
EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL NA LYSIS KIT + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020 (CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXINS REAL TIME PCR KIT) Y COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS CON Xpert® *C. difficile* BT (Cepheid)

Clostridioides difficile CDI, un anaerobio grampositivo formador de esporas, es el agente causal de la infección por CDI, una infección gastrointestinal típicamente caracterizada por altos niveles de inflamación y diarrea.

Por lo tanto, el diagnóstico clínico y de laboratorio preciso es esencial para el manejo oportuno del paciente y las medidas efectivas de control de infecciones. La detección de *C. difficile* se realiza normalmente en pacientes sintomáticos mediante la recolección de una muestra de heces acuosas, blandas o semiformadas.

Para este diagnóstico se ha priorizado el diagnóstico molecular.

VIRCELL ha desarrollado un kit de PCR en tiempo real, CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXINS REALTIME PCR KIT (RTPCR020), para la detección e identificación cualitativa de cepas toxigénicas; toxina A, toxina B y toxinas binarias (BT) o cepas no toxigénicas (ausencia de estas toxinas), tanto en muestras de heces de pacientes adultos como pediátricos con sospecha de infección asociada a CDI.

Las muestras de heces suelen contener inhibidores de la PCR y pueden causar resultados falsos negativos de la PCR. La calidad y la cantidad de inhibidores de la PCR varían de una muestra a otra, en función de factores clínicos, dietéticos, de la microbiota intestinal u otros factores relacionados con el entorno y el estilo de vida. Los factores que inhiben la amplificación de ácidos nucleicos por PCR están presentes en el ADN diana de muchas fuentes. Los inhibidores generalmente actúan en uno o más de los tres puntos esenciales de la reacción de las siguientes maneras: interfieren con la lisis celular necesaria para la extracción de ADN, interfieren por degradación o captura de ácido nucleico e inhiben la actividad de la polimerasa para la amplificación del ADN diana. La inhibición puede ser total o parcial y puede manifestarse como un fallo completo de la reacción o como una disminución de la sensibilidad de detección. En algunos casos, la inhibición puede ser la causa de reacciones falsas negativas. RTPCR020 incluye un control interno que ayuda a monitorizar el arrastre de los inhibidores a la PCR.

Los métodos de extracción de ADN son fundamentales para extraer una cantidad y calidad suficientes de material genético de las muestras de heces para el diagnóstico de enfermedades. Existen kits de extracción de ADN específicos para muestras de heces que están disponibles comercialmente, utilizando diferentes métodos de lisis. El método de batido de perlas es un procedimiento mecánico común para mejorar la eficiencia de la extracción de ADN y aumentar la recuperación de ADN, tanto en estudios de organismos específicos como en estudios de microbioma cuando se utilizan muestras de heces.

Durante el desarrollo del kit CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXINS REALTIME PCR KIT, Vircell probó una batería de posibles protocolos de extracción con el fin de determinar la opción que ofrecía un mejor rendimiento, considerando como método de referencia el resultado obtenido con Xpert® *C. difficile* BT (Cepheid).

Estas pruebas llevaron a Vircell a desarrollar y producir NA LYSIS KIT (Ref. NALK001), un reactivo de laboratorio para el pretratamiento de muestras de heces con procesos mecánicos y químicos antes de la extracción.

El reactivo NA LYSIS KIT contiene:

- TUBOS DE LISIS VIRCELL: 48 x 1 ml de tampón de eliminación de inhibidores y una mezcla de perlas de tamaño optimizado para la disrupción de la muestra por lisis mecánica (*).
- HISOPOS DE RECOGIDA DE MUESTRAS: 1 x 48 hisopos.



El uso del reactivo NALK001 es muy sencillo con una mínima manipulación de la muestra.

1. Retire el tapón de uno o varios TUBOS DE LISIS VIRCELL (en función del número de muestras a analizar: un tubo/muestra).

