

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

H. pylori + Clarithromycin resistance

Handbook for the following references/

Manual para las siguientes referencias:

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CLA106L
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CLA106H
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CLA112L
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CLA112H
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CLA113L
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CLA113H

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification of *H. pylori* and detection of clarithromycin (CLR) resistance in *H. pylori* in human stool samples and gastric tissue biopsies from patients with signs and symptoms of gastrointestinal infection. This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of *H. pylori* and its resistance to clarithromycin in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from stool specimens and gastric tissue biopsies, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe for *H. pylori* and clarithromycin resistance in *H. pylori*. The assay for detecting CLR resistance in *H. pylori* is based on detection of point mutations in the 23S rRNA gene.

2. Summary and Explanation

The genus *Helicobacter* belongs to the family *Helicobacteriaceae* of the order *Campylobacterales*. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a gram-negative microaerophilic spiral-shaped bacterium, which is able to colonize the mucus layer of the human stomach and the upper part of small intestine (duodenum).

More than half of the world population is estimated to be infected with *H. pylori*, but most individuals are asymptomatic. The new infections might be due to direct person-to-person transmission, via either an oral-oral, fecal-oral route or both. Nevertheless, the role of coccoid form of *H. pylori* as a vehicle of infection from food and water sources should not be discarded. *H. pylori* is involved in the pathogenesis of atrophic gastritis, gastroduodenal ulcer, gastric cancer and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma.

At present, several diagnostic assays for *H. pylori* detection are available and grouped as "invasive" or "noninvasive", but none of them can be considered as gold standard alone. Invasive methods include histology, culture and rapid urease testing, which require gastric biopsy specimens obtained by gastroduodenoscopy. Noninvasive approaches include fecal antigen detection, serologic testing, and urea breath testing among others.

Urease is an important factor for the maintenance and virulence of the bacterium in the gastric mucosa. It is composed of two structural subunits encoded by genes, *ureA* and *ureB*, which have been frequently employed as target genes for the specific detection of *Helicobacter pylori*.

Clarithromycin is a bacteriostatic antibiotic mostly used in childhood to treat upper and lower respiratory tract infections, but, its application to treat *H. pylori* is the most used indication. The main action mode of clarithromycin as one of the wide-spectrum antibiotics used in *H. pylori* therapy is to prevent protein translation. Following the first exposure to the clarithromycin, spontaneously mutations (in both 23S rRNA operons) confer *H. pylori* resistance genotype and phenotype. The direct impact of these mutations is emergence of *H. pylori* strains resistant to clarithromycin. To now, two major mutations A2142G and A2143G were listed as main cause of antibiotic resistance in clinical isolates.



3. Principle of the procedure

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of *H. pylori* and Clarithromycin resistance *H. pylori* in human stool samples and gastric tissue biopsies. After DNA isolation, the identification of *H. pylori* and/or its Clarithromycin resistance is performed by the amplification of a conserved region of the *ureB* and 23S rRNA genes respectively, using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bounded to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence can be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in an stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity. Point mutations in the 23S rRNA gene of *H. pylori* (A2142G and A2143G), which confer resistance to Clarithromycin are amplified and detected in FAM channel, *H. pylori* DNA targets are amplified and detected in ROX channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-CLA1SL/ VS-CLA1SH	<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-CLA1C	<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CLA106L, VS-CLA106H, VS-CLA112L and VS-CLA112H.



Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-CLA1PL/ VS-CLA1PH	<i>H. pylori</i> + <i>Clarithromycin</i> resistance 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-CLA1C	<i>H. pylori</i> + <i>Clarithromycin</i> resistance Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin* resistance Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-CLA113L and VS-CLA113H.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin* resistance Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler) (to check compatibility see Annex I).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes.
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use past expiration date.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.



- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different kits and/or lots.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

8. Test procedure

8.1. Sample preparation

Stool samples and gastric tissue biopsies should be collected in clean containers and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. We recommend to use fresh samples.

