

REAL TIME PCR DETECTION KIT

Clostridium difficile toxA

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE <i>Clostridium difficile toxA</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CTA106L
VIASURE <i>Clostridium difficile toxA</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CTA106H
VIASURE <i>Clostridium difficile toxA</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CTA112L
VIASURE <i>Clostridium difficile toxA</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CTA112H
VIASURE <i>Clostridium difficile toxA</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CTA113L
VIASURE <i>Clostridium difficile toxA</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CTA113H

VIASURE



ENGLISH

1. Intended of use

VIASURE *Clostridium difficile* *toxA* Real Time PCR Detection Kit is designed for specific identification of *Clostridium difficile* Toxin A in human stool samples from patients with signs and symptoms of gastrointestinal infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of *Clostridium difficile* infection in humans in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from stool specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe for Toxin A.

2. Summary and Explanation

Clostridium difficile is a gram-positive, sporogenic, anaerobic bacillus that belongs to the *Clostridiaceae* family. Initially, *C. difficile* was described as a member of the commensal microbiota of neonates. However, later it was identified as a causal agent of antibiotic-associated diarrhea (AAD) and its infection is associated with high morbidity and mortality in the elderly.

The major risk factors for *C. difficile* infection are broad spectrum antibiotics exposure, hospitalization, and advanced age. The severity of its infection ranges from mild diarrhea and pseudomembranous colitis to toxic megacolon, perforations of the colon and occasionally, sepsis and even death. The main routes of transmission are the fecal-oral or aerosols. In fact, infected persons with acute diarrhea can lead to heavy contamination of the environment with spores, which can persist in dust or on surfaces for months and be transmitted to other hospitalized patients or to healthcare workers once again.

Toxigenic strains of *C. difficile* can colonize the gut, replicate and produce enterotoxin A and cytotoxin B, encoded by *tcdA* and *tcdB* genes which are included in a 19,6 kb pathogenicity locus. Toxins A and B share significant sequence homology and have similar domains, except the carboxyl terminal that differs significantly between the two toxins and it is the receptor binding portion.

The Real-Time PCR based diagnosis has been described as a sensitive test for identification of *Clostridium difficile* toxin A.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Clostridium difficile* *toxA* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of gastroenteritis caused by *Clostridium difficile* Toxin A in human stool samples. After DNA isolation, the identification of Toxin A of *Clostridium difficile* is performed by the amplification of a conserved region with the *tcdA* gene using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE *Clostridium difficile* *toxA* Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent

signal which is proportional to the quantity of the hydrolyzed target sequence. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Clostridium difficile* *toxA* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for Real Time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity. Toxin B DNA targets are amplified and detected in FAM channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used).

4. Reagents provided

VIASURE *Clostridium difficile* *toxA* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-CTA1SL/ VS-CTA1SH	<i>Clostridium difficile</i> <i>toxA</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 X 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-CTA1C	<i>C. difficile</i> <i>toxA</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Water RNAse/DNAse free	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Clostridium difficile* *toxA* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CTA106L, VS-CTA106H, VS-CTA112L and VS-CTA112H.

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-CTA1PL/ VS-CTA1PH	<i>Clostridium difficile</i> <i>toxA</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-CTA1C	<i>C. difficile</i> <i>toxA</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Water RNAse/DNAse free	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8- cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Clostridium difficile* *toxA* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CTA113L and VS-CTA113H.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes materials that are required for using, but not included in the VIASURE *Clostridium difficile toxA* Real Time PCR Detection Kit.

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

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped at 2-50°C for a maximum of 2 weeks.
- For long term storage the kit should be stored at 2-8°C.
- Once the Positive Control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Design a unidirectional process flow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials that have been exposed to the samples and must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

8. Test procedure

8.1. SAMPLE PREPARATION

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

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

We recommend to dilute stool samples before extraction. Collect a pea-size stool (approx. 8mm) and put in a 1.5 mL microcentrifuge tube containing 200 µL of physiological serum or PBS. Vortex intensely and centrifuge 10,000 rpm for 1min. Use 200 µL of supernatant to perform DNA extraction.

8.1.1. DNA EXTRACTION

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

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN).
- QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).
- UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit (Mobio).

