

Vitassay qPCR

EHEC, EPEC & EIEC

PCR en tiempo real para la identificación y diferenciación específica de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)/*Shigella* en muestras de heces humanas.

Real-time PCR kit for the specific identification and differentiation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)/*Shigella* in human stool samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC permite la identificación y diferenciación específica de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)/*Shigella* en muestras de heces humanas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por EHEC, STEC, EPEC y/o EIEC/*Shigella*.

Referencias

Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC 4x8-well strip, low profile 7041059

Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC 4x8-well strip, high profile 7042059

Materiales/Reactivos suministrados

Reactivos suministrados para las referencias 7041059 y 7042059:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S059/ 7042S059	EHEC, EPEC & EIEC strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C059	EHEC, EPEC & EIEC Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Kit de extracción de DNA
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex

- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Escherichia coli (E. coli) es un bacilo gramnegativo, perteneciente al género *Escherichia*, conocido por ser parte de la flora intestinal normal (comúnmente reside en el colon humano), pero también puede ser la causa de enfermedades intestinales y extraintestinales en humanos. E. coli es un organismo causante de muchas enfermedades diarreicas. Además, cuando se encuentra fuera del tracto intestinal, E. coli puede causar infecciones del tracto urinario (ITU), infección abdominal y pélvica, neumonía, bacteriemia, meningitis y peritonitis, entre otras.

Hay cientos de cepas de E. coli identificadas, lo que resulta en un espectro de enfermedades que van desde gastroenteritis leve y autolimitada hasta insuficiencia renal y shock séptico. Las cepas patógenas de E. coli (patotipos o patovares) tienen factores de virulencia distintivos codificados en plásmidos, transposones y bacteriófagos. Las enfermedades intestinales serán descritas por los subtipos de E. coli causales, incluyendo *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), que también se conoce como *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC). Otros grupos patógenos de E. coli incluyen E. coli de adherencia difusa (DAEC). Los subtipos de E. coli se identifican según sus antígenos O y H. El antígeno O está determinado por una cadena de polisacárido repetida presente en la membrana externa del lipopolisacárido (LPS), y el flagelo determina el antígeno H. Actualmente hay alrededor de 200 grupos O diferentes de E. coli y 53 tipos H reconocidos.

EPEC fue el primer patotipo de E. coli identificado como agente causante de diarrea acuosa principalmente en bebés y niños pequeños en entornos con recursos limitados y es responsable de brotes epidémicos y esporádicos. La enfermedad diarreica causada por EPEC se contrae más comúnmente a través de la ingestión, pero también se puede transmitir de persona a persona. Los síntomas más comunes de la enfermedad EPEC son diarrea acuosa, dolor abdominal, náuseas, vómitos y fiebre. EPEC causa diarrea acuosa pero también otro tipo distinto de enfermedad diarreica que resulta de una patología intestinal característica inducida por este organismo. Las EPEC provocan cambios histopatológicos en la mucosa intestinal denominados lesión de "unión y borrado" (A/E), que implican la destrucción de las microvellosidades de la mucosa. La producción de la lesión A/E está relacionada con genes ubicados en un segmento cromosómico de 35 kb llamado locus de borramiento de enterocitos (LEE). Una proteína importante codificada por un gen (gen *eae*) en el LEE es la intimina, que

facilita la unión estrecha de EPEC a la superficie de la mucosa intestinal de los mamíferos. El patotipo de EPEC se puede subdividir en cepas típicas y atípicas.

EHEC ha sido responsable de grandes brotes de diarrea después de ingerir productos contaminados (p. Ej., Espinacas, brotes, lechugas, frutas), y carne de res poco cocida. La ECEH también está relacionada con el consumo de productos lácteos crudos. El genoma de EHEC también codifica intimina, que es su adhesina principal. Al entrar, las cepas de EHEC producen toxinas similares a Shiga (*Stx*) que median la desregulación de los canales iónicos de la membrana en la membrana epitelial del intestino que conduce a la pérdida de iones y una gran cantidad de agua. EHEC produce diarrea sanguinolenta debido a su capacidad para expresar la toxina Shiga 1 (*Stx1*) o la toxina Shiga 2 (*Stx2*). EHEC, que expresa *Stx2*, produce diarrea sanguinolenta y también puede expresar *Stx1*, mientras que las bacterias que no expresan *Stx2* no inducen diarrea sanguinolenta. El período de incubación entre la exposición a EHEC y la aparición de los síntomas suele ser de 3 a 4 días. Los síntomas de la infección por STEC son diarrea acuosa, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (HUS), fiebre, calambres abdominales y vómitos. El HUS es una complicación importante de la infección por EHEC que se caracteriza por la tríada de anemia hemolítica microangiopática (MAHA), trombocitopenia e insuficiencia renal. Según el CDC, se informó que hubo 3.127 casos en los Estados Unidos en 2019. Las infecciones por EHEC son comunes en todos los grupos de edad, pero el síndrome urémico hemolítico (HUS) resultante de las infecciones por EHEC es más común en niños menores de cinco años y adultos mayores de 60 años. El serotipo más común de STEC es O157:H7, pero otros serotipos también causan comúnmente infecciones humanas. Una característica importante de la virulencia de EHEC O157 es su capacidad para formar lesiones de unión y borrado (A/E) en las células epiteliales. Las infecciones causadas por *E. coli* O157:H7 varían de asintomáticas a graves. Se sabe que los seres humanos adquieren *E. coli* O157:H7 de múltiples formas, alimentos y agua contaminados y contacto directo con animales y seres humanos infectados. Las pruebas de diagnóstico para STEC se pueden realizar mediante cultivo, inmunoensayos y ensayos moleculares.

La *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) está estrechamente relacionada con *Shigella spp.*, se contrae a través de la ingestión de carnes poco cocidas y vegetales contaminados, y causa disentería bacilar (también llamada shigelosis) en humanos. El gen *lpaH* es un gen multicopia en el pINV así como en el cromosoma, que se encuentra exclusivamente en *Shigella* y EIEC. Las cepas de EIEC y *Shigella* tienen la capacidad de invadir la mucosa humana del colon, las células M, los macrófagos y las células epiteliales. Las EIEC están relacionadas con la diarrea inflamatoria o invasiva. Los síntomas de la infección por *Shigella*/EIEC van desde una diarrea acuosa leve hasta una disentería bacilar inflamatoria grave caracterizada por fuertes calambres abdominales, fiebre, escalofríos y heces que contienen sangre y moco. Los síntomas

graves pueden incluso ser mortales y pueden producirse complicaciones graves potencialmente mortales, como megacolon, perforación intestinal, peritonitis, neumonía y HUS.

Las enfermedades causadas por *E. coli* suponen una carga importante para los pacientes y el sistema sanitario, por lo que es necesario un rápido reconocimiento y un tratamiento adecuado. *E. coli* tiene la capacidad inherente de fermentar lactosa y producir indol, y antes de los ensayos basados en PCR, *E. coli* se identificaba mediante medios de cultivo selectivos. Si bien no se requiere el diagnóstico molecular en enfermedades leves, los patógenos específicos se pueden identificar mediante ensayos basados en PCR.

Principio del test

Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de los genes *stx1*, *stx2*, *eae* e *lpaH*. Tras la extracción de DNA, la presencia de EHEC, EPEC y/o EIEC/*Shigella* se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrolisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5'- 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC se trata de un test listo para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. 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 (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.

- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de DNA

La preparación de la muestra se debe realizar de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado. Las muestras de heces se deben recoger en recipientes limpios y procesarse lo antes posible (el uso de muestras frescas es recomendado). En el caso de conservar la muestra durante un tiempo prolongado, las muestras pueden congelarse a -20°C . Posteriormente para poder usarse en la prueba las muestras deben descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente. Los ciclos de congelación y descongelación deben evitarse. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Realizar el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek Molecular).
- MagDEA Dx SV kit, utilizando el magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el Maxwell® 16 instrument (Promega).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del EHEC, EPEC & EIEC Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (genes *stx1/stx2*), Cy5 (gen *eae*), ROX (gen *lpaH*) y HEX, JOE o VIC (Control interno (CI)). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación compruebe la emisión de señal de control interno (CI).

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales FAM, ROX, y Cy5.

Control negativo

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

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el control positivo para cualquier canal. El ensayo se debe de repetir.

Una vez validado el resultado de los controles, con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados de las muestras:

<i>stx1/stx2</i> (FAM)	<i>eae</i> (Cy5)	<i>ipaH</i> (ROX)	Control interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	-	+/-	-	+	EHEC Detectado
+	-	-	+	-	+	STEC (EHEC) Detectado
-	+	-	+/-	-	+	EPEC Detectado
-	-	+	+/-	-	+	EIEC/ <i>Shigella</i> Detectado
+	-	+	+/-	-	+	<i>Shigella dysenteriae</i> tipo 1 Detectado
-	-	-	+/-	-	+	Negativo
-	-	-	+/-	-	+	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una señal 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.

En caso de ausencia de 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.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, revisar todos los parámetros, y la forma sigmoidea de la curva. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado.

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

En un pequeño estudio se analizaron 25 muestras fecales de pacientes sintomáticos y con sospecha clínica de infección por E. coli utilizando el ensayo de PCR en tiempo real Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC. Los resultados obtenidos 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)). Con ambos kits, R-biopharm y Vitassay, se detectaron 6 muestras positivas para STEC, 1 muestra positiva para Shigella dysenteriae Tipo 1, 2 muestras positivas para EHEC y 4 muestras positivas para EPEC.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de los genes *stx1*, *stx2*, *lpaH* y *eae* (10^7 - 10^1 copias/reacción).

Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC tiene un límite de detección (LoD) de ≥ 10 copias de DNA por reacción para los genes *stx1*, *stx2*, *lpaH* y *eae*.

Especificidad analítica

La especificidad analítica del ensayo de EHEC, EPEC & EIEC fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas con casi ninguna de las especies, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo (-/+):

Pruebas de reactividad 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 A</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Adenovirus serotipos 40/41
<i>Salmonella paratyphi B</i>	<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 Genotipo I-VIII
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Blastocystis hominis</i>	Sapovirus
<i>Salmonella entérica</i> subsp. Entérica	<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>

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC 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) y gen *ipaH* (EIEC, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei* y *S. boydii*), mostrando un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC ha sido validado en los siguientes equipos:

- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)

I: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- La prueba es para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- Este ensayo ha sido validado con DNA extraído de muestras fecales humanas. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana, con el control positivo EHEC, EPEC & EIEC, o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

Adjunto I. Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cyclor
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System
7500 Real-Time PCR System
7900 HT Real-Time PCR System
ABI PRISM 7000
ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
MyiQ™ 2 Real-Time PCR Detection System
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cyclor
Cepheid
SmartCycler®
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor*
Eppendorf
Mastercycler™ep <i>realplex</i>
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Stratagene / Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II. Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
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	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene® Q Qiagen	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III. Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

Intended use

Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC allows the specific identification and differentiation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)/*Shigella* in human stool samples. The product is intended for use in EHEC, STEC, EPEC and/or EIEC/*Shigella* infections diagnosis alongside the patient's clinical data and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC 4x8-well strip, low profile	7041059
Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC 4x8-well strip, high profile	7042059

Materials/reagents provided

Reagents provided in references 7041059 and 7042059:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S059/ 7042S059	EHEC, EPEC & EIEC strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C059	EHEC, EPEC & EIEC Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4 x 8-cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. To avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- DNA extraction kit
- Centrifuge for 1.5 ml tubes
- Vortex

- Micropipettes (1-20 µl, 20-200 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Escherichia coli (*E. coli*) is a gram-negative bacillus, belonging to the genus *Escherichia*, known to be a part of normal intestinal flora (it commonly resides in the human colon), but it can also be the cause of intestinal and extraintestinal illness in humans. *E. coli* is a causative organism of many diarrheal illnesses. Moreover, when found outside of the intestinal tract, *E. coli* can cause urinary tract infections (UTI), abdominal and pelvic infection, pneumonia, bacteremia, meningitis, and peritonitis, among others.

There are hundreds of identified *E. coli* strains, resulting in a spectrum of disease from mild, self-limited gastroenteritis to renal failure and septic shock. Pathogenic *E. coli* strains (pathotypes or pathovars) have distinctive virulence factors encoded on plasmids, transposons, and bacteriophages. Intestinal illnesses will be described by the causative *E. coli* subtypes, including enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), which is also known as Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), and enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). Additional pathogenic groups of *E. coli* include diffusely adherent *E. coli* (DAEC). *E. coli* subtypes are identified according to their O and H antigens. The O antigen is determined by a repeating polysaccharide chain present in the lipopolysaccharide (LPS) outer membrane, and the flagellum determines the H antigen. Currently there are about 200 different *E. coli* O-groups and 53 H-types recognized.