For longer storage, the samples must be frozen at -20°C or -80°C. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenise stool samples and/or gastric tissue biopsies as thoroughly as possible prior to preparation. Freezing and thawing cycles are not recommended.

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in "the instructions for use" of the extraction kit used.

8.1.1. DNA extraction

For DNA extraction from human stool samples and/or gastric tissue biopsies you can use your manual or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. We have validated the following extraction kits:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended*.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- Maxwell®RSC Blood DNA Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- ZP02004 MagPurix Tissue DNA Extraction Kit and ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit (biopsies specimens), using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.)
- ZP02011 MagPurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit A and ZP02012 MagPurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B (stool samples), using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).



*In order to improve the yield and quality of bacterial DNA from stool or biopsies specimens, we recommend the sample pretreatment with Lysozyme at 37°C as described on "Instructions for use" for bacterial DNA isolation. In addition, usage of small elution volumes may raise the DNA/RNA concentration.

8.2. Lyophilized positive control

H. pylori + Clarithromycin resistance Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *H. pylori* + Clarithromycin resistance Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

8.3. PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *H. pylori* + Clarithromycin resistance Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps. Centrifuge briefly.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up your thermocycler.

Program your thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	63°C

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (Clarithromycin resistance in *H. pylori*), ROX (*H. pylori*) and HEX, JOE or VIC channels (CI). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, StepOne Plus™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for



ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* in the positive control well. The analysis of the samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

Using the following table read and analyze the results:

Clarithromycin resistance <i>H. pylori</i> (FAM)	<i>H. pylori</i> (ROX)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	Clarithromycin resistance and <i>H. pylori</i> Positive
-	-	+	-	+	Clarithromycin resistance and <i>H. pylori</i> Negative
+	-	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> not detected
-	+	+/-	-	+	Clarithromycin resistance Negative, <i>H. pylori</i> Positive
-	-	-	-	-	Experiment fail
+	+	+	+	+	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

+: Amplification curve

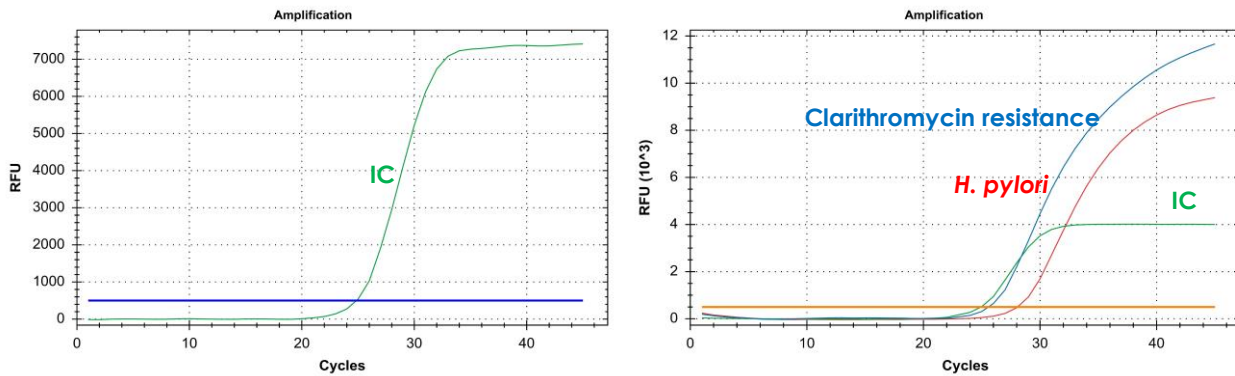
-: No amplification curve

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.



Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



Negative control

Positive control

The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated only with human faecal samples and gastric tissue biopsies.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *H. pylori* and Clarithromycin resistance in *H. pylori*, either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.



12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit was tested using 73 human faecal samples and gastric tissue biopsies from symptomatic patients. These results were compared with those obtained with a molecular detection method (RIDA®GENE *Helicobacter pylori* (R-Biopharm)).

The results were as follows:

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE <i>Helicobacter pylori</i> (R-Biopharm)			
		+	-	Total
	+	68	2*	70
	-	0	3	3
	Total	68	5	73

Table 5. Comparative results for *H. pylori*.