Dependiendo de la consistencia de la muestra:

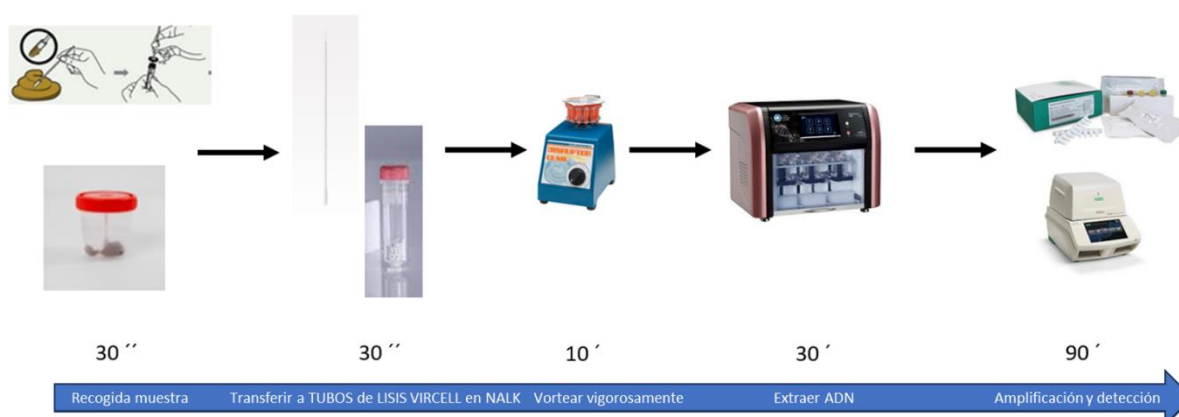
- i. **Muestra semisólida:** utilice uno de los HISOPOS DE RECOGIDA DE MUESTRAS suministrados y transfiera aproximadamente 0,1 g de muestra a los TUBOS DE LISIS VIRCELL.
Asegúrese de que la muestra se ha liberado en los TUBOS DE LISIS VIRCELL. Con el fin de facilitar la liberación de la muestra, el hisopo puede frotarse contra las paredes del tubo o utilizando un vórtex.
 - ii. **Muestra líquida:** homogeneizar la muestra y remojar los HISOPOS DE RECOGIDA DE MUESTRAS en el tubo de muestra, luego transferirlo a los TUBOS DE LISIS VIRCELL. Homogeneizar la mezcla mediante agitación en vórtex.
2. Agitar los TUBOS DE LISIS VIRCELL durante 10 minutos a 3000 rpm para la disrupción de la muestra y lisar las células mecánicamente (*).
 3. Espere 2 minutos para evitar la formación de espuma. Estas muestras deben procesarse en los siguientes 60 minutos. Durante este tiempo las muestras pueden permanecer a temperatura ambiente.
 4. El aislamiento de los ácidos nucleicos se puede realizar mediante un sistema manual o automatizado compatible con los ensayos de PCR en tiempo real siguiendo las instrucciones de uso del fabricante. Se recomienda utilizar un kit de extracción comercial para la extracción de ADN/ARN diseñado o adaptado para muestras de heces. Para utilizar kits de extracción comerciales, siga las instrucciones del fabricante.

(*) Existen algunos sistemas disruptores compatibles que se pueden utilizar con NALK001 tales como:



A. Scientific Industries SI™ Disruptor Genie™ Digital Cell Disruptor de Fisher Scientific
B. MagNA Lyser system (Roche).

Vircell realizó estudios utilizando el CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXINS REALTIME PCR KIT con diferentes kits de extracción para comparar con el reactivo de pretratamiento NA LYSIS KIT + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020.



VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) en la serie M48:

Paso	Pocillo	Temp. (°C)	Tiempo de mezcla (m)	Velocidad de mezcla (RPM)	Recoger (m)	Vapor (m)	Pausa
1	1	70	0	500	0	10	Off
2	5	-	0,1	3000	0,1	0	Off
3	1	Off	2	3000	0,1	0	Off
4	2	-	2,5	3000	0,1	0	Off
5	3	-	1,5	3000	0,1	0	Off
6	4	-	1,5	3000	0,1	0	Off
7	6	56	3	3000	0,1	0	Off
8	3	-	0,1	2500	0	0	Off

m: minutos

Muestra	Extracción de ADN sin NA LYSIS KIT		Extracción de ADN con NA LYSIS KIT
	Alternativa de extracción 1 + RTPCR020	Alternativa de extracción 2 + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020	NA LYSIS KIT + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020
1	35	38	33
2	31	30	25
3	35	35	31
4	28	27	25
5	36	30	24
6	38	33	29
7	24	28	26
8	28	21	22
9	29	29	25
10	27	27	26
11	33	28	25
12	24	27	26
13	36	37	34
14	21	21	21
15	34	31	30
16	22	20	20

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Los datos mostrados son valores de Ct obtenidos para la Toxina B con RTPCR020.

