

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

E. coli Typing

Handbook for the following references/

Manual para las siguientes referencias:

VIASURE <i>E. coli</i> Typing Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-ECT106L
VIASURE <i>E. coli</i> Typing Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-ECT106H
VIASURE <i>E. coli</i> Typing Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-ECT112L
VIASURE <i>E. coli</i> Typing Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-ECT112H
VIASURE <i>E. coli</i> Typing Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-ECT136



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)/*Shigella* in human stool samples from patients with signs and symptoms of gastrointestinal infection. This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of EHEC, STEC, EPEC, ETEC and EIEC/*Shigella* 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 EHEC, STEC, EPEC, ETEC and EIEC/*Shigella*.

2. Summary and Explanation

Escherichia coli is (*E. coli*) a gram-negative microorganism that can be an innocuous resident of the gastrointestinal tract, but it also has the pathogenic capacity to cause enteric disease, and extraintestinal diseases, as urinary tract infections (UTIs) and sepsis/meningitis. Pathogenic variants of *E. coli* (pathovars or pathotypes) cause much morbidity and mortality worldwide, due to they have low infectious doses and are transmitted through ubiquitous mediums, including food and water. Of the strains that cause diarrhoeal diseases, six pathotypes are now recognized: Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enteraggregative *E. coli* (EAggEC), and Diffusely adherent *E. coli* (DAEC). Furthermore, different *E. coli* strains may belong to more than one pathotype group owing to the expression of different virulence factors.

Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) is a subset of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), also called verotoxin-producing *E. coli*. STEC are a diverse group of food-borne pathogens which cause a wide spectrum of human diseases, ranging from mild diarrhoea to severe human diseases, including hemorrhagic colitis (HC) and a life-threatening complication hemolytic uremic syndrome (HUS). Their virulence is related in part to their capacity to produce Stx1 and/or Stx2, potent cytotoxins that inhibit host cell protein synthesis. In addition, typical EHEC are often characterised by the production of an outer membrane protein called intimin, which is encoded by the *eae* gene. This protein mediates both tight attachment of bacteria to enterocytes, as well as lesions (both attaching and effacing (A/E lesions)) in the colon. STEC and EHEC strains can be transmitted to humans through person-to-person contact; consumption of raw or undercooked meat, raw milk and other dairy products; ingestion of other food or drinking water contaminated with animal faeces; direct contact with domestic cattle and other ruminants recognised as a major reservoir, and contaminated bathing/ recreational water. The more clinically relevant STEC strains belong to the serotype O157:H7, followed by O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28.

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) also contains *eae* as EHEC, but without shiga-like toxin. EPEC adhere to small bowel enterocytes, and destroy the normal microvillar architecture, inducing the characteristic attaching and effacing lesion. EPEC is an important cause of potentially fatal infant diarrhoea in developing countries that is



often accompanied by fever, vomiting, and dehydration in children under 2 years of age. It is transmitted via the faecal-oral route through contaminated surfaces, weaning fluids, and human carriers.

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) colonizes the surface of the small bowel mucosa and induces watery diarrhoea by the secretion of heat-labile (LT) and/or heat-stable (ST) enterotoxins. These enterotoxins cause inhibition of sodium absorption and stimulation of chloride secretion, which leads to watery diarrhoea. Abdominal cramps, sometimes with nausea and headache, occur and fever is usually absent. ETEC is a major cause of traveller's diarrhoea worldwide and endemic in most underdeveloped countries with significant mortality rates in children. ETEC infections are also transmitted through the faecal-oral route, when a person ingests food or water contaminated.

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) are biochemically, genetically and pathogenically closely related to *Shigella* spp. Both bacteria express the invasion plasmid antigen H (*ipaH*) gene which is related to their ability to induce their entry into epithelial cells and disseminate from cell to cell. There are four *Shigella* species responsible for human disease (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei* and *S. boydii*), which cause varying degrees of dysentery. This infection is characterized by fever, abdominal cramps and diarrhoea containing blood and mucous. Severe shigellosis complications are often associated with the Shiga toxin-producing serotype *S. dysenteriae* 1 and can range from local intestinal disorders to systemic manifestations. Instead, EIEC might cause an invasive inflammatory colitis, and occasionally dysentery, but in most cases EIEC elicits watery diarrhoea that is indistinguishable from that due to infection by other *E. coli* pathogens. Conventional transmission of EIEC and *Shigella* is mediated via the faecal-oral route mainly through contaminated food or water or direct person-to-person spread.

The adoption of molecular techniques has allowed for more rapid detection and identification of the different *E. coli* pathotypes. Thus, it provides the critical information for determining appropriate therapies for patients with suspected *E.coli* infections and controlling of the outbreak.

3. Principle of the procedure

VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of EHEC, STEC, EPEC, ETEC and EIEC/*Shigella* in human stool samples. After DNA isolation, the identification of EHEC, STEC, EPEC, ETEC and EIEC/*Shigella* is performed by the amplification of a conserved region of the *stx1*, *stx2*, *eae*, *lt*, *st1a*, *st1b* and *ipaH* genes using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bounded 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 target template. This fluorescence can be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *E. coli* Typing 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 an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Each kit includes two kind of strips and each one corresponds to one different assay. The first strip contains the multiplex reaction mix for the detection of *E. coli* pathotypes EHEC, STEC, EPEC and EIEC/*Shigella* (*E. coli* EHEC, EPEC & EIEC 4/8-well strips). *stx1* and *stx2* genes are amplified and detected in



FAM channel, *ipaH* gene is amplified and detected in ROX channel, *eae* gene is amplified and detected in Cy5 channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2). The second strip contains the multiplex reaction mix for the detection of *E. coli* pathotypes ETEC and EIEC/*Shigella* (*E. coli* ETEC + EIEC 4/8-well strips). *It* gene is amplified and detected in FAM channel, *ipaH* gene is amplified and detected in ROX channel, *st1a* and *st1b* genes are amplified and detected in Cy5 channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables 1 and 2. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table 1 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices (See Annex 1). Table 2 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>E. coli</i> EHEC, EPEC & EIEC 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	3/6 x 8-well strip
<i>E. coli</i> ETEC + EIEC 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	3/6 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>E. coli</i> Typing Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
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 *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-ECT106L, VS-ECT106H, VS-ECT112L and VS-ECT112H.



Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>E. coli</i> EHEC, EPEC & EIEC 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	Transparent	9x 4-well strip
<i>E. coli</i> ETEC + EIEC 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers in stabilized format	Transparent	9x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>E. coli</i> Typing Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	18 x 4-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-ECT136. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips (if available).
- Vortexer.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with and Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments).

VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System and VIASURE 96 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).

To check thermocycler compatibility, see Annex 1, to check most common detection channels see Annex 2 and to check optical measurement exposure setting see Annex 3.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.



- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- Do not use past expiration date.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (if available, Ref. VS-ECT136). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different envelopes and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For reference VS-ECT136 (compatible with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- Design a unidirectional workflow. 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 disposable 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 the reagents and materials that have been exposed to the samples and they 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.
- Make sure to use a well for the detection of *E. coli* EHEC, STEC, EPEC and EIEC/*Shigella* and another well for *E. coli* ETEC and EIEC/*Shigella* assay. Be careful not to mix them throughout the process.
- Consult safety data sheets, upon request.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.



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.

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

8.1.1. DNA extraction

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

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).
- Maxwell®RSC Blood DNA Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).

8.2. Lyophilized positive control

E. coli Typing Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *E. coli* Typing Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend 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 for each assay. Peel off protective aluminium 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 extracted from each sample, reconstituted *E. coli* Typing Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene® kits).

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).

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

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

Table 4. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*stx1*, *stx2* and *lt* genes), ROX (*lpaH* gene), Cy5 (*eae* and *st1a*, *st1b* genes) and HEX, JOE or VIC channels (IC). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *E. coli* Typing in the 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 of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.



Interpretation of results for *E. coli* EHEC, EPEC & EIEC 4/8-well strips:

<i>stx1/stx2</i> genes (FAM)	<i>eae</i> gene (Cy5)	<i>ipaH</i> gene (ROX)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	-	+/-	-	+	EHEC Detected
+	-	-	+	-	+	STEC (EHEC) Detected
-	+	-	+/-	-	+	EPEC Detected
-	-	+	+/-	-	+	EIEC/Shigella Detected*
+	-	+	+/-	-	+	<i>Shigella dysenteriae</i> type 1 Detected*
-	-	-	+/-	-	+	Negative
-	-	-	+/-	-	+	Invalid

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification curve

-: No amplification curve

Interpretation of results for *E. coli* ETEC + EIEC 8-well strips 4/8-well strips:

<i>lt</i> gene (FAM)	<i>st1a/st1b</i> genes (Cy5)	<i>ipaH</i> gene (ROX)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	-	+/-	-	+	ETEC detected
+	-	-	+	-	+	ETEC detected
-	+	-	+/-	-	+	ETEC detected
-	-	+	+/-	-	+	EIEC/Shigella detected*
-	-	-	+/-	-	+	Target genes are not detected
-	-	-	+/-	-	+	Invalid

Table 6. Sample interpretation

+: Amplification curve

-: No amplification curve

*If a patient sample presents an amplification curve for *ipaH* gene (*Shigella*) in ROX channel in EEE and/or ESE reaction mixes will be considered positive for *Shigella*/EIEC. In addition to these, if the *Shigella* positive sample (ROX channel, *ipaH* gene) is also FAM positive in EEE reaction mix (*stx1/stx2* genes), *Shigella* will be subtyping as *Shigella dysenteriae* type 1.

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. 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™ Real-Time PCR Detection System. (*E. coli* EHEC, EPEC & EIEC).

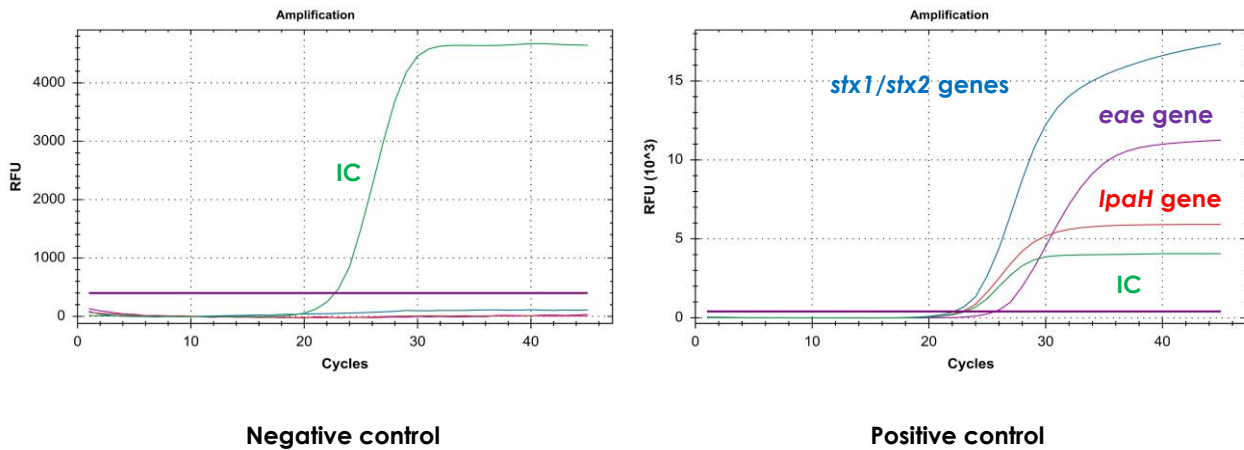
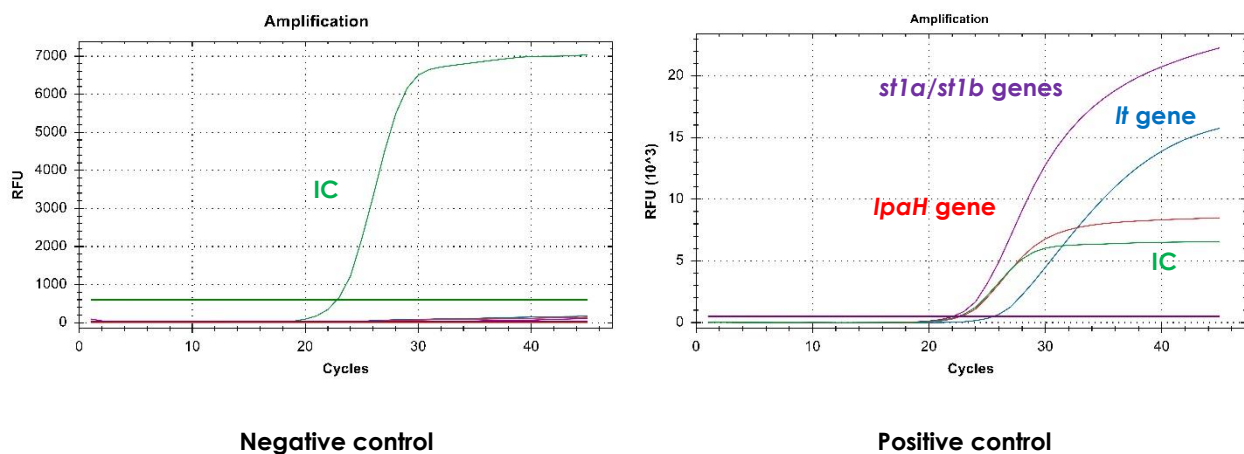


Figure 2. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. (*E. coli* ETEC + EIEC).