8.2. LYOPHILIZED POSITIVE CONTROL

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

Once the Positive Control has been re-suspended, store it at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

8.3. PCR PROTOCOL

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

1) Reconstitute the number of wells you need.

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

2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *C. difficile toxA* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells close the wells with the caps provided. Centrifuge briefly.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

3) Set up your thermocycler.

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

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturalization	10 seg	95°C
	Annealing/Data collection*	50 seg	60°C

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the annealing step (*) through the FAM (Toxin A) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none.

9. Result interpretation

The use of Positive and negative controls in each run, validates the reaction by checking the absence of signal in negative control well and the presence of signal for *C. difficile toxA* Positive Control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software itself of the used Real Time PCR equipment according to manufacturer's instructions for use.

Using the following table, read and analyze the results:

Toxin A	Internal control	Negative control	Positive Control	Interpretation
+	+/-	-	+	Toxin A Positive
-	+	-	+	Toxin A Negative
+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

+: Amplification curve

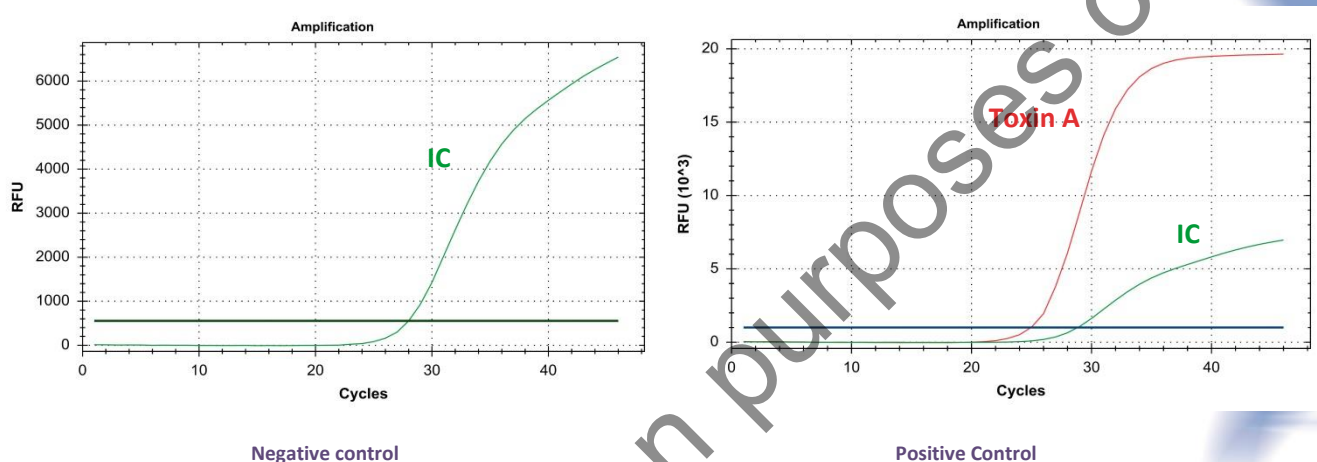
-: No amplification curve

A sample is considered Positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows an amplification signal.

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

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

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



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

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

10. Limitations of the test

- The result of the test should be evaluated by a health care professional and evaluated in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with human faecal samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from faecal 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 Toxin A, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit contains a Positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

Evaluation with faecal samples from symptomatic patients was tested using VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit. These results were compared with those obtained by two commercial Real Time PCR Kits (RIDA®GENE *Clostridium difficile* (r-Biopharm) and RealStar® *Clostridium difficile* PCR kit (Altona)).