EPEC was the first *E. coli* pathotype identified as a causative agent of watery diarrhea primarily in infants and young children in resource-limited settings and is responsible for sporadic and epidemic outbreaks. Diarrheal illness caused by EPEC is most commonly contracted through ingestion but can also be spread person-to-person. The most common symptoms of EPEC illness are watery diarrhea, abdominal pain, nausea, vomiting, and fever. EPEC cause watery diarrhea but also another distinct type of diarrheal disease that results from a characteristic intestinal pathology induced by this organism. EPEC cause histopathologic changes in the intestinal mucosa called “attaching and effacing” (A/E) lesion, involving destruction of the mucosal microvilli. The production of the A/E lesion is linked to genes located on a 35-kb chromosomal segment called the locus of enterocyte effacement (LEE). One important protein encoded by a gene (*eae* gene) on the LEE is intimin, which facilitates tight attachment of EPEC to mammalian intestinal mucosal surface. The EPEC pathotype can be subdivided into typical and atypical strains.

EHEC has been responsible for large diarrheal outbreaks after ingesting contaminated produce (e.g., spinach, sprouts, lettuce, fruit), and undercooked beef. EHEC is also linked to the consumption of raw dairy products. The EHEC genome also encodes intimin, which is its primary adhesin. On entry, EHEC strains produce Shiga-like toxins (*Stx*) which mediate the dysregulation of membrane ion channels in the epithelial membrane of the intestine that leads to loss of ions and a massive amount of water. EHEC produces bloody diarrhea due to its ability to express Shiga toxin 1 (*Stx1*) and or Shiga toxin 2 (*Stx2*). EHEC, which expresses *Stx2*, results in bloody diarrhea and may also express *Stx1*, while bacteria that do not express *Stx2* do not induce bloody diarrhea. The incubation period between exposure to EHEC and onset of symptoms is typically 3 to 4 days. The STEC infection symptoms are watery diarrhea, hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome (HUS), fever, abdominal cramping, and vomiting. HUS is a major complication of EHEC infection which is characterized by the triad of microangiopathic hemolytic anemia (MAHA), thrombocytopenia, and renal insufficiency. According to the CDC, there were reportedly 3,127 cases in the United States in 2019. EHEC infections are common across all age groups, but hemolytic uremic syndrome (HUS) resulting from EHEC infections is most common in children less than five years old and adults greater than 60 years old. The most common serotype of STEC is O157:H7, but other serotypes also commonly cause human infections. One important characteristic of EHEC O157 virulence is its ability to form attaching and effacing (A/E) lesions on epithelial cells. The infections caused by *E. coli* O157:H7 range from asymptomatic to severe. Humans are known to acquire *E. coli* O157:H7 in multiple ways, contaminated food and water and direct contact with infected animals and humans. Diagnostic testing for STEC can be performed by culture, immunoassays, and molecular assays.

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) is closely related to *Shigella spp.*, is contracted through ingesting undercooked meats and contaminated vegetables, and causes bacillary dysentery (also called shigellosis) in humans. The *lpaH*-gene is a multicopy gene on the pINV as well as on the chromosome, which is exclusively found in *Shigella* and EIEC. EIEC and *Shigella* strains have the ability to invade the human mucosa of the colon, M cells, macrophages, and the epithelial cells. EIEC are linked to inflammatory or invasive diarrhea. The symptoms of *Shigella*/EIEC infection range from mild watery diarrhea to severe inflammatory bacillary dysentery characterized by strong abdominal cramps, fever, chills, and stools containing blood and mucus. Severe symptoms can even be fatal and severe life-threatening complications, including megacolon, intestinal perforation, peritonitis, pneumonia, and HUS, can occur.

Illness caused by *E. coli* have a significant burden on patients and the healthcare system, so prompt recognition, and appropriate treatment are necessary. *E. coli* have the inherent ability to ferment lactose and produce indole, and before PCR-based

assays, *E. coli* were identified via selective culture media. While molecular diagnosis is not required in mild illness, specific pathogens can be identified via PCR-based assays.

Principle of the test

Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC is based on the real-time amplification of a conserved region of *stx1*, *stx2*, *eae* and *lpaH* genes. After DNA extraction, the EHEC, EPEC and/or EIEC/*Shigella* presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to spread the primers, the probe is hydrolyzed by its exonuclease 5'-3' activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The increase in the resulting fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible inhibition reaction. After the amplification reaction, the *stx1* and *stx2* genes are detected in the FAM channel, the *lpaH* gen is detected in the ROX channel, the *eae* gen is detected in the Cy5 channel and the Internal control (IC) is detected on HEX, VIC, or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do

not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed.

- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, processing, and DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used. Stool samples should be collected in clean containers and be processed as soon as possible (the fresh samples use is recommended). 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. Freezing and thawing cycles should be avoided. Homogenize stool sample thoroughly prior to preparation.

For nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. Follow the manufacturer's instructions for use. The assay has been validated with the following extraction kits:

- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek Molecular).
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized EHEC, EPEC & EIEC Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template, and it is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative (yellow tube) or positive (red tube) controls and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the channels FAM (*stx1/stx2* genes), Cy5 (*eae* gen), ROX (*lpaH* gen) and HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none (Attached II).

Analysis and interpretation of results

The results analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control (IC) signal emission.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve in FAM, ROX, and Cy5 channels, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence in FAM, ROX, and Cy5 channels, which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is amplification signal in negative control or signal absence in the positive control for any channel. The assay should be repeated.

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

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

(+) Positive: Amplification signal

(-) Negative: No amplification signal

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 internal control (IC) detection is not necessary since a high copy number of the target can cause a 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.

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

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to review all the parameters, and the sigmoid shape of the curve. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate.

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

Quality Control

To confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

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

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of *stx1*, *stx2*, *eae* and *lpaH* genes standards ranging from 10^7 to 10^1 copies/reaction.

Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC has a detection limit (LoD) of ≥ 10 DNA copies per reaction for *stx1*, *stx2*, *eae* and *lpaH* genes.

Analytical specificity

The analytical specificity of the EHEC, EPEC & EIEC assay was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was detected between almost any of the species, except the targeted pathogens of each assay (-/+):

Cross-reactivity assay		
<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 A</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Adenovirus serotypes 40/41
<i>Salmonella paratyphi B</i>	<i>Clostridium difficile</i>	Rotavirus A
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Norovirus Genotypes I and II
<i>Salmonella bongori</i>	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	Astrovirus Genotype I-VIII
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Blastocystis hominis</i>	Sapovirus
<i>Salmonella enteric</i> subsp. <i>Enteric</i>	<i>Enterohemorrhagic 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>

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC 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), *eae* gene (EPEC) and *ipaH* gene (EIEC, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei* and *S. boydii*), showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR EHEC, EPEC & EIEC has been validated on the following equipment:

- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)

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

Limitations

- The test is for professional *in vitro* diagnostic use.
- This assay has been validated with DNA extracted from human faecal samples. The use of other samples has not been established.
- The test quality depends on the sample quality; proper DNA from clinical specimens must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positives results due to cross-contamination, either by samples containing high concentrations of target DNA, by EHEC, EPEC & EIEC Positive Control or by carryover contamination from PCR products from previous reactions.

Attached I. Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cyclor
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

High profile Block Thermocyclers
Abbott
Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System
7500 Real-Time PCR System
7900 HT Real-Time PCR System
ABI PRISM 7000
ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™5 Real-Time PCR
MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cyclor
Cepheid
SmartCycler®
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor*
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Stratagene / Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System

* See Attached III to configure exposure settings.

Attached II. Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

Thermocycler	Vitassay Channel	Detection Channel	Observations
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Color Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Color Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
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 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	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene® Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III. Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

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










Bibliography/Bibliografía

1. Mueller M, Tainter CR. (2021) Escherichia Coli. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–.
2. Fatima R, Aziz M. (2021) Enterohemorrhagic Escherichia Coli. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–.
3. Liu, Y., Han, R., Wang, J., Yang, P., Wang, F., & Yang, B. (2020). Magnesium Sensing Regulates Intestinal Colonization of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *mBio*, 11(6), e02470-20.
4. Riley LW. (2020) Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: Escherichia coli. *Microbiol Spectr*. Dec;8(4).
5. Shenoy AR, Furniss RCD, Goddard PJ, Clements A. (2018) Modulation of Host Cell Processes by T3SS Effectors. *Curr Top Microbiol Immunol*. 416:73-115.
6. Yang SC, Lin CH, Aljuffali IA, Fang JY. (2017) Current pathogenic Escherichia coli foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch Microbiol*. Aug;199(6):811-825.
7. Bryan A, Youngster I, McAdam AJ. (2015) Shiga Toxin Producing Escherichia coli. *Clin Lab Med*. Jun;35(2):247-72.
8. Van den Beld MJ, Reubsæet FA. (2012) Differentiation between Shigella, enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and noninvasive Escherichia coli. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Jun;31(6):899-904.

Trademarks

All trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Symbols for components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos

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



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

www.vitassay.com