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.

In case of a doubtful interpretation result, it is recommended to verify the correct performance of each of the steps and review the parameters and the sigmoid shape of the curve. If the situation is not solved, it is recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.



10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional 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 only with DNA extracted from human faecal samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples 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 might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *E. coli* Typing Positive Control, either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *E. coli* Typing 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

A small cohort of 25 faecal samples from symptomatic patients and with clinical suspicion of *E. coli* infection were tested using VIASURE *E. coli* EHEC, EPEC & EIEC assay. The results were confirmed with that obtained by a commercial Real Time PCR Kit (RIDA®GENE EHEC/EPEC real-time multiplex PCR (R-biopharm)). We found 6 positive samples for STEC, 1 positive sample for *Shigella dysenteriae* serotype 1, 2 specimens for EHEC and 4 samples for EPEC using R-biopharm and VIASURE kits.

A total amount of 87 stool specimens from symptomatic patients with clinical suspicion of *E. coli* infection were tested using VIASURE *E. coli* ETEC + EIEC assay. We found 2 samples for *It* gene, which means 2 positive samples for *E. coli* ETEC. The results of these samples were confirmed with that obtained by a commercial Real Time PCR Kit (RIDA®GENE ETEC/EIEC (R-biopharm)). *Shigella*/EIEC was detected in 5 samples; the results of them were also confirmed by R-biopharm.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction for *stx1/stx2*, *eae*, *ipaH*, *It* and *st1a/st1b* genes (Figure 3, 4, 5, 6, 7 and 8).



Figure 3. Dilution series of *stx1/stx2* genes (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *E. coli* EHEC, EPEC & EIEC, channel FAM).

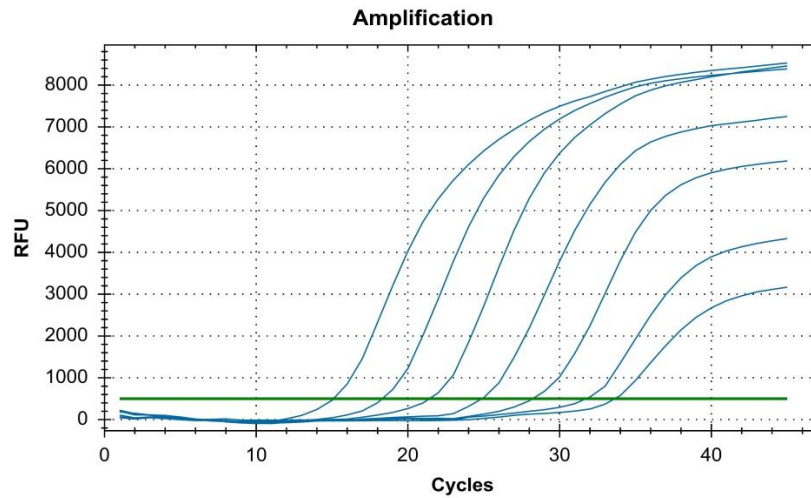


Figure 4. Dilution series of *lpaH* gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *E. coli* EHEC, EPEC & EIEC, channel ROX).

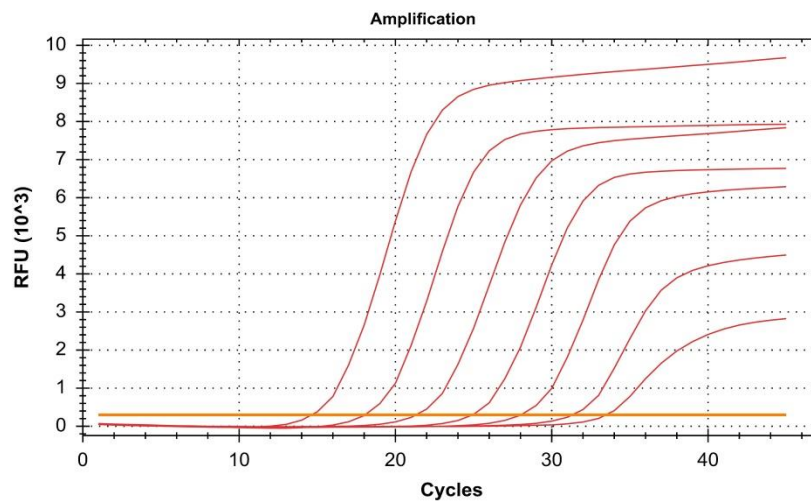


Figure 5. Dilution series of *eae* gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *E. coli* EHEC, EPEC & EIEC, channel Cy5).

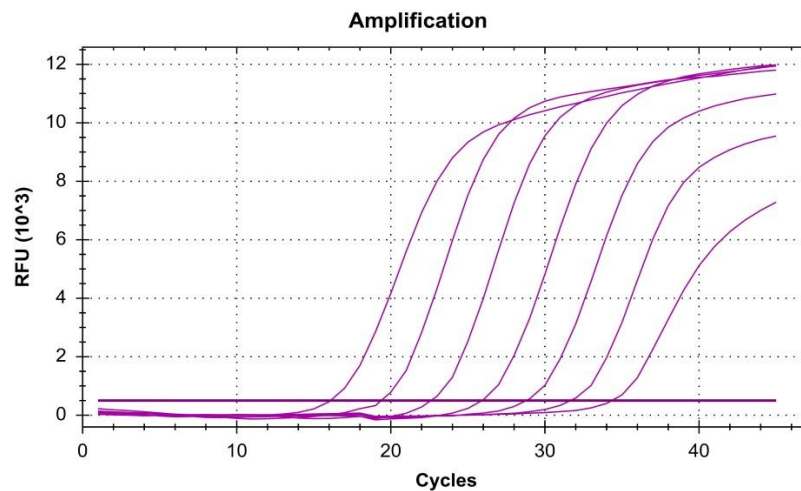


Figure 6. Dilution series of *It* gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *E. coli* ETEC + EIEC, channel FAM).