*The low amount of template DNA isolated from stool samples is below the detection limit of the method used. But DNA extracted from gastric tissue biopsies from the same patients were amplified with both Real Time PCR kits at the same time, confirming our results.

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE <i>Helicobacter pylori</i> (R-Biopharm)			
		+	-	Total
	+	27	9*	36
	-	0	37	37
	Total	27	46	73

Table 6. Comparative results for Clarithromycin resistance.

*The low amount of template DNA in this sample is below the detection limit of the method used.

In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect Clarithromycin resistance in *H. pylori* and *H. pylori* using VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction for Clarithromycin resistance in *H. pylori* and *H. pylori* (Figure 2 and 3).



Figure 2. Dilution series of Clarithromycin resistance in *H. pylori* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel FAM).

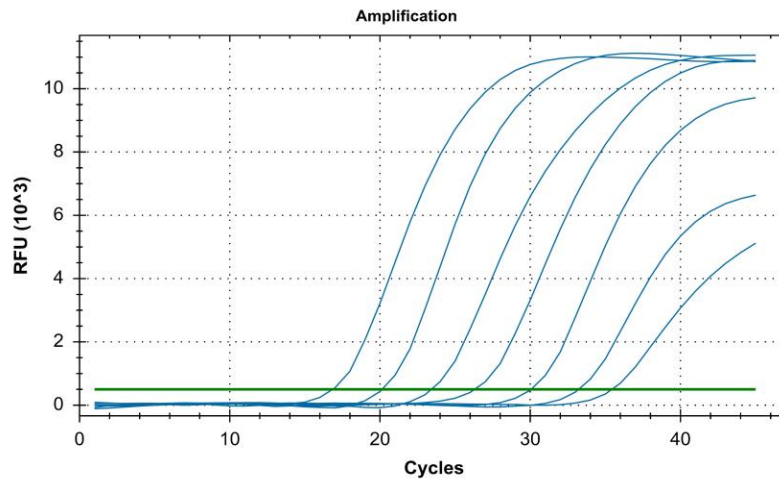
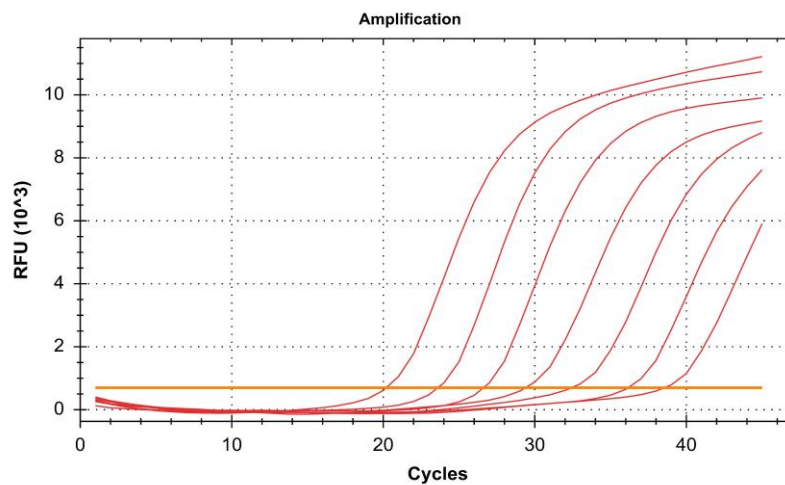


Figure 3. Dilution series of *H. pylori* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel ROX).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *H. pylori* + Clarithromycin resistance assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common enteric pathogens or flora present in the intestine. No cross-reactivity was detected between almost any of the following microorganisms tested, except *H. heilmannii*, which together with *H. pylori* can cause chronic gastritis in humans.



