Tham khảo hướng dẫn sử dụng
	Chứa đủ cho "n" xét nghiệm/phản ứng (rxns)
	Giới hạn nhiệt độ
	Hạn sử dụng
	Nhà sản xuất
	Thận trọng: Nêu rõ các hướng dẫn hoặc quy trình vận hành, nếu không được tuân thủ một cách chính xác, có thể dẫn đến các vấn đề thương tích về người hoặc ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm. Liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của Altona Diagnostics để được hỗ trợ.
	
	Lưu ý: Thông tin cung cấp cho người dùng là hữu ích nhưng không cần thiết cho nhiệm vụ hiện tại.
	Phiên bản

Ghi chú:

Ghi chú:

Ghi chú:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