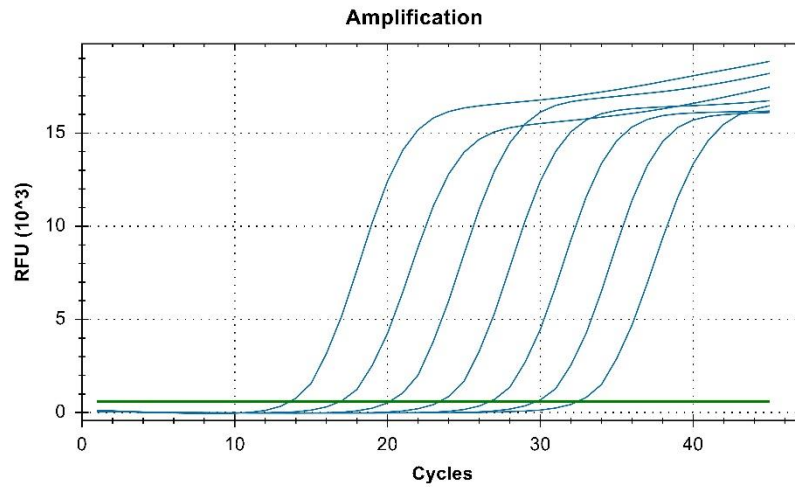


Figure 7. Dilution series of *lpaH* gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *E. coli* ETEC + EIEC, channel ROX).

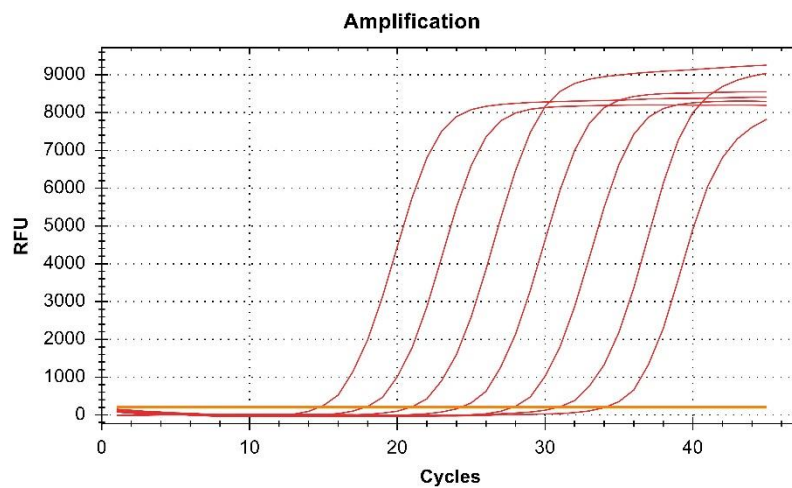
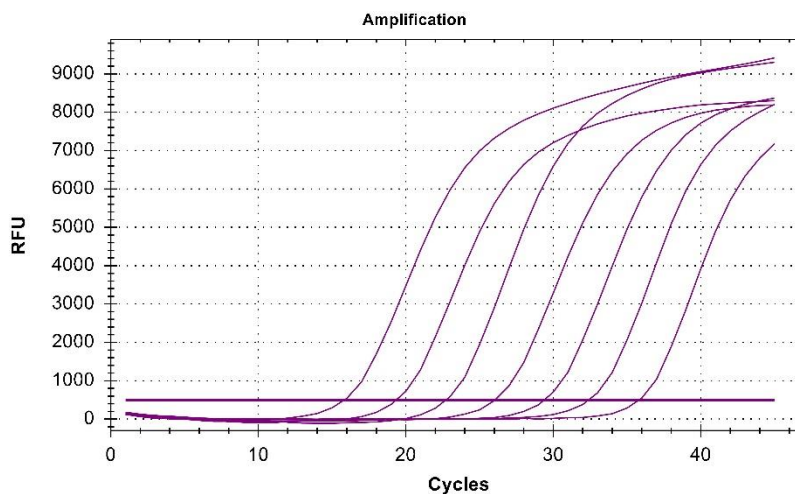


Figure 8. Dilution series of *st1a/st1b* genes (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *E. coli* ETEC + EIEC, channel Cy5).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *E. coli* Typing assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common enteric pathogens or flora present in the intestine. No cross-reactivity was detected between almost any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay.

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

Table 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit was evaluated against *E. coli* strains of each pathotype and *Shigella* species which contain the following virulence factors: *stx1* and/or *stx2* and *eae* genes (EHEC), *stx1* and/or *stx2* genes (STEC) and *eae* gene (EPEC), *lt* and/or *st1a* and/or *st1b* genes (ETEC) and *ipaH* (EIEC, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei* and *S. boydii*), showing positive results.



ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a low profile block, like the systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a high or regular profile block, like the 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
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
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	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD 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 ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Select Ramp Speed "Standard".

(2) See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.

(3) The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into the specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.

(4) Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.

(5) No detection in Cy5 channel.

(6) Detection in FAM and HEX channels only.

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



ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

The fluorescence detection channels for some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, in the Settings menu, select the option Apply Fluorescence Drift Correction for Baseline Settings to correct it.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none. Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, please modify the baseline: Select the Start Cycle and End Cycle values so that the baseline ends before significant fluorescence is detected.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is 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 for ROX must be 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	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the appropriate thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.



ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -500*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

*If the result in channel FAM is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)/*Shigella* 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 EHEC, STEC, EPEC, ETEC y/o EIEC/*Shigella* 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 EHEC, STEC, EPEC, ETEC y/o EIEC/*Shigella*.