Cross-reactivity testing					
<i>Helicobacter felis</i>	-	<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Arcobacter butzleri</i>	-
<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Helicobacter heilmannii</i>	-/+	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Salmonella paratyphi</i> A	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	Adenovirus serotypes 40/41	-
<i>Salmonella paratyphi</i> B	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	Rotavirus A	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Norovirus Genotypes I and II	-
<i>Salmonella bongori</i>	-	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	-	Astrovirus Genotype I-VIII	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	<i>Blastocystis hominis</i>	-	Sapovirus	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	-	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-
<i>Salmonella pullorum</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i>	-	<i>Dientamoeba fragilis</i>	-

Table 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit for *Helicobacter pylori* was evaluated against *Helicobacter pylori* strain J99 and Sydney, showing positive result.

The reactivity of VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit for Clarithromycin resistance was evaluated against *H. pylori* strains wild-type and harbour point mutations A2142G or A2143G, showing negative and positives results, respectively.



ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a low profile block, like the systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a high or regular profile block, like the systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Select Ramp Speed "Standard".

(2) See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.

(3) The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into the specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.

(4) Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.

(5) No detection in Cy5 channel.

(6) Detection in FAM and HEX channels only.

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.



ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

The fluorescence detection channels for some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.



ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Set exposition values as follow:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -150, HEX channel – 3000, ROX channel – 2000 and Cy5 channel - 1500.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 150, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel – 100.



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *H. pylori* y su resistencia a Claritromicina (CLR) en muestras de heces humanas y biopsias (tejido gástrico) procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección gastrointestinal. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *H. pylori* y su resistencia a Claritromicina en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las muestras fecales y biopsias gástricas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (quencher) para detectar *H. pylori* y su resistencia a Claritromicina. El ensayo para detectar la resistencia a CLR en *H. pylori* está basado en la detección de mutaciones puntuales en el gen 23S rRNA.

2. Introducción y explicación

El género *Helicobacter pylori* pertenece a la familia *Helicobacteriaceae*, a la orden *Campylobacteriales*. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria gram-negativa de forma de espiral microaerofílica que es capaz de colonizar el epitelio gástrico humano y la parte superior del intestino delgado (duodeno).

Se estima que más de la mitad de la población está infectada con *H. pylori*, pero la mayoría de los individuos son asintomáticos. Las nuevas infecciones pueden deberse a la transmisión directa entre personas, ya sea a través de la vía oral-oral, fecal-oral o ambas. Sin embargo, no debe descartarse el papel de la forma cocoide de *H. pylori* como un vehículo de infección a partir de diferentes fuentes de transmisión, como los alimentos y el agua. *H. pylori* está implicado en la patogénesis de la gastritis atrófica, úlcera gastroduodenal, cáncer gástrico y linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT).

En la actualidad, hay varios ensayos diagnósticos disponibles para la detección de *H. pylori* agrupados como “invasivos” o “no invasivos” pero ninguno de ellos puede considerarse *gold standard* por sí solo. Los métodos invasivos incluyen histología, cultivo y test rápido de ureasa, lo que requiere muestras de biopsia gástrica obtenidas mediante una gastroscopia. Los métodos no invasivos incluyen la detección del antígeno en heces, pruebas serológicas y prueba del aliento (UBT) entre otros.

La ureasa es un factor importante para el mantenimiento y la virulencia de la bacteria en la mucosa gástrica. Se compone de dos subunidades estructurales codificadas por genes, *ureA* y *ureB*, que han sido utilizadas frecuentemente como genes diana para la detección específica de *H. pylori*.

La claritromicina es un antibiótico bacteriostático que se usa principalmente en la infancia para tratar las infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores, pero su indicación para tratar *H. pylori* es la más utilizada. El modo de acción principal de la claritromicina, como uno de los antibióticos de amplio espectro utilizados en la terapia contra *H. pylori*, es prevenir la traducción de proteínas. Después de la primera exposición a la claritromicina, las mutaciones espontáneas (en ambos operones de 23S rRNA) confieren genotipo y fenotipo de resistencia a *H. pylori*. El impacto directo de estas mutaciones es la aparición de cepas de *H. pylori* resistentes



a la claritromicina. Hasta ahora, las dos mutaciones principales son A2142G y A2143G, se consideraron como la principal causa de resistencia a los antibióticos clínicos aislados.

