

# Vitassay qPCR

## H. pylori ClariRes

PCR en tiempo real para la detección cualitativa de *H. pylori* y su resistencia a Claritromicina (CLR) en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection of *H. pylori* and detection of clarithromycin (CLR) resistance in human samples



## Uso previsto

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes, permite la detección de *Helicobacter pylori* y su resistencia a Claritromicina (CLR) mediante PCR a tiempo real en muestras de heces humanas y biopsias (tejido gástrico). Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infección producida por *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.

## Referencias

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes 4x8-well strip, low profile 7041034

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes 4x8-well strip, high profile 7042034

## Materiales/Reactivos suministrados

| Código                | Reactivo/Material                                    | Color    | Cantidad              |
|-----------------------|--|----------|-----------------------|
| 7041S034/<br>7042S034 | <i>H. pylori</i> ClariRes strips<br>low/high profile | -        | 4 tiras de 8 pocillos |
| 7C034                 | <i>H. pylori</i> ClariRes Positive<br>Control        | rojo     | 1 vial                |
| 7001A                 | PCR grade water                                      | blanco   | 1 vial x 1 mL         |
| 7002B                 | Resuspension buffer                                  | verde    | 1 vial x 1 mL         |
| 7003N                 | Negative control                                     | amarillo | 1 vial x 1 mL         |
| 7004O                 | Tapas ópticas  | -        | 4 tiras de 8 tapones  |

## Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alcuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

## Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL

- Vórtex
- Micropipetas (1-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

## Resumen

Las especies de *Helicobacter* tienen un amplio rango de hospedadores y se pueden subdividir en dos linajes principales, las especies gástricas (*H. pylori*, *H. felis*, *H. mustelae*, *H. acinonychis*, *H. heilmannii*) y las especies enterohepáticas (no gástricas) (*H. hepaticus*). Entre ellos, *H. pylori* y *H. heilmannii* infectan ambos a humanos y producen gastritis e incluso enfermedad ulcerosa.

*Helicobacter pylori* es una bacteria común que infecta a aproximadamente la mitad de la población mundial, con una mayor prevalencia en los países en desarrollo, donde *H. pylori* podría infectar hasta el 80% de la población, que en los países desarrollados. *H. pylori* se asocia con el desarrollo de trastornos gastrointestinales como gastritis crónica, úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico. *H. pylori* también está involucrado en el desarrollo de otros trastornos extragástricos como el linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT), la púrpura trombocitopénica idiopática, la deficiencia de vitamina B12 y la deficiencia de hierro. La erradicación de *H. pylori* podría ayudar en el tratamiento de estos trastornos asociados con *H. pylori*. Durante las últimas dos décadas, el tratamiento recomendado para la erradicación del *H. pylori* es la terapia triple estándar, que utiliza un inhibidor de la bomba de protones o ranitidina citrato de bismuto, combinado con claritromicina y amoxicilina o metronidazol.

Debido al aumento en la prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos, la terapia triple con claritromicina ya no es el mejor tratamiento para *H. pylori*, especialmente en algunas áreas donde la resistencia local a este antibiótico es superior al 20%.

Recientemente, se desarrolló una reacción en cadena de la polimerasa como una herramienta alternativa para la detección de la resistencia a la claritromicina. Esta técnica evalúa con precisión las mutaciones en la región peptidiltransferasa codificada en el dominio V del gen del RNA ribosomal 23S de *H. pylori* que confiere resistencia a la claritromicina.

## Principio del test

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes se basa en la amplificación a tiempo real de una región diana conservada de los genes *ureB* para *H. pylori* y 23S rRNA para su resistencia a Claritromicina y la secuencia wild-type en 23S rRNA. Tras la extracción de DNA, la presencia de *Helicobacter Pylori* y/o las mutaciones puntuales en el gen 23S

rRNA de *H. pylori* que le confieren la resistencia a Claritromicina y/o Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA se detecta mediante un aumento de fluorescencia durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes, se trata de un test *listo para usar* que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana es detectada en el canal FAM (las mutaciones puntuales en el gen 23S rRNA de *H. pylori* (A2142G y A2143G), que le confieren resistencia a Claritromicina), ROX (*H. pylori*) y HEX, VIC o JOE (Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA) mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal Cy5 (según el equipo utilizado).

## Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar 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.

## Procedimiento

### Toma de muestra, preparación y extracción de DNA.

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las

instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando Maxwell® 16 instrument (Promega).

ZP02004 MagPurix Tissue DNA Extraction Kit y 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.)

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)\*.

NucleoMag® Pathogen (Macherey Nagel).

NucleoSpin RNA Virus (Macherey Nagel).

MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).

NX-48 Stool DNA Kit using the Nextractor® NX-48 system, (Genolution).

\*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.

## **Preparación del control positivo**

Reconstituir el contenido liofilizado del H. pylori ClariRes Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

## Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

## Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

| Etapa                                       | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---|-------------|--------|--------|
| Desnaturalización inicial                   | 95°C        | 2 min  | 1      |
| Desnaturalización                           | 95°C        | 10 seg | 45     |
| Hibridación/Elongación (Recogida de datos*) | 63°C        | 50 seg |        |

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (\*) a través de los canales FAM (resistencia a Claritromicina), ROX (*H. pylori*) y los canales HEX, JOE o VIC (Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA) y Cy5 (CI). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

## Análisis e interpretación de resultados

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.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

### Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales de resistencia a la Claritromicina (FAM), *H. pylori* (ROX) y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA (HEX).

## Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de ROX, HEX y FAM.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

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

| Resistencia a Claritromicina (FAM) | <i>H. pylori</i> (ROX) | Claritromicina secuencia wild-type (HEX) | Control Interno (Cy5) | Control Negativo | Control Positivo | Interpretación   |
|------------------------------------|------------------------|--|-----------------------|------------------|------------------|--|
| +                                  | +                      | +  | +/-                   | -                | +                | H. pylori positivo, Resistencia a Claritromicina positiva y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva <sup>a</sup> |
| +                                  | +                      | -  | +/-                   | -                | +                | H. pylori positivo y Resistencia a Claritromicina positiva; Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA negativa <sup>b</sup> |
| -                                  | +                      | +  | +/-                   | -                | +                | H. pylori positivo y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva, Resistencia a Claritromicina negativa <sup>c</sup> |
| +                                  | -                      | +  | +/-                   | -                | +                | H. pylori negativo; Resistencia a Claritromicina positiva y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva              |
| -                                  | -                      | -  | +                     | -                | +                | H. pylori negativo, Resistencia a Claritromicina negativa y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA negativa              |
| -                                  | -                      | +  | +/-                   | -                | +                | Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva  |
| +                                  | -                      | -  | +/-                   | -                | +                | Resistencia a Claritromicina positiva  |
| -                                  | +                      | -  | +/-                   | -                | +                | Inválido   |

**Positivo (+):** Señal de amplificación

**Negativo (-):** No hay señal de amplificación

<sup>a</sup> Presencia de cepas resistentes a la claritromicina y tipo salvaje simultáneamente en la misma muestra clínica. Se deben ver niveles de fluorescencia similares en los canales HEX y FAM. Por el contrario, si se notan diferencias entre la señal fluorescente de ambos canales, mire la posibilidad de interpretación b o c.

<sup>b</sup> Se puede observar un pequeño nivel de fluorescencia en los canales HEX.

<sup>c</sup> Se puede observar un pequeño nivel de fluorescencia en los canales de FAM.

Si las muestras negativas no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

## **Control de Calidad**

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

## **Características técnicas**

### **Sensibilidad y especificidad clínica**

Un total de 206 biopsias de tejido gástrico humano provenientes de pacientes sintomáticos fueron evaluadas mediante PCR a tiempo real Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes, RIDA@GENE *Helicobacter pylori* (r-Biopharm) para *H. pylori*. *H. pylori* fue detectada en 99 muestras mediante ambos kits. Además de esto, el test *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR pudo detectar 3 muestras positivas más. (La baja cantidad de DNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado).

102 biopsias de tejido gástrico humano provenientes de pacientes sintomáticos fueron evaluadas mediante PCR a tiempo real Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes, RIDA@GENE *Helicobacter pylori* (r-Biopharm) para Clarithromycin resistance. Clarithromycin resistance fue detectada en 23 muestras mediante ambos kits. A parte de estas, 2 muestras son cepas sensibles a Claritromicina según Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes y cepas resistentes a Claritromicina según R-biopharm. Son cepas sensibles a Claritromicina según secuenciación, confirmando nuestros resultados.

102 biopsias de tejido gástrico humano provenientes de pacientes sintomáticos fueron evaluadas mediante PCR a tiempo real utilizando Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes, RIDA@GENE *Helicobacter pylori* (r-Biopharm) para Clarithromycin secuencias wild-type en el 23S rDNA. Clarithromycin secuencias wild-type en el 23S rDNA fue detectada en 77 muestras mediante ambos kits. A parte de estas, 2 muestras son cepas sensibles a



Claritromicina según Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes y cepas resistentes a Claritromicina según R-biopharm. Son cepas sensibles a Claritromicina según secuenciación, confirmando nuestros resultados.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *H. pylori* y *H. pylori* resistente a Claritromicina utilizando el kit Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes.

### **Sensibilidad analítica**

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde para *H. pylori*, su resistencia a Claritromicina y Clarithromycin secuencias wild-type en el 23S rDNA ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de DNA por reacción.

### **Especificidad analítica**

La especificidad analítica para la detección de Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes fué confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos.

No se observaron reacciones cruzadas entre ninguna de las especies con la excepción de *H. heilmanni*, cuya presencia también puede causar diversas enfermedades gastrointestinales de carácter crónico en humanos.

| Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada |  |                                       |
|---|--|---------------------------------------|
| <i>Helicobacter felis</i> *                           | <i>Campylobacter upsaliensis</i>                       | <i>Candida albicans</i>               |
| <i>Helicobacter hepaticus</i> *                       | <i>Campylobacter hyointestinalis</i> *                 | <i>Arcobacter butzleri</i>            |
| <i>Helicobacter cinaedi</i> *                         | <i>Proteus vulgaris</i>                                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>         |
| <i>Helicobacter heilmannii</i> *                      | <i>Citrobacter freundii</i>                            | <i>Enterococcus faecalis</i>          |
| <i>Shigella flexneri</i>                              | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>      | <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 *  |
| <i>Shigella dysenteriae</i>                           | <i>Serratia liquefaciens</i>                           | <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9    |
| <i>Salmonella typhi</i>                               | <i>Vibrio parahaemolyticus</i>                         | <i>Bacteroides fragilis</i>           |
| <i>Salmonella paratyphi A</i>                         | <i>Clostridium difficile</i>                           | Adenovirus serotipos 40/41            |
| <i>Salmonella paratyphi B</i>                         | <i>Clostridium difficile</i> 027*                      | Adenovirus serotipos 1-5              |
| <i>Salmonella typhimurium</i>                         | <i>Clostridium perfringens</i>                         | Adenovirus serotipos 8/15/31          |
| <i>Salmonella bongori</i>                             | <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica               | Rotavirus A                           |
| <i>Salmonella enteritidis</i>                         | <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica              | Norovirus Genotipos I y II            |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>     | <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva                 | Astrovirus Genotype I-VIII            |
| <i>Salmonella pullorum</i>                            | <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena                 | Sapovirus                             |
| <i>Salmonella gallinarum</i>                          | <i>Klebsiella oxytoca</i>                              | <i>Entamoeba histolytica</i>          |
| <i>Campylobacter lari</i> *                           | <i>Listeria monocytogenes</i>                          | <i>Entamoeba dispar</i>               |
| <i>Campylobacter fetus</i> *                          | <i>Aeromonas caviae</i>                                | <i>Cryptosporidium parvum/hominis</i> |
| <i>Campylobacter coli</i> *                           | <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i> * | <i>Giardia intestinalis</i> *         |
| <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>      | <i>Blastocystis hominis</i>                            | <i>Dientamoeba fragilis</i>           |

\*Estos organismos muestran señal de amplificación en el canal de Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA.

La especificidad del ensayo de resistencia a claritromicina fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

| Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada   |  |
|---|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315 resistente a la meticilina                                     | <i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ST398 resistente a la meticilina   | Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> mecC resistente a la meticilina  | <i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2146G)   |
| Aislado cMRSA (oxa <sup>R</sup> , PVL-positive, spa:t 310)  | <i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2147G)   |
| Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48  | <i>Enterococcus avium</i> tipo VanA  |
| Aislado <i>Klebsiella pneumonia</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48                          | <i>Enterococcus faecium</i> cepa LMG16165 tipo VanA  |
| Aislado <i>Klebsiella pneumonia</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL)y KPC-2 | <i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1 tipo VanA   |
| <i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244  | <i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2 tipo VanB   |
| <i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1  | <i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA   |
| <i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL)y OXA-48                             | <i>E. faecalis</i> (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz tipo VanB  |
| <i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1          | <i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142 tipos VanC y VanB   |
| <i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7  | <i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC |

## Reactividad analítica

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes Real Time PCR para *Helicobacter pylori* ha sido evaluado frente a las cepas *Helicobacter pylori* J99 y Sydney, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes Real Time PCR para la resistencia de *H. pylori* a Claritromicina ha sido evaluado frente a cepas de *H. pylori* *wild-type* y portadoras de las mutaciones puntuales A2142G y A2143G obteniéndose un resultado negativo y positivo respectivamente.

## Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96 <sup>TM</sup> Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)<sup>I</sup>
- SmartCycler® (Cepheid)<sup>I</sup>

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

## Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por *H. pylori*, su resistencia a la Claritromicina y Claritromicina con secuencia *wild-type* en 23S rRNA. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras fecales y biopsias (tejido gástrico) humanas. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas humanas. 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 del DNA 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*, su resistencia a la Claritromicina y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA, 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.

## Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

| Termocicladores con bloque de bajo perfil    | Termocicladores con bloque de alto perfil   |
|--|---|
| <b>Agilent Technologies</b>                  | <b>Abbott</b>                               |
| AriaMx Real-Time PCR System                  | Abbott m2000 RealTime System                |
| <b>Applied Biosystems</b>                    | <b>Applied Biosystems</b>                   |
| 7500 Fast Real-Time PCR System               | 7300 Real-Time PCR System                   |
| 7500 Fast Dx Real-Time PCR System            | 7500 Real-Time PCR System                   |
| QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast           | 7900 HT Real-Time PCR System                |
| QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast             | ABI PRISM 7000                              |
| QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast             | ABI PRISM 7700                              |
| QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System          | QuantStudio™ 12K Flex 96-well               |
| QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System          | QuantStudio™ 6 Flex 96-well                 |
| StepOne Plus™ Real-Time PCR System           | QuantStudio™ 7 Flex 96-well                 |
| StepOne™ Real-Time PCR System                | QuantStudio™ 5 Real-Time PCR                |
| ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System            | QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System         |
| <b>BIONEER</b>                               | ViiA™ 7 Real-Time PCR                       |
| Exicycler™ 96                                | <b>Analytik Jena Biometra</b>               |
| <b>Bio-Rad</b>                               | TOptical                                    |
| CFX96™ Real-Time PCR Detection System        | qTOWER 2.0                                  |
| Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System | <b>BIONEER</b>                              |
| <b>Cepheid</b>                               | Exicycler™ 96                               |
| SmartCycler®                                 | <b>Bio-Rad</b>                              |
| <b>Qiagen</b>                                | CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection    |
| Rotor-Gene® Q                                | iCycler iQ™ Real-Time PCR                   |
| <b>Roche</b>                                 | iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR                 |
| LightCycler® 480 Real-Time PCR System        | MyiQ™ Real-Time PCR Detection System        |
| LightCycler® 96 Real-Time PCR System         | MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System       |
| Cobas z480 Analyzer                          | <b>Cepheid</b>                              |
|  | SmartCycler®                                |
|  | <b>DNA-Technology</b>                       |
|  | DTlite Real-Time PCR System*                |
|  | DTprime Real-time Detection Thermal Cycler* |
|  | <b>Eppendorf</b>                            |
|  | Mastercycler™ ep <i>realplex</i>            |
|  | <b>Qiagen</b>                               |
|  | Rotor-Gene® Q                               |
|  | <b>Stratagene / Agilent Technologies</b>    |
|  | Mx3000P™ Real Time PCR System               |
|  | Mx3005P™ Real Time PCR System               |

\* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

## Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

| Termociclador                        | Canal Vitassay | Canal de Detección | Observaciones  |
|--------------------------------------|----------------|--------------------|--|
| <b>Bio-Rad CFX96™</b>                | FAM            | FAM                |  |
|                                      | HEX            | HEX                |  |
|                                      | ROX            | ROX                |  |
|                                      | Cy5            | Cy5                |  |
| <b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>   | FAM            | FAM                | Opción del control pasivo ROX desactivada  |
|                                      | HEX            | VIC                |  |
|                                      | ROX            | ROX                |  |
|                                      | Cy5            | Cy5                |  |
| <b>Roche Lightcycler®480II</b>       | FAM            | 465/510            | Se requiere compensación de color  |
|                                      | HEX            | 533/580            |  |
|                                      | ROX            | 533/610            |  |
|                                      | Cy5            | 618/660            |  |
| <b>Smartcycler® Cepheid</b>          | FAM            | Channel 1          |  |
|                                      | HEX            | Channel 2          |  |
|                                      | ROX            | Channel 3          |  |
|                                      | Cy5            | Channel 4          |  |
| <b>Abbott m2000rt</b>                | FAM            | FAM                |  |
|                                      | HEX            | VIC                |  |
|                                      | ROX            | ROX                |  |
|                                      | Cy5            | Cy5                |  |
| <b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b> | FAM            | FAM                | Opción del control pasivo ROX desactivada  |
|                                      | HEX            | VIC                |  |
|                                      | ROX            | ROX                |  |
|                                      | Cy5            | Cy5                |  |
| <b>AriaMx Agilent</b>                | FAM            | FAM                |  |
|                                      | HEX            | HEX                |  |
|                                      | ROX            | ROX                |  |
|                                      | Cy5            | Cy5                |  |
| <b>Rotor-Gene®Q Qiagen</b>           | FAM            | Green              | Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition". |
|                                      | HEX            | Yellow             |  |
|                                      | ROX            | Orange             |  |
|                                      | Cy5            | Red                |  |
| <b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>         | FAM            | FAM                |  |
|                                      | HEX            | HEX                |  |
|                                      | ROX            | ROX                |  |
|                                      | Cy5            | Cy5                |  |

### Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

| Termociclador  | Canal Vitassay | Valor de exposición |
|--|----------------|---------------------|
| <b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>                | FAM            | 500                 |
|  | HEX            | 500                 |
|  | ROX            | 500                 |
|  | Cy5            | 500                 |
| <b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b> | FAM            | 500                 |
|  | HEX            | 1000                |
|  | ROX            | 1000                |
|  | Cy5            | 1000                |



## Intended use

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes allows the detection of *Helicobacter pylori* and clarithromycin (CLR) resistance in *H. pylori* by real-time PCR in human stool samples and gastric tissue biopsies. The product is intended for use in the diagnosis of *Helicobacter pylori* and clarithromycin (CLR) resistance in *H. pylori* infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay for detecting CLR resistance in *H. pylori* is based on detection of point mutations in the 23S rRNA gene.

## References

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes 4x8-well strip, low profile 7041034

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes 4x8-well strip, high profile 7042034

## Materials/reagents provided

| Reference             | Reagent/Material                                  | Colour | Amount         |
|-----------------------|---|--------|----------------|
| 7041S034/<br>7042S034 | <i>H. pylori</i> ClariRes strips low/high profile | -      | 4x8-well strip |
| 7C034                 | <i>H. pylori</i> ClariRes Positive Control        | red    | 1 vial         |
| 7001A                 | PCR grade water                                   | white  | 1 vial x 1 mL  |
| 7002B                 | Resuspension Buffer                               | green  | 1 vial x 1 mL  |
| 7003N                 | Negative control                                  | yellow | 1 vial x 1 mL  |
| 7004O                 | Optical caps                                      | -      | 4x8 cap strip  |

## Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

## Additional equipment and material required

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 ml tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µl, 20-200 µl)

- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

## Summary

*Helicobacter* species have a wide host range and can be subdivided into two major lineages, the gastric species (*H. pylori*, *H. felis*, *H. mustelae*, *H. acinonychis*, *H. heilmannii*) and the enterohepatic (nongastric) species (*H. hepaticus*). Among them, *H. pylori* and *H. heilmannii* infect both humans and result in gastritis and even in ulcer disease.