2. Introducción y explicación

Escherichia coli (*E. coli*) es un microorganismo gram-negativo que puede ser un residente inocuo del tracto gastrointestinal, pero también tiene la capacidad de causar enfermedades entéricas y extraintestinales, como infecciones del tracto urinario (ITUs), sepsis y meningitis. Las cepas patógenas de *E. coli* (patovares o patotipos) causan una gran morbilidad y mortalidad en todo el mundo, debido a que tienen bajas dosis infecciosas y se transmiten a través de medios ubicuos, como los alimentos y el agua. De las cepas que causan enfermedades diarreicas, se reconocen seis patotipos: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). Además, diferentes cepas de *E. coli* pueden pertenecer a más de un patotipo debido a la expresión de los diferentes factores de virulencia.

E. coli enterohemorrágica (EHEC) es un subconjunto de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), también llamada *E. coli* productora de verotoxina. STEC son un grupo diverso de patógenos transmitidos por los alimentos, que causan un amplio espectro de enfermedades humanas, que van desde una diarrea leve hasta enfermedades humanas graves. Entre estas se incluyen la colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (SUH), considerado como una complicación potencialmente mortal. Su virulencia está relacionada en parte con su capacidad para producir Stx1 y / o Stx2, potentes citotoxinas que inhiben la síntesis de proteínas de la célula huésped. Además, las cepas típicas EHEC a menudo se caracterizan por la producción de intimina, una proteína de la membrana externa codificada por el gen *eae*. Esta proteína media tanto en la adherencia firme de las bacterias a los enterocitos, como en las lesiones A/E (lesiones de adherencia/destrucción) en el colon. Las cepas de STEC y EHEC se pueden transmitir en humanos mediante: contacto directo persona-persona; consumo de carne cruda o poco cocinada, leche cruda y otros productos lácteos; ingesta de otros alimentos o agua potable contaminada con heces de animales; contacto directo con el ganado doméstico y otros rumiantes que son reconocidos como reservorio principal de estas cepas; y aguas de baño/recreativas contaminadas. Las cepas de STEC clínicamente más relevantes pertenecen al serotipo O157:H7, seguido de los serotipos O26:H11, O103:H2, O111:H8 y O145:H28.



E. coli enteropatógena (EPEC) también porta el gen *eae* como las cepas EHEC, pero no las toxinas tipo Shiga. EPEC se adhiere a los enterocitos del intestino delgado y destruye la estructura de las microvellosidades, induciendo lesiones A/E. EPEC es una causa importante de diarrea infantil, potencialmente mortal en los países en desarrollo, y que a menudo se acompaña de fiebre, vómitos y deshidratación en niños menores de 2 años. Se transmite por la vía fecal-oral a través de superficies contaminadas, fórmulas para facilitar el destete y portadores humanos.

E. coli enterotoxigénica (ETEC) coloniza la superficie de la mucosa del intestino delgado e induce diarrea acuosa por la secreción de enterotoxinas lábiles al calor (LT) y/o termoestables (ST). Estas enterotoxinas causan la inhibición de la absorción de sodio y la estimulación de la secreción de cloruro, lo que conduce a la diarrea acuosa. Simultáneamente, se pueden producir calambres abdominales, acompañados a veces con náuseas y dolor de cabeza, pero usualmente no de fiebre. ETEC es la causa más importante de la diarrea del viajero en todo el mundo y es endémica en la mayoría de los países subdesarrollados, con significativas tasas de mortalidad en niños. Las infecciones por ETEC también se transmiten a través de la ruta fecal-oral, cuando una persona ingiere comida o agua contaminada.

Las *E. coli* Enteroinvasivas (EIEC) están bioquímica-, genética- y patológicamente estrechamente relacionados con *Shigella* spp. Ambas bacterias portan el gen del antígeno plasmídico de invasión H (*ipaH*) que está relacionado con la entrada y la diseminación del patógeno de célula a célula. Hay cuatro especies de *Shigella* responsables de la enfermedad en humano (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei* y *S. boydii*), las cuales causan diversos grados de disentería. Esta infección se caracteriza por fiebre, calambres abdominales y diarrea con presencia visible de sangre y moco. Las complicaciones graves de la shigelosis a menudo se asocian con *S. dysenteriae* serotipo 1 productora de toxina Shiga y pueden variar desde trastornos intestinales locales hasta manifestaciones sistémicas. En cambio, EIEC podría causar una colitis inflamatoria invasiva y, ocasionalmente, disentería, pero en la mayoría de los casos EIEC provoca una diarrea acuosa que es indistinguible de la debida a la infección por otras cepas de *E. coli* patógenas. La transmisión convencional de EIEC y *Shigella* está mediada a través de la ruta fecal-oral, principalmente a través de alimentos o agua contaminados o mediante propagación directa persona-persona.

La adopción de técnicas moleculares ha permitido una detección e identificación más rápida de los diferentes patotipos de *E. coli*. Por lo tanto, proporciona una información crítica para determinar cuáles son las terapias más apropiadas para cada paciente con sospecha de infección por *E. coli* y el control de un posible brote.

3. Procedimiento

VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *E. coli* EHEC, *E. coli* EPEC, *E. coli* EIEC/*Shigella* y/o *E. coli* ETEC en muestras de heces humanas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *E. coli* EHEC, *E. coli* EPEC, *E. coli* EIEC/*Shigella* y *E. coli* ETEC se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *lt*, *st1a*, *st1b* e *ipaH* para *E. coli* EHEC, *E. coli* EPEC, *E. coli* EIEC/*Shigella* y *E. coli* ETEC.



VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit aprovecha 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 DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *E. coli* Typing 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.

Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *E. coli* EHEC, EPEC y EIEC/*Shigella* (*E. coli* EHEC, EPEC & EIEC 4/8-well strips). Tras la reacción de amplificación, los genes *stx1* y *stx2* se detectan en el canal FAM, el gen *lpaH* se detecta en el canal ROX, el gen *eae* se detecta en el canal Cy5 y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2). La segunda tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *E. coli* ETEC y EIEC/*Shigella* (*E. coli* ETEC + EIEC 4/8-well strips). Tras la reacción de amplificación, el gen *lt* se detecta en el canal FAM, el gen *lpaH* es detectado en el canal ROX, los genes *st1a* y *st1b* es detectado en el canal Cy5 y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>E. coli</i> EHEC, EPEC & EIEC 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
<i>E. coli</i> ETEC + EIEC 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>E. coli</i> Typing Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
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 *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-ECT106L, VS-ECT106H, VS-ECT112L y VS-ECT112H.



Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>E. coli</i> EHEC, EPEC & EIEC 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Transparente	9 tiras de 4 pocillos
<i>E. coli</i> ETEC + EIEC 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	9 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>E. coli</i> Typing Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	18 tiras de 4 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-ECT136. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

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 *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 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).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.



6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-ECT136). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para referencia VS-ECT136 (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo 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.



- Asegurarse de usar un pocillo para la detección de *E. coli* EHEC, STEC, EPEC and EIEC/*Shigella* y otro para el ensayo de *E. coli* ETEC and EIEC/*Shigella*. Tener precaución para que no se mezclen durante el proceso.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

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.

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

8.1.1. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA a partir de muestras fecales 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.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *E. coli* Typing 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 *E. coli* Typing Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 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 para cada uno de los ensayos 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 Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *E. coli Typing* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) en diferentes pocillos y cerrar los pocillos con los tapones suministrados.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

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/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla 4. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (genes *stx1*, *stx2* y *lt*), Cy5 (genes *eae* y *st1a* y *st1b*), ROX (gen *ipaH*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

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 *E. coli Typing*. 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.



Interpretación de los resultados para *E. coli* EHEC, EPEC & EIEC 4/8-well strips:

Genes <i>stx1/stx2</i> (FAM)	Gen <i>eae</i> (Cy5)	Gen <i>ipaH</i> (ROX)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	-	+/-	-	+	Detección EHEC
+	-	-	+	-	+	Detección STEC (EHEC)
-	+	-	+/-	-	+	Detección EPEC
-	-	+	+/-	-	+	Detección EIEC/Shigella *
+	-	+	+/-	-	+	Detección <i>Shigella dysenteriae</i> Tipo 1*
-	-	-	+/-	-	+	Negativo
-	-	-	+/-	-	+	Inválido

Tabla 3. Interpretación

+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

Interpretación de los resultados para *E. coli* ETEC + EIEC 4/8-well strips:

Gen <i>lt</i> (FAM)	Genes <i>st1a/st1b</i> (Cy5)	Gen <i>ipaH</i> (ROX)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	-	+/-	-	+	Detección ETEC
+	-	-	+	-	+	Detección ETEC
-	+	-	+/-	-	+	Detección ETEC
-	-	+	+/-	-	+	Detección EIEC/Shigella *
-	-	-	+/-	-	+	Genes no detectados
-	-	-	+/-	-	+	Inválido

Tabla 4. Interpretación

+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

* Si una muestra de paciente presenta una curva de amplificación para el gen *ipaH* (*Shigella*) en el canal ROX en las mezclas de reacción ESE y / o ESE se considerarán positivas para *Shigella* / EIEC. Además de esto, si la muestra positiva de *Shigella* (canal ROX, gen *ipaH*) también es positiva en FAM en la mezcla de reacción EEE (genes *stx1* / *stx2*), *Shigella* se subtipará como *Shigella dysenteriae* tipo 1.

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. 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™ Real-Time PCR Detection System (*E. coli* EHEC, EPEC & EIEC).

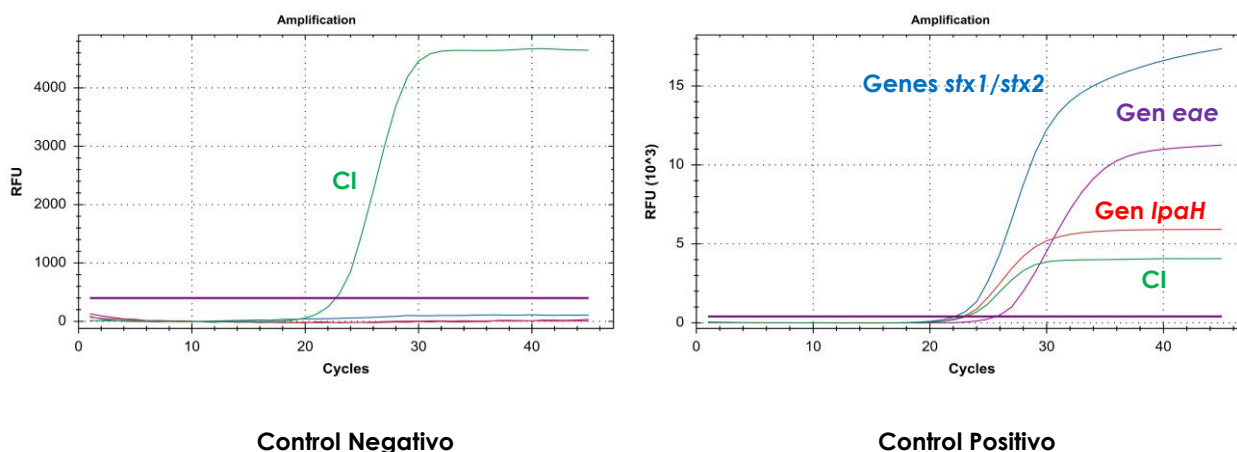
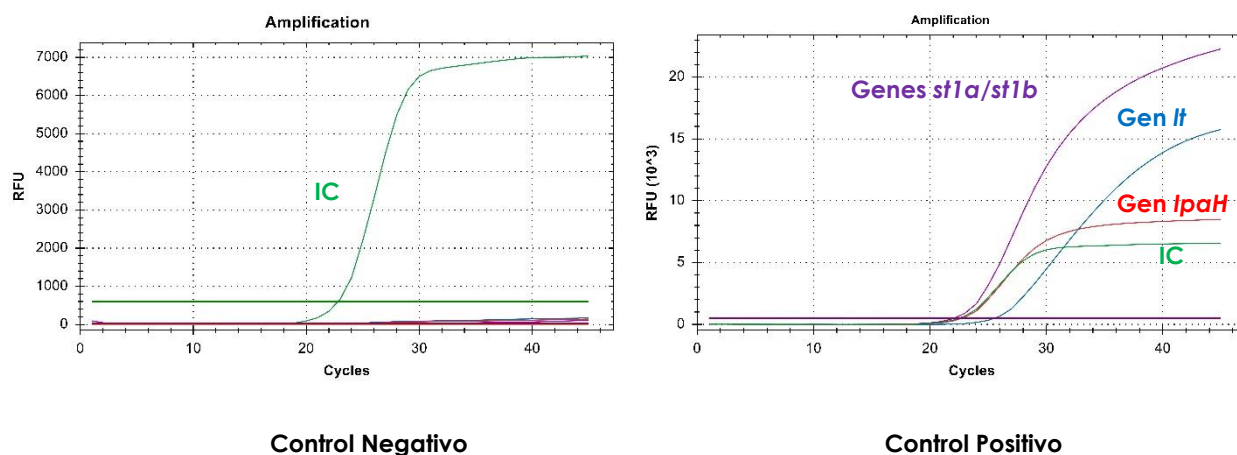


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (*E. coli* ETEC + EIEC).