The results were as follows:

VIASURE <i>Clostridium difficile</i> <i>tox</i> A Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE <i>Clostridium difficile</i> (r-Biopharm) + RealStar® <i>Clostridium difficile</i> PCR kit (Altona)			
		+	-	Total
	+	48	5	53
	-	0	93	93
	Total	48	98	146

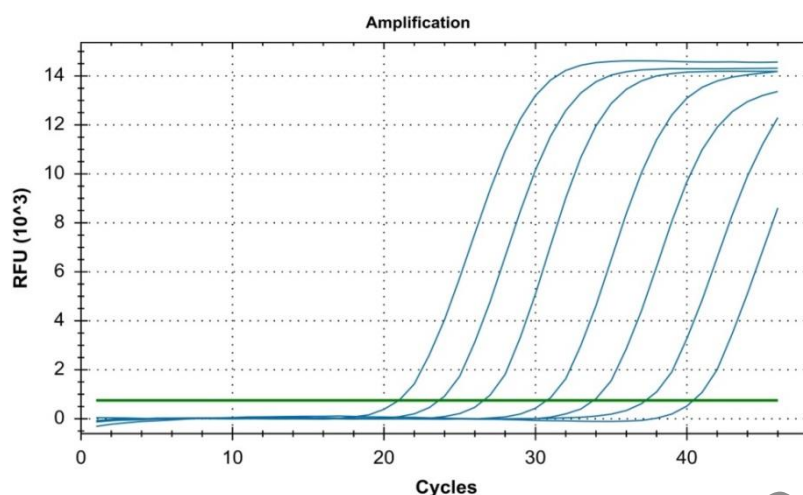
Table 5. Comparative results

The results show a high sensitivity and specificity to detect *Clostridium difficile* Toxin A using VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit.

12.2. ANALYTICAL SENSITIVITY

VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction (Figure 2).

Figure 2. Dilution series of *Clostridium difficile* Toxin A (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System.



12.3. ANALYTICAL SPECIFICITY

The specificity of the *Clostridium difficile* Toxin A assay was confirmed by testing a panel consisting of 44 microorganisms representing the most common enteric pathogens or flora present in the intestine.

VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit not identify the following strains confirming the exclusivity of the trial.

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

Table 6. Reference pathogenic and non-pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. ANALYTICAL REACTIVITY

The reactivity of VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit was evaluated against *Clostridium difficile* CECT 531 and *Clostridium difficile* (NAP1) showing Positive results.

ANNEX 1:

COMPATIBILITY OF THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

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

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ ep realplex
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0

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

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación específica de Toxina A de *Clostridium difficile* en muestras de heces humanas procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección gastrointestinal. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *Clostridium difficile* en seres humanos en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las muestras fecales, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar Toxina A.

2. Introducción y explicación

Clostridium difficile es un bacilo, gram-positivo, esporogénico y anaerobio que pertenece a la familia *Clostridiaceae*. Inicialmente, *C. difficile* fue descrito como parte de la microbiota comensal de los neonatos. Sin embargo, más tarde se identificó como un agente causal de diarrea asociada a antibióticos (DAA) y su infección está asociada con una alta morbilidad y mortalidad en edades avanzadas.

Los principales factores de riesgo para infecciones para el desarrollo de infecciones por *C. difficile* son la exposición a antibióticos de amplio espectro, la hospitalización y una edad avanzada. La gravedad de esta infección va desde una diarrea leve y colitis pseudomembranosa hasta megacolon tóxico, perforaciones del colon y ocasionalmente, sepsis e incluso la muerte. Las principales rutas de transmisión son la vía feco-oral o los aerosoles. De hecho, personas infectadas que presentan una diarrea aguda pueden dar lugar a una gran contaminación del ambiente mediante esporas, las cuales pueden persistir en polvo o en superficies durante meses y transmitirse nuevamente a otros pacientes hospitalizados o al personal sanitario.

Cepas toxigénicas de *C. difficile* pueden colonizar el intestino, replicarse y producir la enterotoxina A y citotoxina B, codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB*, los cuales están incluidos en el locus de patogenicidad de 19.6 kb. Las secuencias de las toxinas A y B presentan una alta homología y tienen dominios similares, excepto el carboxi-terminal, el cual es notablemente diferente y codifica el dominio de unión al receptor.

El diagnóstico basado en la PCR a tiempo real ha sido descrito como un test sensible para la identificación de la Toxina A de *Clostridium difficile*.

3. Procedimiento

VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de gastroenteritis causada por Toxina A de *Clostridium difficile* en muestras de heces humanas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *Clostridium difficile* se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda fluorescente marcada que hibridan con una región diana conservada del gen *tcdA*.

VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit utiliza la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA

complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de la secuencia diana hidrolizada. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Tras la amplificación de las secuencias diana de DNA de *Clostridium difficile* y del control interno, Toxina A se detecta en el canal FAM y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1 y Tabla 2:

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-CTA1SL/ VS-CTA1SH	<i>Clostridium difficile</i> <i>tox</i> A 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-CTA1C	<i>C. difficile tox</i> A Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CTA106L, VS-CTA106H, VS-CTA112L, VS-CTA112H.

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-CTA1PL/ VS-CTA1PH	<i>Clostridium difficile</i> <i>tox</i> A 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-CTA1C	<i>C. difficile tox</i> A Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CTA113L y VS-CTA113H.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Clostridium difficile* toxA Real Time PCR Detection Kit.

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

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte puede realizarse de 2-50°C durante 2 semanas máximo.
- Almacenar el kit en nevera entre 2-8°C.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- Diseñar un flujo de proceso unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

8. Procedimiento del test

8.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

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

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

Se recomienda diluir la muestra de heces antes de la extracción. Para ello, se debe tomar una muestra de heces del tamaño de un guisante (aprox. 8mm) y colocarla en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL que contiene 200 µL de suero fisiológico o PBS. Posteriormente, vortear intensamente y centrifugar a 10,000 rpm durante 1min. Finalmente, utilizar 200 µL del sobrenadante para realizar la extracción de DNA.

8.1.1. EXTRACCIÓN DE DNA

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

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN).
- QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit (Mobio).

8.2. CONTROL POSITIVO LIOFILIZADO

C. difficile *tox*A Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *C. difficile* *tox*A Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. PROTOCOLO PCR

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

1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

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

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *C. difficile* *tox*A Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador.

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

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Recogida de datos*	50 seg	60°C

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (*Clostridium difficile*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada.

9. Interpretación de resultados

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

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

Toxina A	Control interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	Toxina A Positivo
-	+	-	+	Toxina A Negativo
+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	Inválido

Tabla 4. Interpretación

+: curva de amplificación

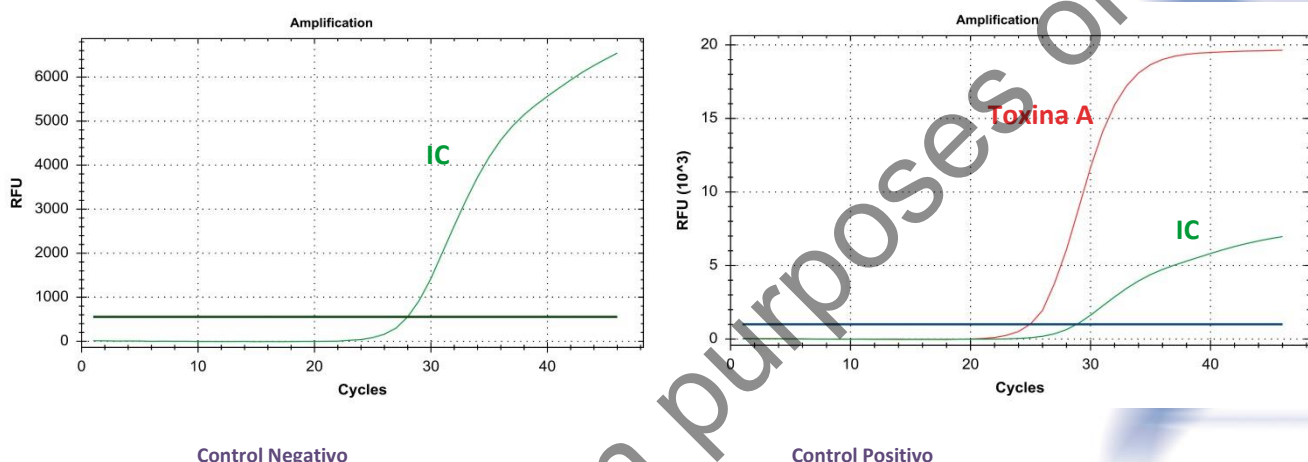
-: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra una gráfica de amplificación.

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

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

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



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

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

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con muestras fecales humanas.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras fecales 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 *Clostridium difficile*, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

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

12. Características del test

12.1. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLINICA

La evaluación con muestras fecales de pacientes sintomáticos fue probada utilizando VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por dos kits comerciales de PCR a tiempo real (RIDA®GENE *Clostridium difficile* (r-Biopharm) y RealStar® *Clostridium difficile* PCR kit (Altona)). Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE <i>Clostridium difficile</i> <i>tox</i> A Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE <i>Clostridium difficile</i> (r-Biopharm) + RealStar® <i>Clostridium difficile</i> PCR kit (Altona)			
		+	-	Total
	+	48	5	53
	-	0	93	93
	Total	48	98	146

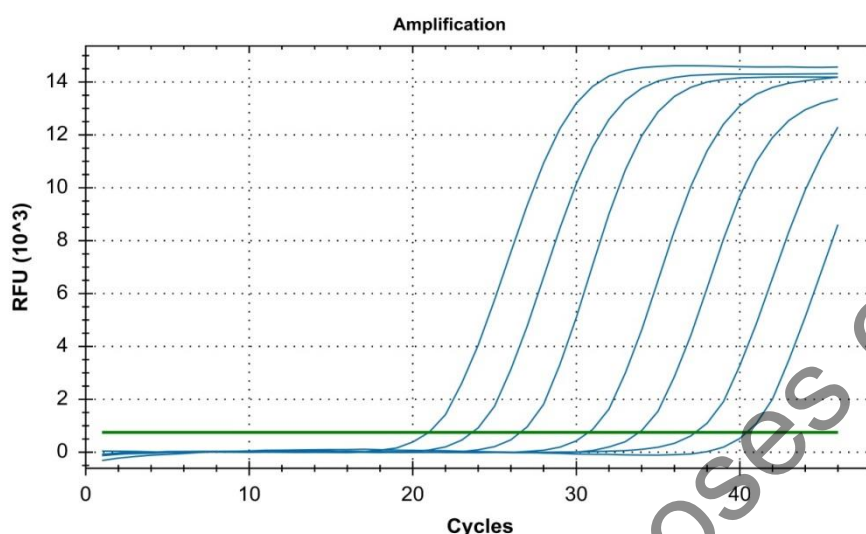
Tabla 5. Comparativa de resultados

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar Toxina A de *Clostridium difficile* utilizando VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit.

12.2. SENSIBILIDAD ANALITICA

VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción (Figura 2).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar de *Clostridium difficile* Toxin A (10^7 - 10^2 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System.



12.3. ESPECIFICIDAD ANALITICA

La especificidad del ensayo de Toxina A de *Clostridium difficile* fue confirmada probando un panel compuesto por 44 microorganismos que representan los patógenos entéricos más comunes o que pueden estar presentes en la flora intestinal.

VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit no identifica las siguientes cepas, por lo que no se generan falsos positivos, confirmándose así la exclusividad del ensayo.

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

Tabla 6. Microorganismos patógenos y no patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. REACTIVIDAD ANALITICA

La reactividad de VIASURE *Clostridium difficile* toxA Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a *Clostridium difficile* CECT 531 y *Clostridium difficile* (NAP1) mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. S. D. Bélanger et al. Rapid detection of *Clostridium difficile* in feces by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(2): 730-734.
2. J. G. Bartlett et al. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46: S12-S18.
3. R. Mutters et al. Quantitative detection of *Clostridium difficile* in hospital environmental samples by Real-Time polymerase chain reaction. *Journal of Hospital Infection* 2009; 71: 43-48.
4. R. A. Luna et al. Rapid stool based diagnosis of *Clostridium difficile* infection by Real-Time PCR in a children's hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49(3): 851-857.
5. E. de Jong et al. Clinical and laboratory evaluation of a real-time PCR for *Clostridium difficile* toxin A and B genes. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012; 31: 2219-2225.

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

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

ANEXO 1:

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

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

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ ep realplex
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0

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

VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System and AriaMx Real-Time PCR System. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

VIASURE *Clostridium difficile* *tox*A Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System y AriaMx Real-Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

For information purposes only

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



CERTEST BIOTEC S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

www.certest.es