3. Procedimiento

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *H. pylori* y su resistencia a Claritromicina en muestras de heces humanas y biopsias (tejido gástrico). Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *H. pylori* y su resistencia a Claritromicina se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes *ureB* y 23S rRNA para *H. pylori* y su resistencia a Claritromicina respectivamente.

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la amplificación, las mutaciones puntuales en el gen 23S rRNA de *H. pylori* (A2142G y A2143G), que le confieren resistencia a Claritromicina se detectan en el canal FAM, *H. pylori* se detecta en el canal ROX y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2:



Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-CLA1SL/ VS-CLA1SH	<i>H. pylori</i> + <i>Clarithromycin</i> resistance 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores- sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-CLA1C	<i>H. pylori</i> + <i>Clarithromycin</i> resistance Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin* resistance Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CLA106L, VS-CLA106H, VS-CLA112L y VS-CLA112H.

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-CLA1SL/ VS-CLA1SH	<i>H. pylori</i> + <i>Clarithromycin</i> resistance 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores- sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-CLA1C	<i>H. pylori</i> + <i>Clarithromycin</i> resistance Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin* resistance Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CLA113L y VS-CLA113H.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin* resistance Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador) (para comprobar la compatibilidad ver Anexo I).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL.
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.



- Guantes desechables sin polvo.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.



8. Procedimiento del test

8.1. Preparación de la muestra

Las muestras de heces y/o biopsias (tejido gástrico) se deben recoger en recipientes limpios y deben ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda el uso de muestras frescas.

Para conservar durante un tiempo prolongado, las muestras pueden congelarse a -20°C o -80°C. En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. No se recomiendan ciclos de congelación y descongelación. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

8.1.1. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA a partir de muestras de heces humanas y/o biopsias (tejido gástrico) puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado*.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- ZP02004 MagPurix Tissue DNA Extraction Kit and ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit (muestras de biopsias), utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.)
- ZP02011 MagPurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit A y ZP02012 MagPurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B (muestras de heces humanas), utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).

**Con el fin de mejorar el rendimiento y la calidad del DNA bacteriano de las muestras de heces o biopsias, se recomienda el tratamiento previo de la muestra con lisozima a 37°C como se describe en las "Instrucciones de uso" para el aislamiento de DNA bacteriano. Además, la utilización de pequeños volúmenes de elución puede elevar la concentración de DNA.*

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control



positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 μL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 μL de DNA extraído de cada muestra, de *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador.

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	63°C

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (resistencia a Claritromicina), ROX (*H. pylori*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005PT™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *H. pylori* + *Clarithromycin resistance*. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.



Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

Clarithromycin resistance <i>H. pylori</i> (FAM)	<i>H. pylori</i> (ROX)	Control interno (HEX)	Control negativo	Control positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	Resistencia de <i>H. pylori</i> a Claritromicina y <i>H. pylori</i> Positivos
-	-	+	-	+	Resistencia de <i>H. pylori</i> a Claritromicina y <i>H. pylori</i> Negativos
+	-	+/-	-	+	No detección de <i>H. pylori</i>
-	+	+/-	-	+	Resistencia de <i>H. pylori</i> a Claritromicina Negativo, <i>H. pylori</i> Positivo
-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	Inválido