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.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. 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.



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 DNA extraído de muestras fecales humanas.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. 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 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 *E. coli Typing Positive Control* 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 *E. coli Typing* 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 clínica

Un pequeño cohorte de 25 muestras fecales de pacientes sintomáticos y con sospecha clínica de infección por *E. coli* se analizaron utilizando el ensayo de detección de PCR en tiempo real VIASURE *E. coli* EHEC, EPEC & EIEC. Los resultados se confirmaron con los obtenidos con un kit comercial de PCR en tiempo real (RIDA®GENE EHEC / EPEC PCR multiplex en tiempo real (R-biopharm)). Encontramos 6 muestras positivas para STEC, 1 muestra positiva para *Shigella dysenteriae* Typ 1, 2 muestras para EHEC y 4 muestras para EPEC usando los kits R-biopharm y VIASURE.

Se analizó una cantidad total de 87 muestras de heces de pacientes utilizando el ensayo VIASURE *E. coli* ETEC + EIEC. Encontramos 2 muestras para el gen *lt*, lo que significa 2 muestras positivas para *E. coli* ETEC. Los resultados de estas muestras se confirmaron con los obtenidas por un kit comercial de PCR en tiempo real (RIDA®GENE ETEC / EIEC (R-biopharm)). *Shigella* / EIEC se detectó en 5 muestras; los resultados de ellas también fueron confirmadas por R-biopharm.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *E. coli Typing* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para los genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ipaH*, *lt*, *st1a* y *st1b*. (Figura 3, 4, 5, 6, 7 y 8).



Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar de los genes *stx1/stx2* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción *E. coli* EHEC, EPEC & EIEC, canal FAM).

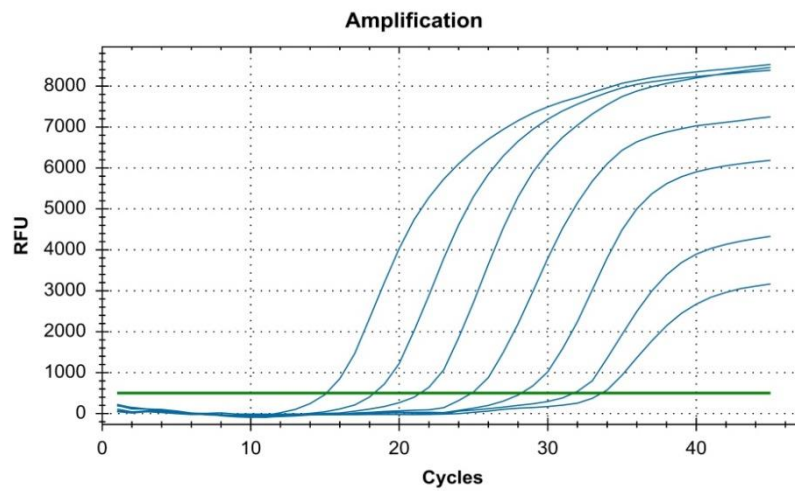


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar del gen *lpaH* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción *E. coli* EHEC, EPEC & EIEC, canal ROX).

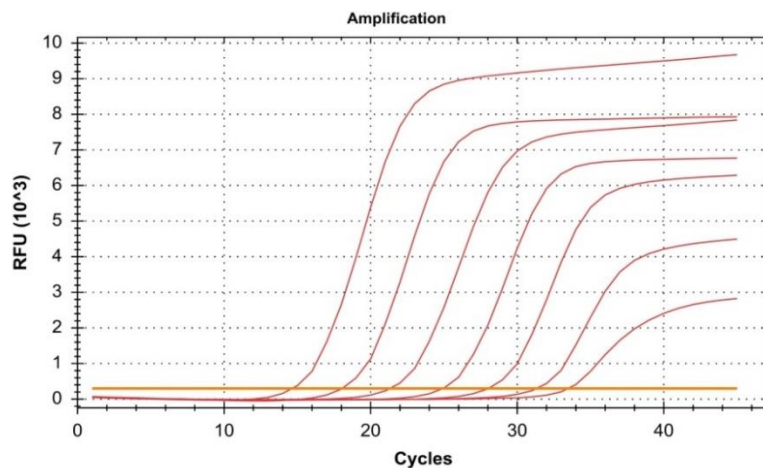


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar del gen *eae* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción *E. coli* EHEC, EPEC & EIEC, canal Cy5).

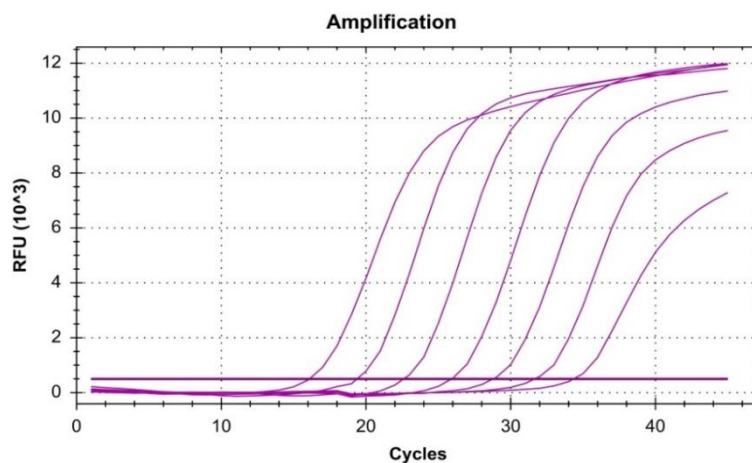


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar gen *ltf* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción *E. coli* ETEC + EIEC, canal FAM).