*Alternativa de extracción 1: Kit de extracción de ADN en heces (basado en perlas magnéticas) (TANBead).
Alternativa de extracción 2: INHIBITEX solution (Qiagen) + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado).*

La combinación **NA LYSIS KIT + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020** mostró los mejores resultados en comparación con las alternativas de extracción 1 y 2. En el 87,5 % de los casos se observó el valor más bajo de Ct obtenido para la detección de CDI con este método, lo que podría indicar que en los casos en los que la carga bacteriana de *Clostridium difficile* fuera limitada o se arrastraran inhibidores, la solución NA LYSIS KIT + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020 podría detectar potencialmente la presencia de ADN, mientras que otros sistemas (alternativa de extracción 1 y 2) podrían pasar por alto esas muestras.

Además, se compararon los resultados obtenidos con NA LYSIS KIT + Optipure VIRAL 665 kit (TANBead) + RTPCR020 con un conjunto de muestras positivas y negativas analizadas previamente con Xpert® C. *difficile* BT, de Cepheid, como método de referencia.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	NA LYSIS KIT + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020	Método de referencia (kit Xpert® C. <i>difficile</i> BT)
1	CDI+ABTox (Ct 28)	Tox B (Ct 25,3)
2	CDI+ABTox (Ct 23)	Tox B (Ct 19,7)
3	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 22,1)
4	CDI+ABTox (Ct 21)	Tox B (Ct 29,5)

Muestra	NA LYSIS KIT + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020	Método de referencia (kit Xpert® <i>C. difficile</i> BT)
5	CDI+ABTox (Ct 30)	Tox B (Ct 29,5)
6	CDI+ABTox (Ct 28)	Tox B (Ct 26,5)
7	CDI+ABTox+BT (Ct 24)	Tox B (Ct 24,5), BT (Ct 23,5)
8	CDI+ABTox (Ct 31)	Tox B (Ct 30,5)
9	CDI (Ct 32)	Tox B (Ct N/A), BT (Ct N/A)
10	CDI+ABTox (Ct 23)	Tox B (Ct 19,5)
11	CDI+ABTox (Ct 26)	Tox B (Ct 23,1)
12	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 26,3)
13	CDI+ABTox (Ct 31)	Tox B (Ct 30,3)
14	CDI+ABTox (Ct 26)	Tox B (Ct 21)
15	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 23,9)
16	CDI+ABTox (Ct 30)	Tox B (Ct 26,9)
17	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 25,6)
18	CDI+ABTox (Ct 24)	Tox B (Ct 23,3)
19	CDI+ABTox (Ct 31)	Tox B (Ct 31,1), BT (Ct 30,2)
20	CDI+ABTox (Ct 30)	Tox B (Ct 30,1)
21	CDI+ABTox (Ct 30)	Tox B (Ct 25,8)
22	CDI+ABTox (Ct 23)	Tox B (Ct 20,6)
23	CDI+ABTox (Ct 31)	Tox B (Ct 31,5)
24	CDI+ABTox (Ct 27)	Tox B (Ct 27,8)
25	CDI+ABTox (Ct 31)	Tox B (Ct 30,2)
26	CDI+ABTox (Ct 26)	Tox B (Ct 30)
27	CDI+ABTox+BT (Ct 23)	Tox B (Ct 27,6), BT (Ct 26,8)
28	CDI+ABTox (Ct 27)	Tox B (Ct 24,3)
29	CDI+ABTox (Ct 21)	Tox B (Ct 18,9)
30	CDI+ABTox (Ct 24)	Tox B (Ct 26,7)
31	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 21,2)
32	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 21,9)
33	CDI+ABTox (Ct 27)	Tox B (Ct 26)
34	CDI+ABTox+BT (Ct 23)	Tox B (Ct 23,1), BT (Ct 22,6)
35	CDI+ABTox (Ct 29)	Tox B (Ct 31,1)
36	CDI+ABTox (Ct 23)	Tox B (Ct 23,3)
37	CDI+ABTox (Ct 34)	Tox B (Ct 33,8)
38	CDI+ABTox (Ct 30)	Tox B (Ct 28,2)
39	CDI+ABTox (Ct 28)	Tox B (Ct 28,8)
40	CDI+ABTox (Ct 32)	Tox B (Ct 29)
41	CDI+ABTox (Ct 24)	Tox B (Ct 22,5)
42	CDI+ABTox (Ct 28)	Tox B (Ct 27,8)
43	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 28,1)
44	CDI+ABTox+BT (Ct 28)	Tox B (Ct 27,4), BT (Ct 28,2)
45	CDI+ABTox (Ct 26)	Tox B (Ct 27,3)
46	CDI+ABTox+BT (Ct 31)	Tox B (Ct 30,4), BT (Ct 29,7)
47	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 25,7)
48	CDI+ABTox+BT (Ct 23)	Tox B (Ct 20,8), BT (Ct 20,2)
49	CDI+ABTox (Ct 21)	Tox B (Ct 22,3)

Muestra	NA LYSIS KIT + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020	Método de referencia (kit Xpert® <i>C. difficile</i> BT)
50	CDI+ABTox+BT (Ct 24)	Tox B (Ct 23,1), BT (Ct 22,6)
51	CDI+ABTox (Ct 28)	Tox B (Ct 28,2)
52	CDI+ABTox (Ct 29)	Tox B (Ct 28,8)
53	CDI+ABTox+BT (Ct 27)	Tox B (Ct 27,4), BT (Ct 28,2)
54	CDI+ABTox (Ct 26)	Tox B (Ct 28,1)
55	CDI+ABTox+BT (Ct 27)	Tox B (Ct 26,3), BT (Ct 25,9)
56	CDI+ABTox+BT (Ct 30)	Tox B (Ct 30,4), BT (Ct 29,7)
57	CDI+ABTox (Ct 27)	Tox B (Ct 27,5)
58	CDI+ABTox (Ct 30)	Tox B (Ct 29,2)
59	CDI+ABTox (Ct 27)	Tox B (Ct 24,2)
60	CDI+ABTox (Ct 30)	Tox B (Ct 27,1)
61	CDI+ABTox (Ct 27)	Tox B (Ct 28)
62	CDI+ABTox+BT (Ct 27)	Tox B (Ct 24,9), BT (Ct 24,2)
63	CDI+ABTox (Ct 28)	Tox B (Ct 25,8)
64	CDI+ABTox (Ct 30)	Tox B (Ct 27,1)
65	CDI+ABTox (Ct 27)	Tox B (Ct 24,2)
66	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 23,5)
67	CDI+ABTox (Ct 29)	Tox B (Ct 26,1)
68	CDI+ABTox (Ct 29)	Tox B (Ct 27,2)
69	CDI+ABTox (Ct 26)	Tox B (Ct 23,7)
70	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 24,4)
71	CDI+ABTox (Ct 23)	Tox B (Ct 20,9)
72	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 23,1)
73	CDI+ABTox (Ct 21)	Tox B (Ct 22,8)
74	CDI+ABTox (Ct 28)	Tox B (Ct 25,2)
75	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 24,6)
76	CDI+ABTox (Ct 27)	Tox B (Ct 27,1)
77	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 24,3)
78	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 24,3)
79	CDI+ABTox (Ct 24)	Tox B (Ct 22,5)
80	CDI+ABTox (Ct 31)	Tox B (Ct 29)
81	CDI+ABTox+BT (Ct 23)	Tox B (Ct 20,8), BT (Ct 20,2)
82	CDI+ABTox (Ct 23)	Tox B (Ct 22,3)
83	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 25,2)
84	CDI+ABTox+BT (Ct 30)	Tox B (Ct 28,2), BT (Ct 27,6)
85	CDI+ABTox+BT (Ct 26)	Tox B (Ct 24,5), BT (Ct 24,1)
86	CDI+ABTox (Ct 22)	Tox B (Ct 21,2)
87	CDI+ABTox (Ct 21)	Tox B (Ct 19,5)
88	CDI+ABTox (Ct 26)	Tox B (Ct 26)
89	CDI+ABTox (Ct 24)	Tox B (Ct 21,5)
90	CDI+ABTox (Ct 20)	Tox B (Ct 20,5)
91	CDI+ABTox (Ct 22)	Tox B (Ct 19,6)
92	CDI+ABTox+BT (Ct 22)	Tox B (Ct 20,7), BT (Ct 20,1)
93	CDI+ABTox (Ct 23)	Tox B (Ct 22,3)
94	CDI+ABTox (Ct 26)	Tox B (Ct 24,7)

Muestra	NA LYSIS KIT + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020	Método de referencia (kit Xpert® <i>C. difficile</i> BT)
95	CDI+ABTox (Ct 22)	Tox B (Ct 27,3)
96	CDI+ABTox (Ct 31)	Tox B (Ct 25,6)
97	CDI+ABTox (Ct 30)	Tox B (Ct 21,6)
98	CDI+ABTox (Ct 32)	Tox B (Ct 33,2)
99	CDI+ABTox (Ct 23)	Tox B (Ct 21,3)
100	CDI+ABTox (Ct 25)	Tox B (Ct 20,9)
101	Negativo	Tox B (Ct 26)
102	CDI+ABTox (Ct 33)	Tox B (Ct 27)
103	CDI+ABTox (Ct 32)	Tox B (Ct 24,7)
104	Negativo	Tox B (Ct 28,3)
105	CDI (Ct 33)	Tox B (Ct 28,2)
106	CDI+ABTox (Ct 28)	Tox B (Ct 20,6)
107	CDI+ABTox (Ct 34)	Tox B (Ct 30,7)
108	CDI+ABTox (Ct 23)	Tox B (Ct 18,8)
109	CDI+ABTox (Ct 27)	Tox B (Ct 21,8)
110	CDI+ABTox (Ct 35)	Tox B (Ct 29,6)
111	CDI+ABTox (Ct 30)	Tox B (Ct 25,4)
112	CDI+ABTox (Ct 34)	Tox B (Ct 28,1)
113	CDI+ABTox (Ct 33)	Tox B (Ct 32,7)
114	CDI+ABTox (Ct 35)	Tox B (Ct 32,7)
115	CDI+ABTox (Ct 36)	Tox B (Ct 27,2)
116	Negativo	Tox B (Ct 32,8)
117	CDI+ABTox (Ct 28)	Tox B (Ct 23)
118	CDI+ABTox (Ct 28)	Tox B (Ct 23,1)
119	CDI+ABTox (Ct 31)	Tox B (Ct 27,3)
120	CDI+ABTox (Ct 31)	Tox B (Ct 27,6)
121	CDI+ABTox (Ct 32)	Tox B (Ct 29,6)
122	CDI (Ct 33)	Tox B (Ct N/A), BT (Ct N/A)
123	CDI (Ct 26)	Tox B (Ct N/A), BT (Ct N/A)
124	CDI (Ct 39)	Tox B (Ct N/A), BT (Ct N/A)

La concordancia entre ambos métodos fue del 95,83% en la detección de muestras positivas para *Clostridium difficile* productora de toxinas A/B o toxina binaria (BT), así como de ambas toxinas.

NA LYSIS KIT + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020 pudo detectar 115 de 120 muestras positivas.

En cuanto a las muestras positivas que solo detectaron la toxina A/B, la concordancia entre ambos métodos fue del 96,15%.

NA LYSIS KIT + TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020 pudo detectar 100 de las 104 muestras positivas para *Clostridium difficile* produciendo toxinas A/B.

En cuanto a las muestras positivas que detectaron Toxina A/B + BT, la concordancia entre ambos métodos fue del 93,75%.

NA LYSIS KIT + TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020 pudo detectar 15 de las 16 muestras positivas para *la toxina binaria productora* de *Clostridium difficile* (BT).

Xpert® *C. difficile* BT kit reportó 4 muestras negativas que fueron positivas para *cepas no toxigénicas de Clostridium difficile* por NA LYSIS KIT + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020, previamente confirmadas por una prueba de GDH.

En la siguiente tabla se muestra un resumen de estos resultados:

	NA LYSIS KIT + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020	Método de referencia (kit Xpert® <i>C. difficile</i> BT)	CONCORDANCIA
Muestras positivas	115	120	95,83%
Muestras positivas para toxina A/B	100	104	96,15%
Muestras positivas para Toxina A/B + BT	15	16	93,75%

Conclusiones:

Los datos presentados en esta nota técnica muestran que la combinación **NA LYSIS KIT + VIRAL 665 TANBead (protocolo modificado) + RTPCR020** es una herramienta adecuada para ayudar a los laboratorios en la detección de *Clostridium difficile* toxigénico y podría considerarse una alternativa al kit Xpert® *C. difficile* BT.

Bibliografía:

1. Srirungruang, S.; Mahajindawong, B.; Nimitpanya, P.; Bunkasem, U.; Ayuyoe, P.; Nuchprayoon, S.; Sanprasert, V. Estudio comparativo de los métodos de extracción de ADN para la detección por PCR de parásitos intestinales en muestras de heces humanas. *Diagnóstico* 2022, 12, 2588. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12112588>.
2. Wilson, I.G. Inhibición y facilitación de la amplificación de ácidos nucleicos. *Appl. Medio Ambiente. Microbiol.* 1997, 63, 3741-3751.
3. Carroll KC, Mizusawa M. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de *Clostridium difficile*. *Cirugía rectal de colon clín* 2020 Mar; 33(2):73-81. DOI: 10.1055/S-0039-3400476. Epub 25 de febrero de 2020. PMID: 32104159; PMCID: PMC7042017.