Tabla 4. Interpretación

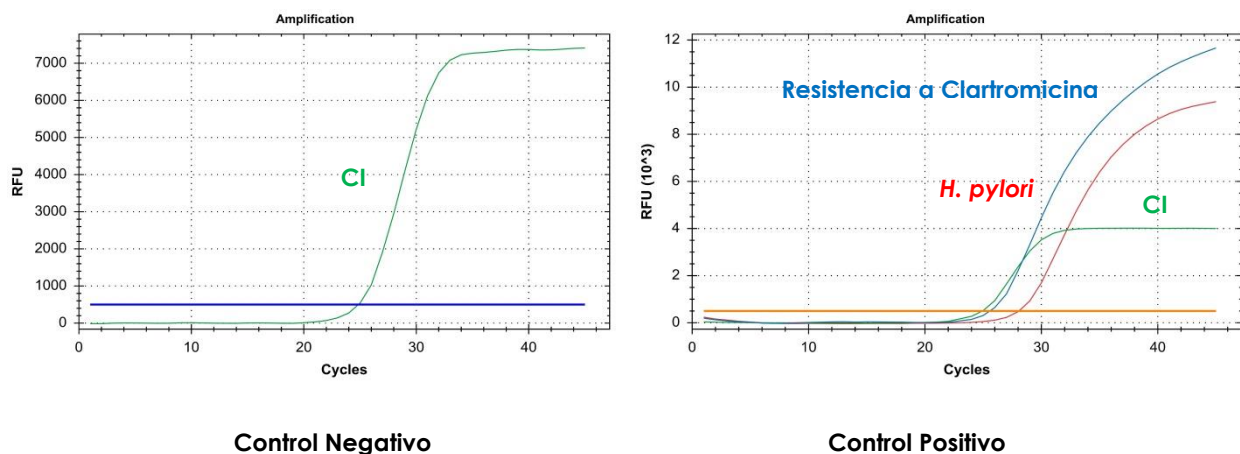
+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.



En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con muestras fecales y biopsias (tejido gástrico) humanas.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *H. pylori* y su resistencia a Claritromicina y *H. pylori* ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron 73 muestras fecales y biopsias (tejido gástrico) humanas de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular (RIDA®GENE *Helicobacter pylori* (R-Biopharm)).

Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE <i>Helicobacter pylori</i> (R-Biopharm)			
		+	-	Total
	+	68	2*	70
	-	0	3	3
	Total	68	5	73

Tabla 5. Comparativa de resultados para *H. pylori*.



* La baja cantidad de DNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado. Pero el DNA extraído a partir de biopsias (tejido gástrico) procedentes de los mismos pacientes, fueron amplificados mediante ambos test de PCR a Tiempo Real de forma simultánea, lo cual confirma nuestros resultados.

VIASURE <i>H. pylori</i> + <i>Clarithromycin resistance</i> Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE <i>Helicobacter pylori</i> (R-Biopharm)			
		+	-	Total
	+	27	9*	36
	-	0	37	37
	Total	27	46	73

Tabla 6. Comparativa de resultados para *Clarithromycin resistance*.

* La baja cantidad de DNA molde detectado en esta muestra está por debajo del límite de detección del método utilizado.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *H. pylori* y su resistencia a Claritromicina y *H. pylori*; utilizando VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para *H. pylori* y su resistencia a Claritromicina y *H. pylori*. (Figura 2 y 3).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar *Clarithromycin resistance H. pylori* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).

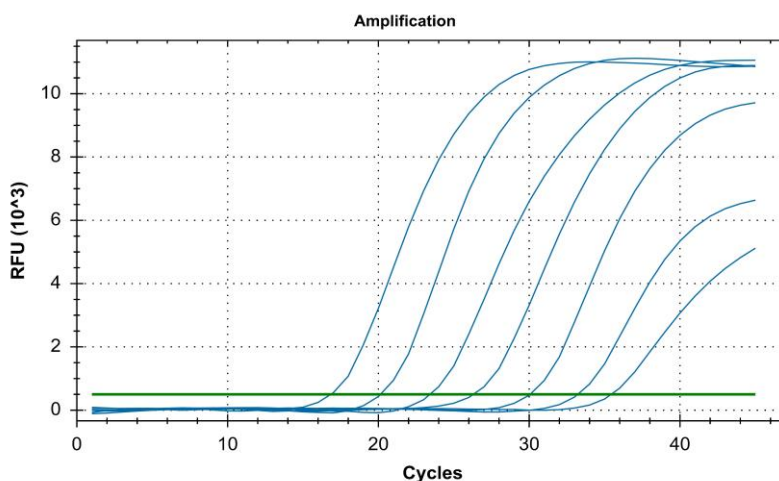
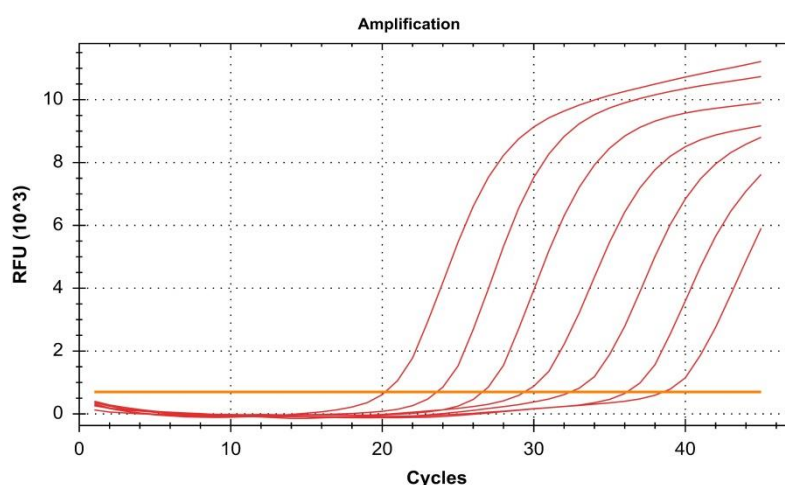


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar *H. pylori* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos entéricos más comunes o que pueden estar presentes en la flora intestinal. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, con la excepción de *H. heilmannii*, que junto con *H. pylori* puede causar gastritis crónica en humanos.

Prueba de reacción cruzada					
<i>Helicobacter felis</i>	-	<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Arcobacter butzleri</i>	-
<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Helicobacter heilmannii</i>	-/+	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Salmonella paratyphi</i> A	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	Adenovirus serotipos 40/41	-
<i>Salmonella paratyphi</i> B	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	Rotavirus A	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Norovirus Genotipos I y II	-
<i>Salmonella bongori</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica	-	Astrovirus Genotipos I-VIII	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	<i>Blastocystis hominis</i>	-	Sapovirus	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-
<i>Salmonella pullorum</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i>	-	<i>Dientamoeba fragilis</i>	-

Tabla 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.



12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit para *Helicobacter pylori* se evaluó frente a las cepas de *Helicobacter pylori* J99 y Sydney, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit para la resistencia de *H. pylori* a Claritromicina se evaluó frente a cepas de *H. pylori* wild-type y portadoras de las mutaciones puntuales A2142G y A2143G, mostrando un resultado negativo y positivo respectivamente.

13. Bibliography/Bibliografía

1. C. Schabereiter-Gurtner *et al.* Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(10): 4512-4518.
2. J.G. Kusters *et al.* Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19(3): 449-490.
3. F. Can *et al.* Urease activity and urea gene sequencing of coccoid forms of *Helicobacter pylori* induced by different factors. *Current Microbiology* 2008; 56(2): 150-155.
4. R.X. Tang *et al.* Diversity of *Helicobacter pylori* isolates in expression of antigens and induction of antibodies. *World Journal of Gastroenterology* 2008; 14(30): 4816-4822.
5. S.K. Patel *et al.* Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World Journal of Gastroenterology* 2014; 20(36): 12847-12859.
6. M. Varbanova *et al.* Chronic gastritis-an update. Best Practice & Research: *Clinical Gastroenterology* 2014; 28(6): 1031-1042.
7. Abadi A.T.B. *et al.* Resistance to clarithromycin and gastroenterologist's persistence roles in nomination for *Helicobacter pylori* as high priority pathogen by World Health Organization. *World Journal of Gastroenterology* 2017; 23(35): 6379-6384.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

	In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test		Sample diluent Diluyente de muestra		Catalogue number Número de referencia



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

(2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.

(3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

(4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real.



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -150, canal HEX - 3000, canal ROX - 2000 y canal Cy5 -1500.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -150, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 100.



VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-time Detection Thermal Cycler, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System and VIASURE 96 Real Time PCR System. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-time Detection Thermal Cycler, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.







CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev00

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC