

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/ 7042S034	<i>H. pylori</i> ClariRes strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C034	<i>H. pylori</i> ClariRes Positive 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 de congelación y descongelación, se recomienda separar en alícuotas.
- Conservar los reactivos en la 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 µL, 20-200 µL)
- 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 un fragmento de una región diana conservada de los genes *ureB* para *H. pylori* y 23S rRNA para su resistencia a Claritromicina respectivamente. 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 resistencia a Claritromicina se detecta mediante un

aumento de la fluorescencia observada 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 (resistencia a Claritromicina) y ROX (*H. pylori*) mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (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.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en los laboratorios.
- 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).

Preparación del control positivo

Reconstituir el *H. pylori* ClariRes Positive Control (tubo rojo) liofilizado en 100 µL de PCR grade water suministrado (tubo blanco). Mezclar bien con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar varios 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.

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) en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) 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 (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, Applied Biosystems StepOne™ 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) y *H. pylori* (ROX).

Control negativo El control negativo incluido en cada serie, debe mostrar la ausencia de señal de ROX 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:

<i>H. pylori</i> (ROX)	Resistencia a Claritromicina (FAM)	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> y resistencia de <i>H. pylori</i> a Claritromicina Positivos
-	-	+	-	+	<i>H. pylori</i> y resistencia de <i>H. pylori</i> a Claritromicina Negativos
+	-	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> Positivo, resistencia de <i>H. pylori</i> a Claritromicina Negativo
-	+	+/-	-	+	No detección de <i>H. pylori</i>
+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	Inválido

+ Positivo: Señal de amplificación

- Negativo: No hay señal de amplificación

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 73 muestras fecales y biopsias (tejido gástrico) humanas fueron analizadas mediante Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes, RIDA@GENE *Helicobacter pylori* (r-Biopharm) para *Helicobacter pylori*. De entre todas ellas, dos muestras no pudieron ser identificadas mediante este test, sin embargo los resultados positivos obtenidos de las biopsias (tejido gástrico) de los mismos pacientes corroboraron nuestros resultados.

Un total de 73 muestras fecales y biopsias (tejido gástrico) humanas fueron analizadas mediante Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes, RIDA®GENE *Helicobacter pylori* (r-Biopharm) para *Helicobacter pylori* resistente a Claritromicina. De entre todas ellas, nueve muestras no pudieron ser identificadas mediante este test, debido a que la baja cantidad de DNA molde detectado está por debajo del límite de detección del método utilizado.

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* y su resistencia a Claritromicina (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de *H. pylori* y su resistencia a Claritromicina 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.

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

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, StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler, DTlite Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)
- SmartCycler® (Cepheid)

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.

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* y su resistencia a la Claritromicina. 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* 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.

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 en la siguiente lista, póngase en contacto con su proveedor:

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

* 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
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	

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
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	150
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	100
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	150
	HEX	3000
	ROX	2000
	Cy5	1500

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

Code	Reagent/Material	Colour	Quantity
7041S034/ 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, we recommend to separate in aliquots.
- Keep all reagents of in the dark.

Additional equipment and material required

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- 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 bacteria 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 peptidyltransferase 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. After DNA isolation, the presence of *Helicobacter Pylori* and/or point mutations in the 23S rRNA gene of *H. pylori*, which confer resistance to Clarithromycin 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 Clarithromycin resistance DNA target sequence is detected through the FAM channel and *H. pylori* DNA target in ROX channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

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.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the laboratories.
- 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).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized H. pylori ClariRes Positive Control (red tube) in the 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) into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative and positive controls into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly(optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programm 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 (Data collection*)	63°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (Clarithromycin resistance), ROX (*H. pylori*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none (Attached 2).

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) and ROX (*H. pylori*), which validates the reaction.

Negative control

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

The experiment seems to be fail 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:

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

(+) **Positive:** Amplification signal

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

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

A total of 73 human faecal samples and gastric tissue bipsies from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes and RIDA@GENE *Helicobacter pylori* (R-biopharm) for *Helicobacter pylori* . Two of them cannot be identficated by our test, but DNA extracted from gastric tissue bipsies from the same patients were amplified with both Real Time PCR kits at the same time, confirming our results.

A total of 73 human faecal samples and gastric tissue bipsies from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR *H. pylori* ClariRes and RIDA@GENE *Helicobacter pylori* (R-biopharm) for *Helicobacter pylori* Clarithromycin resistance. Nine of them cannot be detected by this test because the low amount of template DNA in this sample is below the detection limit of the method used.

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* and clarithromycin resistance in *H. pylori* templates ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for *H. pylori* and clarithromycin resistance in *H. pylori* 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:

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

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, StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler, DTlite Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)

- Rotor-Gene® Q (Qiagen)
- SmartCycler® (Cepheid)

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.

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

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of *H. pylori* and clarithromycin resistance in *H. pylori* 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 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 the different parasites, 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 in the list below, please contact with your supplier.

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

* 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
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Passive reference option ROX is none
	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 ROX is 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	

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
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	150
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	100
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	150
	HEX	3000
	ROX	2000
	Cy5	1500

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

