

Vitassay qPCR

Clostridium difficile toxins A+B

PCR en tiempo real para la detección y diferenciación cualitativa de las toxinas A y B de *Clostridium difficile* en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection and identification of toxins A and B of *Clostridium difficile* in human samples



Uso previsto

Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B, permite la detección y diferenciación específica de toxina A y B de *Clostridium difficile* mediante PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por *Clostridium difficile*.

Referencias

Vitassay qPCR <i>Clostridium difficile</i> toxins A+B 4x8 -well strip, low profile	7041042
Vitassay qPCR <i>Clostridium difficile</i> toxins A+B 4x8-well strip, high profile	7042042

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S042/ 7042S042	<i>Clostridium difficile</i> toxins A+B strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C042	<i>Clostridium difficile</i> toxins A+B Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 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 alícuotas.
- 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 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro

- Guantes desechables sin polvo

Resumen

La bacteria *Clostridium difficile*, perteneciente a la familia de las *Clostridiaceae*, y más concretamente al género de las *Clostridium*, es uno de los principales riesgos para pacientes bajo tratamiento con antibióticos. Ya que la bacteria se aprovecha principalmente del debilitamiento de la flora intestinal para colonizar o crecer exponencialmente en el intestino.

Las infecciones nosocomiales son el principal causante de la colitis pseudomembranosa, enfermedad provocada por la acción de las toxinas producidas por la bacteria. Y cuyos síntomas varían desde diarrea acuosa o sanguinolenta hasta leucocitosis, pasando por fiebre o dolor abdominal.

Adicionalmente, esta bacteria es transmitida por la vía fecal-oral. Para evitar la necesidad de tener contacto directo con las heces, la bacteria es capaz de formar esporas resistentes que conforman su reservorio en superficies comunes. 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 y diferenciación de las toxinas A y B de *Clostridium difficile*.

Principio del test

Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B se basa en la amplificación a tiempo real de una región diana conservada del gen *tcdA* y *tcdB* codificado por el genoma de *Clostridium difficile* toxina A y toxina B respectivamente. Tras la extracción de DNA, la presencia de *Clostridium difficile* toxina A y toxina B se detecta mediante el incremento de fluorescencia durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B, 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 (Toxina B) y Cy5 (Toxina A) 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.
- 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).

QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN).

QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit (Mobio)

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Clostridium difficile toxins A+B 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*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (Toxina B) y Cy5 (Toxina A) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). 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 Toxina B (FAM) y Toxina A (Cy5).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM y Cy5.

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:

Toxina A (Cy5)	Toxina B (FAM)	Control Interno	Control negativo	Control positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	Toxina A y Toxina B Positivos
-	-	+	-	+	Toxina A y Toxina B Negativos
+	-	+/-	-	+	Toxina A Positivo Toxina B negativo
-	+	+/-	-	+	Toxina B Positivo Toxina A Negativo
+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas para todas las bacterias 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 115 muestras fecales provenientes de pacientes sintomáticos fueron evaluadas mediante PCR a tiempo real utilizando dos test de diagnóstico molecular: Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B y RealStar C. *difficile* PCR Kit (Altona).

Toxina A fue detectado en 81 muestras positivas mediante el test Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B, mientras que el test RealStar C. *difficile* PCR Kit detectó 62 muestras positivas. Estas muestras discrepantes contenían reducida cantidad de DNA, por debajo del límite de detección del método empleado.

Toxina B fue detectado en 82 muestras positivas mediante el test Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B, mientras que el test RealStar C. *difficile* PCR Kit detectó 79 muestras positivas. Estas muestras discrepantes contenían reducida cantidad de DNA, por debajo del límite de detección del método empleado.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar y diferencias Toxina A y toxina B de *Clostridium difficile* utilizando el kit de diagnóstico molecular Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de las diferentes bacterias (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 *Clostridium difficile* toxins A+B fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos.

No se observaron reacciones cruzadas de Toxina A y toxina B de *Clostridium difficile* entre ninguna de las especies:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada		
<i>Helicobacter pylori</i> J99	<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Arcobacter butzleri</i>
<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Helicobacter heilmannii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Clostridium difficile</i> ribotipo 009	Adenovirus serotipos 40/41
<i>Salmonella paratyphi B</i>	<i>Clostridium difficile</i> ribotipo 010	Adenovirus serotipos 1-5
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Clostridium difficile</i> ribotipo 039	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>
<i>Campylobacter upsaliensis</i>		

Reactividad analítica

Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B Real Time PCR para toxina A ha sido evaluado frente a *Clostridium difficile* CECT 531 y *Clostridium difficile* ribotipos 001, 002, 005, 014, 027, 057, 106 y 078/126, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B Real Time PCR para toxina B ha sido evaluado frente a *Clostridium difficile* CECT 531 y *Clostridium difficile* ribotypes 001, 002, 005, 014, 017, 027, 057, 106, y 078/126, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Clostridium difficile toxins A+B, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ 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)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

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 Clostridium difficile toxins A+B. 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 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 las diferentes bacterias, 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
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System
7500 Real-Time PCR System
7900 HT Real-Time PCR System
ABI PRISM 7000
ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™5 Real-Time PCR
MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
Eppendorf
Mastercycler™ep <i>realplex</i>
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Stratagene / Agilent Technologies
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
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	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	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	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
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Intended use

Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B allow the detection and differentiation of *Clostridium difficile* Toxin A and B by real-time PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of *Clostridium difficile* infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B 4x8 -well strip, low profile 7041042

Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B 4x8-well strip, high profile 7042042

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S042/ 7042S042	<i>Clostridium difficile</i> toxins A+B strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C042	<i>Clostridium difficile</i> toxins A+B Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 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
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µl, 20-200 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Clostridium difficile, which belongs to *Clostridiaceae* and more concretely to the *Clostridium* genus, is a threat for patients undergoing antibiotic treatment, as it exploits the weakening of the bacterial flora located in the gut, either by colonizing it or overgrowing in it.

Nosocomial infections are widely regarded as the main way of contracting pseudomembranous colitis, which is the disease generated by the action of *Clostridium difficile*'s toxins. The most common symptom is bloody or watery diarrhea; rarer ones vary from fever, to abdominal pain, changes in bowel habit or leukocytosis.

Additionally, the main way of transmission for this bacterium is the fecal-oral route. This bacterium is able to form resistant spores that constitute a reservoir on common surfaces, thus being able to be ingested avoiding the necessity of being in direct contact with feces. 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.

A Real-Time PCR based diagnosis has been described as a sensitive test for identification and differentiation of toxins A and B of *Clostridium difficile*.

Principle of the test

Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B test is based on the real-time amplification of a conserved fragments of the *tcdA* and *tcdB* genes encoded by the *Clostridium difficile* toxins A and toxins B respectively. After DNA isolation, the presence of *Clostridium difficile* toxins A+B is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B 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 Toxin B DNA target sequence is detected through the FAM channel, the amplification of the Toxin A DNA target sequence is detected through the Cy5 channel and whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE 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, utilizando Maxwell® 16 instrument (Promega).

QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN).

QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit (Mobio).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Clostridium difficile toxins A+B Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). 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 and samples.

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 (Data collection*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (Toxin B), Cy5 (Toxin A) 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 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 (Toxin B) and Cy5 (Toxin A) which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM and Cy5 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:

Toxin A (Cy5)	Toxin B (FAM)	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	Toxin A and Toxin B viruses Positive
-	-	+	-	+	Toxin A and Toxin B viruses Negative
+	-	+/-	-	+	Toxin A Positive Toxin B negative
-	+	+/-	-	+	Toxin B Positive Toxin A Negative
+	+	+	+	+	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 115 faecal samples from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using two molecular diagnostic tests: Vitassay qPCR Clostridium difficile toxins A+B and RealStar C. difficile PCR Kit (Altona).

Toxin A was detected in 81 positive samples using the Vitassay qPCR Clostridium difficile toxins A+B test, while the RealStar C. difficile PCR Kit test detected 62 positive samples. These discrepant samples contained reduced amount of DNA, below the detection limit of the method used.

Toxin B was detected in 82 positive samples using the Vitassay qPCR Clostridium difficile toxins A+B test, while the RealStar C. difficile PCR Kit test detected 79 positive samples. These discrepant samples contained reduced amount of DNA, below the detection limit of the method used.

The results show a high sensitivity and specificity to detect and differences Clostridium difficile toxin A and toxin B using the molecular diagnostic kit Vitassay qPCR Clostridium difficile toxins A+B.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of Clostridium difficile toxins A+B 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 Clostridium difficile toxins A+B was tested within the panel of different microorganisms. No cross-reactivity of Clostridium difficile toxins A+B was seen between any of the species:

Cross-reactivity assay		
<i>Helicobacter pylori</i> J99	<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Arcobacter butzleri</i>
<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Helicobacter heilmannii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Salmonella paratyphi</i> A	<i>Clostridium difficile</i> ribotype 009	Adenovirus serotypes 40/41
<i>Salmonella paratyphi</i> B	<i>Clostridium difficile</i> ribotype 010	Adenovirus serotypes 1-5
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Clostridium difficile</i> ribotype 039	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>
<i>Campylobacter upsaliensis</i>		

Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B for Toxin A was evaluated against *Clostridium difficile* CECT 531 and *Clostridium difficile* ribotypes 001, 002, 005, 014, 027, 057, 106 and 078/126, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR *Clostridium difficile* toxins A+B for Toxin B was evaluated against *Clostridium difficile* CECT 531 and *Clostridium difficile* ribotypes 001, 002, 005, 014, 017, 027, 057, 106, and 078/126, showing positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Clostridium difficile toxins A+B has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ 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)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

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 Clostridium difficile toxins A+B 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. 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 bacteria, 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
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
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
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	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	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers
	Eppendorf
	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	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
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	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option 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	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	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	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
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Bibliography/Bibliografía

1. David M. Lyerly, et al. *Clostridium difficile*: Its Disease and Toxins. Clinical Microbiology Reviews, 1988; 1-18.
2. Bryan L. Folkers, et al. Quantitative real time PCR detection of *Clostridium difficile* growth inhibition by probiotic organisms. North American Journal of Medical Sciences, 2010; 2(1): 5-10.
3. Simon D. Bélanger, et al. Rapid Detection of *Clostridium difficile* in Feces by Real-Time PCR. Journal of Clinical Microbiology, 2003; 41(2): 730-734.
4. J. G. Bartlett et al. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Clinical Infectious Diseases 2008; 46: S12-S18.
5. R. Mutters et al. Quantitative detection of *Clostridium difficile* in hospital environmental samples by Real-Time polimerase chain reaction. Journal of Hospital Infection 2009; 71: 43-48.
6. 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.
7. 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.

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> 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



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