*Helicobacter pylori* is a common bacterium infecting about half of world's population, with higher prevalence in developing countries, where *H. pylori* could infect up to 80% of the population, than in developed ones. *H. pylori* is associated with the development of gastrointestinal disorders as chronic gastritis, peptic ulcer, and gastric adenocarcinoma. *H. pylori* is also involved in the development of other extra-gastric disorders such as mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALT), idiopathic thrombocytopenic purpura, vitamin B12 deficiency, and iron deficiency. Eradication of *H. pylori* could help in the management of these *H. pylori*-associated disorders. For the last two decades, the recommended treatment for *H. pylori* eradication is the standard triple therapy, using a proton pump inhibitor or ranitidine bismuth citrate, combined with clarithromycin and amoxicillin or metronidazole.

Due to the increase in the prevalence of *H. pylori* resistance to antibiotics, triple therapy with clarithromycin is no longer the best treatment for *H. pylori*, especially in some areas where the local resistance to this antibiotic is higher than 20%.

Recently, a polymerase chain reaction has been developed as an alternative tool for the detection of clarithromycin resistance. This technique accurately assesses mutations in the peptidyl transferase region encoded in domain V of *H. pylori* 23S ribosomal RNA gene conferring clarithromycin resistance.

## Principle of the test

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes test is based on the real-time amplification of a conserved region of the *ureB* gene for the identification of *H. pylori* and 23S rRNA gene for the identification of Clarithromycin resistance and/or Clarithromycin wild-type sequence in the 23S rRNA. After DNA isolation, the presence of *Helicobacter Pylori* and/or Clarithromycin resistance and/or Clarithromycin wild-type sequence in the 23S rRNA is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes test is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an

internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the Point mutations in the 23S rRNA gene of *H. pylori* (A2142G and A2143G), which confer resistance to Clarithromycin DNA target sequence is detected through the FAM channel, *H. pylori* DNA target in ROX channel, Clarithromycin wild-type sequence in the 23S rRNA gene DNA target in HEX, VIC or JOE channel whereas the internal control (IC) in Cy5 channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Attached II).

## Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. 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.

## Procedures

### Specimen collection, processing and DNA extraction

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

Maxwell® RSC Blood DNA Kit, 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 y ZP02012 MagPurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B (stool samples), using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)\*.

NucleoMag® Pathogen (Macherey Nagel).

NucleoSpin RNA Virus (Macherey Nagel).

MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).

NX-48 Stool DNA Kit using the Nextractor® NX-48 system, (Genolution).

\*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.

## **Positive control preparation**

Reconstitute the lyophilized *H. pylori* ClariRes Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (transparent tube) supplied. To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components.

## **Reaction setup**

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative and positive controls and add them into each well.

- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

### Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

| Step                                      | Temperature | Time   | Cycles |
|---|-------------|--------|--------|
| Initial denaturation                      | 95°C        | 2 min  | 1      |
| Denaturation                              | 95°C        | 10 sec | 45     |
| Annealing/Extension<br>(Data collection*) | 63°C        | 50 sec |        |

Set the fluorescence data collection during the extension step (\*) through the FAM (Clarithromycin resistance), ROX (*H. pylori*), HEX, JOE or VIC channels (Clarithromycin wild-type sequence in the 23S rRNA) and Cy5 channel (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none (Attached II).

### Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

#### Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (Clarithromycin resistance), ROX (*H. pylori*), HEX, JOE or VIC channels (Clarithromycin wild-type sequence in the 23S rRNA), which validates the reaction.

#### Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in ROX, HEX and FAM which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The result interpretation is summarized in the following table:

| Clarithromycin resistance (FAM) | <i>H. pylori</i> (ROX) | Clarithromycin wild-type sequence (HEX) | Internal control (Cy5) | Negative Control | Positive Control | Interpretation   |
|---------------------------------|------------------------|---|------------------------|------------------|------------------|--|
| +                               | +                      | +                                       | +/-                    | -                | +                | <i>H. pylori</i> positive, Clarithromycin resistance positive and Clarithromycin wild-type sequences in the 23S rRNA positive <sup>a</sup> |
| +                               | +                      | -                                       | +/-                    | -                | +                | <i>H. pylori</i> positive and Clarithromycin resistance positive; Clarithromycin wild-type sequence in the 23S rRNA negative <sup>b</sup>  |
| -                               | +                      | +                                       | +/-                    | -                | +                | <i>H. pylori</i> positive and Clarithromycin wild-type sequence in the 23S rRNA positive, Clarithromycin resistance negative <sup>c</sup>  |
| +                               | -                      | +                                       | +/-                    | -                | +                | <i>H. pylori</i> negative; Clarithromycin resistance positive and Clarithromycin wild-type sequences in the 23S rRNA positive              |
| -                               | -                      | -                                       | +                      | -                | +                | <i>H. pylori</i> negative, Clarithromycin resistance negative and Clarithromycin wild-type sequences in the 23S rRNA negative              |
| -                               | -                      | +                                       | +/-                    | -                | +                | Clarithromycin wild-type sequence in the 23S rRNA positive   |
| +                               | -                      | -                                       | +/-                    | -                | +                | Clarithromycin resistance positive   |
| -                               | +                      | -                                       | +/-                    | -                | +                | Experiment fail  |

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

<sup>a</sup> Presence of Clarithromycin resistant strains and wild-type simultaneously in the same clinical sample. Similar fluorescent levels in HEX and FAM channels should be seen.

On the contrary, if differences are noted between the fluorescent signal from both channels look at the possibility of interpretation b or c.

<sup>b</sup> Small level of fluorescence can be observed in HEX channels.

<sup>c</sup> Small level of fluorescence can be observed in FAM channels.

If the negative samples not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

## Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

## Performance evaluation

### Clinical sensitivity and specificity

206 human gastric tissue biopsies from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes and RIDA@GENE *Helicobacter pylori* (R-biopharm) for *H. pylori*. *H. pylori* was detected in 99 samples by both kits. In addition to this, by *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Real Time PCR was able to detect 3 more positives samples (The low amount of DNA template of these samples is below the detection limit of the method used).

102 human gastric tissue biopsies from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes and RIDA@GENE *Helicobacter pylori* (R-biopharm) for Clarithromycin resistance. Clarithromycin resistance was detected in 23 samples by both kits. Among these, there are 2 samples that are sensitive strains to Clarithromycin according to Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes and resistant strains to Clarithromycin according to R-biopharm. They are sensitive strains to Clarithromycin according to sequencing, confirming our results.

102 human gastric tissue biopsies from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes and RIDA@GENE *Helicobacter pylori* (R-biopharm) for Clarithromycin wild-type sequences in the 23S rDNA. Clarithromycin wild-type sequences in the 23S rDNA was detected in 77 samples by both kits. Among these, there are 2 samples that are sensitive strains to Clarithromycin according to Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes and resistant strains to Clarithromycin according to R-

biopharm. They are sensitive strains to Clarithromycin according to sequencing, confirming our results.

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes shows a high sensitivity and specificity to detect *H. pylori* and clarithromycin resistance in *H. pylori*.

### **Analytical sensitivity**

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of *H. pylori*, clarithromycin resistance in *H. pylori* and Clarithromycin wild-type sequences in the 23S rDNA templates ranging from  $10^7$  to  $10^1$  copies/rxn. This assay has a detection limit of  $\geq 10$  DNA copies per reaction.

### **Analytical specificity**

The analytical specificity for Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes was tested within the panel of different microorganisms.

No cross-reactivity was seen between any of the species, except *H. heilmanni* whose presence can also cause various chronic gastrointestinal diseases in humans:



| Cross-reactivity assay                            |  |                                       |
|---|--|---------------------------------------|
| <i>Helicobacter felis</i> *                       | <i>Campylobacter upsaliensis</i>                       | <i>Candida albicans</i>               |
| <i>Helicobacter hepaticus</i> *                   | <i>Campylobacter hyointestinalis</i> *                 | <i>Arcobacter butzleri</i>            |
| <i>Helicobacter cinaedi</i> *                     | <i>Proteus vulgaris</i>                                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>         |
| <i>Helicobacter heilmannii</i> *                  | <i>Citrobacter freundii</i>                            | <i>Enterococcus faecalis</i>          |
| <i>Shigella flexneri</i>                          | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>      | <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3*   |
| <i>Shigella dysenteriae</i>                       | <i>Serratia liquefaciens</i>                           | <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9    |
| <i>Salmonella typhi</i>                           | <i>Vibrio parahaemolyticus</i>                         | <i>Bacteroides fragilis</i>           |
| <i>Salmonella paratyphi A</i>                     | <i>Clostridium difficile</i>                           | Adenovirus serotypes 40/41            |
| <i>Salmonella paratyphi B</i>                     | <i>Clostridium difficile</i> 027*                      | Adenovirus serotypes 1-5              |
| <i>Salmonella typhimurium</i>                     | <i>Clostridium perfringens</i>                         | Adenovirus serotype 8/15/31           |
| <i>Salmonella bongori</i>                         | <i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>                | Rotavirus A                           |
| <i>Salmonella enteritidis</i>                     | <i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i>              | Norovirus Genotypes I and II          |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> | <i>Enteroinvasive Escherichia coli</i>                 | Astrovirus Genotype I-VIII            |
| <i>Salmonella pullorum</i>                        | <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>               | Sapovirus                             |
| <i>Salmonella gallinarum</i>                      | <i>Klebsiella oxytoca</i>                              | <i>Entamoeba histolytica</i>          |
| <i>Campylobacter lari</i> *                       | <i>Listeria monocytogenes</i>                          | <i>Entamoeba dispar</i>               |
| <i>Campylobacter fetus</i> *                      | <i>Aeromonas caviae</i>                                | <i>Cryptosporidium parvum/hominis</i> |
| <i>Campylobacter coli</i> *                       | <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i> * | <i>Giardia intestinalis</i> *         |
| <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>  | <i>Blastocystis hominis</i>                            | <i>Dientamoeba fragilis</i>           |

\*These microorganisms showed amplification signal in Clarithromycin wild-type sequences in the 23S rRNA channel.

The specificity of the clarithromycin resistance assay was confirmed by testing a panel consisting of different antimicrobial resistant organism. No cross-reactivity was detected between almost any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay.

| Cross-reactivity assay   |   |
|--|---|
| Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315   | <i>Citrobacter braakii</i> with VIM-1 gene  |
| Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ST398   | <i>Citrobacter freundii</i> -complex isolate with KPC-3 and VIM-4 genes   |
| mecC Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>  | <i>H. pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rRNA A2146G)   |
| cMRSA isolate (oxa <sup>R</sup> , PVL-positive, spa:t 310)   | <i>H. pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rRNA A2147G)   |
| <i>Serratia marcescens</i> isolate with OXA-48 gene  | VanA-type <i>Enterococcus avium</i>   |
| <i>Klebsiella pneumonia</i> isolate with SHV-1 (non-ESBL), KPC-3, and OXA-48 genes                           | VanA- type <i>Enterococcus faecium</i> LMG16165 strain  |
| <i>Klebsiella pneumonia</i> isolate with TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL), and KPC-2 genes | VanA- type <i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1   |
| <i>Escherichia coli</i> with OXA-244 gene  | VanB- type <i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2   |
| <i>Escherichia coli</i> with TEM-1 (non-ESBL) and IMP-1 genes  | VanA-type <i>Enterococcus faecalis</i>  |
| <i>Enterobacter cloacae</i> with SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) and OXA-48 genes                              | VanB-type <i>E. faecalis</i> (Andrewes and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz   |
| <i>Enterobacter cloacae</i> with TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) and NDM-1 genes            | VanC and VanB- types <i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142   |
| <i>Enterobacter cloacae</i> -complex with a NDM-7 gene   | VanC type- <i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge and Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz and Schleifer 1984 VP |

## Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes for *Helicobacter pylori* was evaluated against *Helicobacter pylori* strain J99 and Sydney, showing positive results.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes for Clarithromycin resistance was evaluated against *H. pylori* strains wild-type and harbour point mutations A2142G or A2143G, showing negative and positives results, respectively.

## Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96 <sup>TM</sup> Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)<sup>I</sup>
- SmartCycler® (Cepheid)<sup>I</sup>

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

## Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of *H. pylori*, Clarithromycin resistance and Clarithromycin wild-type sequences in the 23S rRNA infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with human faecal samples and human gastric tissue biopsies. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical specimens 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 may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *H. pylori*, Clarithromycin resistance in *H. pylori* and Clarithromycin wild-type

sequences in the 23S rDNA, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

## Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

| Low profile Block Thermocyclers              | High profile Block Thermocyclers           |
|--|--|
| <b>Agilent Technologies</b>                  | <b>Abbott</b>                              |
| AriaMx Real-Time PCR System                  | Abbott m2000 RealTime System               |
| <b>Applied Biosystems</b>                    | <b>Applied Biosystems</b>                  |
| 7500 Fast Real-Time PCR System               | 7300 Real-Time PCR System                  |
| 7500 Fast Dx Real-Time PCR System            | 7500 Real-Time PCR System                  |
| QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast           | 7900 HT Real-Time PCR System               |
| QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast             | ABI PRISM 7000                             |
| QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast             | ABI PRISM 7700                             |
| QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System          | QuantStudio™ 12K Flex 96-well              |
| QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System          | QuantStudio™ 6 Flex 96-well                |
| StepOne Plus™ Real-Time PCR System           | QuantStudio™ 7 Flex 96-well                |
| StepOne™ Real-Time PCR System                | QuantStudio™ 5 Real-Time PCR               |
| ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System            | QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System        |
| <b>BIONEER</b>                               | ViiA™ 7 Real-Time PCR                      |
| Exicycler™ 96                                | <b>Analytik Jena Biometra</b>              |
| <b>Bio-Rad</b>                               | TOptical                                   |
| CFX96™ Real-Time PCR Detection System        | qTOWER 2.0                                 |
| Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System | <b>BIONEER</b>                             |
| <b>Cepheid</b>                               | Exicycler™ 96                              |
| SmartCycler®                                 | <b>Bio-Rad</b>                             |
| <b>Qiagen</b>                                | CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection   |
| Rotor-Gene® Q                                | iCycler iQ™ Real-Time PCR                  |
| <b>Roche</b>                                 | iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR                |
| LightCycler®480 Real-Time PCR System         | MyiQ™ Real-Time PCR Detection System       |
| LightCycler®96 Real-Time PCR System          | MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System      |
| Cobas z480 Analyzer                          | <b>Cepheid</b>                             |
|  | SmartCycler®                               |
|  | <b>DNA-Technology</b>                      |
|  | DTlite Real-Time PCR System                |
|  | DTprime Real-time Detection Thermal Cycler |
|  | <b>Eppendorf</b>                           |
|  | Mastercycler™ ep <i>realplex</i>           |
|  | <b>Qiagen</b>                              |
|  | Rotor-Gene® Q                              |
|  | <b>Stratagene / Agilent Technologies</b>   |
|  | Mx3000P™ Real Time PCR System              |
|  | Mx3005P™ Real Time PCR System              |

\* See Attached III to configure exposure settings.

## Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

| REAL-TIME PCR THERMOCYCLER           | Vitassay CHANNEL | DETECTION CHANNEL | OBSERVATIONS  |
|--------------------------------------|------------------|-------------------|---|
| <b>Bio-Rad CFX96™</b>                | FAM              | FAM               |   |
|                                      | HEX              | HEX               |   |
|                                      | ROX              | ROX               |   |
|                                      | Cy5              | Cy5               |   |
| <b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>   | FAM              | FAM               | Passive reference option ROX is none  |
|                                      | HEX              | VIC               |   |
|                                      | ROX              | ROX               |   |
|                                      | Cy5              | Cy5               |   |
| <b>Roche Lightcycler®480II</b>       | FAM              | 465/510           | Colour Compensation required  |
|                                      | HEX              | 533/580           |   |
|                                      | ROX              | 533/610           |   |
|                                      | Cy5              | 618/660           |   |
| <b>Smartcycler® Cepheid</b>          | FAM              | Channel 1         |   |
|                                      | HEX              | Channel 2         |   |
|                                      | ROX              | Channel 3         |   |
|                                      | Cy5              | Channel 4         |   |
| <b>Abbott m2000rt</b>                | FAM              | FAM               |   |
|                                      | HEX              | VIC               |   |
|                                      | ROX              | ROX               |   |
|                                      | Cy5              | Cy5               |   |
| <b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b> | FAM              | FAM               | Passive reference option ROX is none  |
|                                      | HEX              | VIC               |   |
|                                      | ROX              | ROX               |   |
|                                      | Cy5              | Cy5               |   |
| <b>AriaMx Agilent</b>                | FAM              | FAM               |   |
|                                      | HEX              | HEX               |   |
|                                      | ROX              | ROX               |   |
|                                      | Cy5              | Cy5               |   |
| <b>Rotor-Gene®Q Qiagen</b>           | FAM              | Green             | In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition". |
|                                      | HEX              | Yellow            |   |
|                                      | ROX              | Orange            |   |
|                                      | Cy5              | Red               |   |
| <b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>         | FAM              | FAM               |   |
|                                      | HEX              | HEX               |   |
|                                      | ROX              | ROX               |   |
|                                      | Cy5              | Cy5               |   |

### Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

| Thermocycler   | Vitassay channel | Exposure values |
|--|------------------|-----------------|
| <b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>                | FAM              | 500             |
|  | HEX              | 500             |
|  | ROX              | 500             |
|  | Cy5              | 500             |
| <b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b> | FAM              | 500             |
|  | HEX              | 1000            |
|  | ROX              | 1000            |
|  | Cy5              | 1000            |

## Bibliography/Bibliografía

1. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P, Puz S, Kovách Z, Rotter M, Makrithathis A. J Clin Microbiol, 2004; 42(10): 4512-4518.
2. Urease activity and urea gene sequencing of coccoid forms of *H. pylori* induced by different factors. Can F, Karahan C, Dolapci I, Demirbilek M, Tekeli A, Arslan H. Curr Microbiol 2008; 56(2): 150-155.
3. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. World J Gastroenterol 2014; 20(36): 12847-12859.
4. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test. Uotani T, Graham DY. Ann Transl Med 2015; 3(1): 9.
5. *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance detected by Etest and TaqMan real-time polymerase chain reaction: a comparative study. Monno R, Giorgio F, Carmine P, Soleo L, Cinquepalmi V, Ierardi E. APMIS 2012; 120(9):712-7.
6. *Helicobacter pylori* treatment: antibiotics or probiotics. Goderska K, Agudo Pena S, Alarcon T. Appl Microbiol Biotechnol. 2017; Oct 26. doi: 10.1007/s00253-017-8535-7.



## Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.










Mx3000P™ and Mx3029™ 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.

## Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

|   |   |   |   |
|---|---|---|---|
|   | Producto para diagnóstico <i>in vitro</i><br>For in vitro diagnostic use only |   | Almacenar en lugar seco<br>Keep dry                   |
|  | Consultar las instrucciones de uso<br>Consult instructions for use            |  | Limitación de temperatura<br>Temperature limitation   |
|  | Fecha de caducidad<br>Use by  |  | Fabricante<br>Manufacturer                            |
|  | Número de lote<br>Lot number  |  | Contiene <n> test<br>Contains sufficient for <n> test |
| DIL   | Diluyente de muestra<br>Buffer (sample diluent)                               |  | Número de referencia<br>Catalogue number              |







Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa  
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

[www.vitassay.com](http://www.vitassay.com)