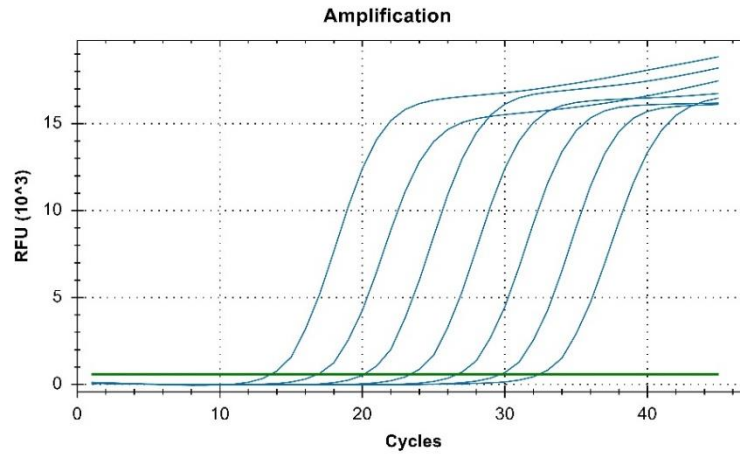


Figura 7. Diluciones seriadas de un estándar gen *lpaH* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción *E. coli* ETEC + EIEC, canal ROX).

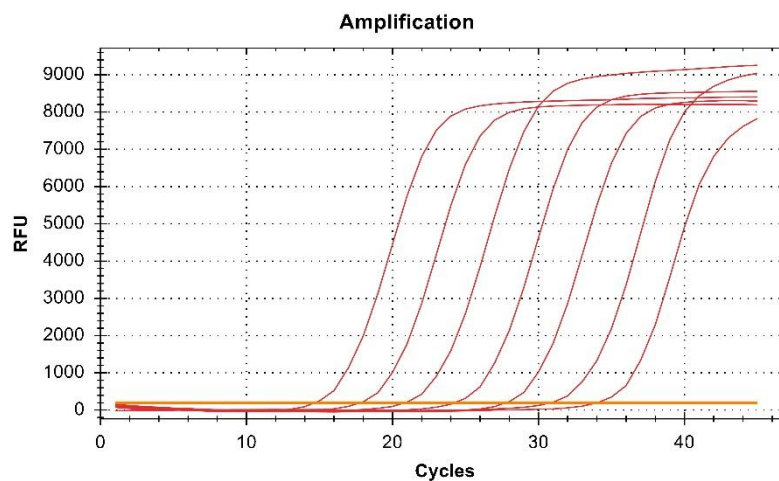
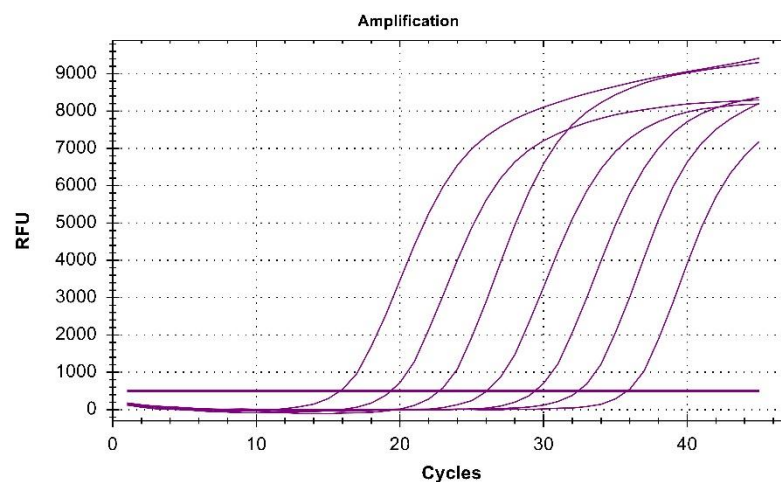


Figura 8. Diluciones seriadas de un estándar gen *st1a/st1b* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción *E. coli* ETEC + EIEC, canal Cy5).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *E. coli* Typing fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos entéricos más comunes o que pueden estar presentes en la flora intestinal. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

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

Tabla 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *E. coli* Typing Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a las cepas de *E. coli* de cada patotipo y a diferentes especies de *Shigella* que contenían los siguientes factores de virulencia: genes *stx1* y/o *stx2* y *eae* (EHEC), genes *stx1* y/o *stx2* (STEC), gen *eae* (EPEC), genes *lt* y/o *st1a* y/o *st1b* (ETEC) y gen *ipaH* (EIEC, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei* y *S. boydii*), mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. E.M. Nielsen *et al.* Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(7): 2884-2893.
2. J. Antikainen *et al.* A quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection of 9 pathogens directly from stools of travelers with diarrhea. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2013; 11(10):1300-1307.e3.
3. L. Ercoli, *et al.* Prevalence and characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs and pork products in Umbria and Marche regions of Italy. *International Journal of Food Microbiology* 2016; 232: 7-14.



4. T.E. Grys *et al.* Rapid and sensitive detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from nonenriched stool specimens by real-time PCR in comparison to enzyme immunoassay and culture. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47(7): 2008-12.
5. J. Madic *et al.* Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Applied Environmental Microbiology* 2011; 77(6): 2035-41.
6. K. Verstraete *et al.* A qPCR assay to detect and quantify Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in cattle and on farms: a potential predictive tool for STEC culture-positive farms. *Toxins (Basel)* 2014; 6(4): 1201-21.
7. Q. Chen *et al.* Rapid genetic typing of diarrheagenic *Escherichia coli* using a two-tube modified molecular beacon based multiplex real-time PCR assay and its clinical application. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2014;13:30.
8. J.B. Kape. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2(2): 123-40.
9. M.A. Croxen *et al.* Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 2013; 26(4): 822-80.
10. L.E. Bruijnesteijn van Coppenraet *et al.* Case-control comparison of bacterial and protozoan microorganisms associated with gastroenteritis: application of molecular detection. *Clinical Microbiology and Infection* 2015; 21(6): 592.
11. V. D. Thiem *et al.* Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the *ipaH* gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(5): 2031-2035.
12. E.J. Won *et al.* Multiplex Real-Time PCR Assay Targeting Eight Parasites Customized to the Korean Population: Potential Use for Detection in Diarrheal Stool Samples from Gastroenteritis Patients. *PLoS One* 2016;11(11): e0166957.
13. L. Chui *et al.* Comparison of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* detection methods using clinical stool samples. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2010; 12(4): 469-475.

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

	In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		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 (high profile), 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
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
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	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD 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 ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

(2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.

(3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

(4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

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



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo de la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), 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	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- 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™, Mx3005™ and AriaMx 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.

Revision: March 2019





CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC