

Vitassay qPCR

Campylobacter + Salmonella + Yersinia enterocolitica

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Yersinia enterocolitica* en muestras humanas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of *Campylobacter*, *Salmonella* and/or *Yersinia enterocolitica* in human samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica*, permite la detección y diferenciación de *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Yersinia enterocolitica* mediante PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Yersinia enterocolitica*.

Referencias

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica*

4x8 -well strip, low profile

7041011

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica*

4x8-well strip, high profile

7042011

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S011/ 7042S011	<i>Campylobacter</i> + <i>Salmonella</i> + <i>Yersinia enterocolitica</i> strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C011	<i>Campylobacter</i> + <i>Salmonella</i> + <i>Yersinia enterocolitica</i> 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

- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o ≤ -70°C)
- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)

- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Campylobacter es una de las cuatro causas mundiales clave de enfermedades diarreicas. Se considera que es la causa bacteriana más común de gastroenteritis humana en el mundo. *Campylobacter* es un género de bacterias gramnegativas microaerófilas de la familia *Campylobacteriaceae*. El género *Campylobacter* consiste en un grupo grande y diverso de bacterias que actualmente comprende 26 especies, no todas las cuales causan enfermedades humanas. Aproximadamente el 90% de la enfermedad humana por *Campylobacter* es causada por una especie, *Campylobacter jejuni*. Las especies menos comunes, como *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. fetus* y *C. lari*, también pueden infectar a las personas.

Cualquiera puede infectarse con *Campylobacter*, pero la infección es más común en hombres, niños menores de 5 años y personas mayores de 65 años. Las personas pueden contraer la infección por *Campylobacter* al comer aves crudas o poco cocidas, al comer algo que las haya tocado, al comer otros alimentos (incluidos mariscos, carnes y productos agrícolas), o al tener contacto con animales y al beber agua no tratada. Las personas con infección por *Campylobacter* suelen tener diarrea (a menudo con sangre), fiebre y calambres estomacales. Las náuseas y los vómitos pueden acompañar a la diarrea. Estos síntomas generalmente comienzan de 2 a 5 días después de que la persona ingiere *Campylobacter* y duran aproximadamente una semana. Aunque las personas con infección por *Campylobacter* generalmente se recuperan solas, algunas necesitan tratamiento con antibióticos. A veces, las infecciones por *Campylobacter* causan complicaciones, como el síndrome del intestino irritable, parálisis temporal y artritis. En personas con sistemas inmunitarios debilitados, como aquellas con un trastorno de la sangre, con SIDA o que reciben quimioterapia, *Campylobacter* ocasionalmente se propaga al torrente sanguíneo y causa una infección potencialmente mortal.

La carga de enfermedades transmitidas por los alimentos, incluida la campilobacteriosis, es considerable: cada año, casi 1 de cada 10 personas enferma. *Campylobacter* causa aproximadamente 1,5 millones de enfermedades cada año en los Estados Unidos. Los brotes de *Campylobacter* no se informan con frecuencia, teniendo en cuenta la frecuencia con la que las personas se enferman por esta bacteria, pero la frecuencia ha ido en aumento. Los brotes se han asociado con productos lácteos no pasteurizados, agua contaminada, aves y productos agrícolas.

La infección por *Campylobacter* se diagnostica cuando una prueba de laboratorio detecta la bacteria *Campylobacter* en las heces (heces), tejidos corporales o fluidos. La prueba podría ser un cultivo que aisle la bacteria. Como alternativa a los métodos basados en cultivos, ahora están disponibles comercialmente tanto las pruebas de antígenos en heces como las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT). El uso de pruebas PCR para la detección directa de *Campylobacter* en heces está aumentando.

La salmonela es una de las cuatro causas mundiales clave de enfermedades diarreicas. *Salmonella* es un género de la familia *Enterobacteriaceae*. Es una bacteria Gram negativa, no formadora de esporas, con forma de bastoncillo y anaerobia facultativa. El género se clasifica en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. El análisis bioquímico y genómico de *Salmonella enterica* ha llevado a una mayor clasificación en subespecies, incluidas *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Las especies de *Salmonella* clínicamente importantes se clasifican en *Salmonella enterica*, que se clasifica además en más de 2579 serovares en función de su antigenicidad.

La bacteria puede transmitirse por vía fecal-oral, donde los huéspedes susceptibles pueden adquirir *Salmonella* a través de alimentos y agua contaminados. La infección de humanos con *Salmonella* da como resultado tres enfermedades infecciosas principales, a saber, fiebre tifoidea, fiebre paratifoidea e infecciones por NTS. Las fiebres tifoidea y paratifoidea son causadas por *S. Typhi* y *Salmonella enterica* serovar *Paratyphi* (*S. Paratyphi*), respectivamente, y se caracterizan por gastroenteritis y complicaciones como septicemia, síntomas inmunológicos, leucopenia y síntomas neurológicos. Las infecciones por NTS se limitan a gastroenteritis (náuseas, vómitos y diarrea) o bacteriemia ocasional y, por lo general, no son mortales. La mayoría de las personas que se enferman de *Salmonella* tienen diarrea, fiebre y calambres estomacales. Algunas personas también pueden tener náuseas, vómitos o dolor de cabeza. Los síntomas generalmente comienzan de 6 horas a 6 días después de la infección y duran de 4 a 7 días. La mayoría de las personas se recuperan sin un tratamiento específico y no deben tomar antibióticos.

La investigación ha estimado que la infección por *Salmonella* causa 2.800 millones de casos de diarrea anualmente en todo el mundo. Los CDC estiman que la bacteria *Salmonella* causa alrededor de 1,35 millones de infecciones, 26 500 hospitalizaciones y 420 muertes en los Estados Unidos cada año. Aunque los grandes brotes de *Salmonella* suelen atraer la atención de los medios, entre el 60% y el 80% de todos los casos de salmonelosis no se reconocen como parte de un brote conocido y se clasifican como casos esporádicos.

El diagnóstico de la infección por *Salmonella* requiere analizar una muestra, como heces o sangre. La prueba podría ser un cultivo que aisle la bacteria o una prueba de

diagnóstico independiente del cultivo que detecte material genético de la bacteria, como la reacción en cadena de la polimerasa. El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es otra herramienta útil en el diagnóstico de la infección por *Salmonella*.

Yersinia enterocolitica es una bacteria con forma de bacilo gramnegativo, de la familia *Enterobacteriaceae*, que causa una enfermedad zoonótica llamada Yersiniosis. *Y. enterocolitica* comprende un grupo heterogéneo de cepas, tradicionalmente clasificadas por biotipificación en 6 biogrupos basados en sus características fenotípicas. Concomitantemente, también se clasifican en cuanto al serotipo, y más de 60 serotipos definidos por su antígeno de superficie O (lipopolisacárido o LPS). Sin embargo, los serotipos patógenos en humanos son el 4/O:3, el 2/O:5,27, el 1B/O:8. y el 2/ O:9. De ellos, el biotipo 4/ O:3 es el más común en los países europeos, seguido del 2/O:9, mientras que el serogrupo 1B/O:8 es más frecuente en Estados Unidos.

Las infecciones por *Yersinia* pueden manifestarse como una yersiniosis aguda, presentando diarrea, dolor abdominal, náuseas, vómitos y fiebre. Estos síntomas suelen aparecer de 4 a 7 días después de la exposición y pueden durar de 1 a 3 semanas o más. Además, la yersiniosis aguda puede simular una apendicitis, siendo más común entre los niños y los bebés. En el caso de pacientes inmunodeprimidos, la infección puede convertirse en una sepsis y puede ser mortal.

La forma de transmisión más habitual es la vía fecal-oral y el consumo de carne de cerdo poco cocinada y/o cruda suele ser una fuente de esta. Una vez ingerida, la bacteria atraviesa las paredes intestinales, gracias a las ureasas que le confieren la capacidad de sobrevivir a los ácidos gástricos del estómago y llega al tejido linfático y a los ganglios linfáticos mesentéricos.

Los métodos de diagnóstico para *Yersinia* se basan en procedimientos convencionales de aislamiento e identificación, pero estas técnicas requieren tiempo y son arduas. Para solucionar este problema, se han desarrollado métodos más rápidos y sensibles, como la PCR.

Principio del test

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del gen 16S rRNA para *Campylobacter*, del gen *invA* para *Salmonella* y de los genes *ail* e *ystB* para *Yersinia enterocolitica* y *Y. enterocolitica* biotipo 1A, respectivamente. Tras la extracción de DNA, la presencia de *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Yersinia enterocolitica* se detecta mediante un aumento de 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 *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica*, se trata de una prueba lista para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de las secuencias diana es detectada en el canal Cy5 (*Campylobacter*), FAM (*Salmonella*) y ROX (*Yersinia enterocolitica*) mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- 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. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación sobre residuos sanitarios nacional y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa.

- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

Procedimiento

Toma, transporte y conservación de muestras

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* ha sido testado en muestras fecales humanas. El usuario debe validar otros tipos de muestras.

En general, las muestras clínicas deben recogerse adecuadamente en recipientes limpios con o sin medios de transporte (según el tipo de muestra), etiquetarse correctamente y procesarse con prontitud para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Las muestras deben transportarse a temperatura ambiente como máximo durante 2 horas, o entre 2-8°C durante máximo 24 horas. Para un transporte de mayor duración (más de 24 horas), se recomienda el envío a -20°C o menos. Las muestras pueden conservarse entre 2-8°C durante máximo 24 horas o congeladas a -20°C o menos (-80°C idealmente) para su conservación durante más tiempo. Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Para más información puede consultar las siguientes guías:

- Miller JM, et al. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis.* Aug 31;67(6):e1-e94.
- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Extracción de DNA

Para el aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas se puede utilizar un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de extracción utilizado. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el Maxwell® RSC 16 instrument (Promega).

QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

MagDEA Dx SV kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).

Preparación del control positivo

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

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

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo reconstituido (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 Cy5 (*Campylobacter*), FAM (*Salmonella*), ROX (*Yersinia enterocolitica*) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR a 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).

Utilice la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la reacción (antes de la interpretación de los resultados de las muestras), para garantizar que el threshold se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de threshold puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal. Se recomienda establecer los valores de threshold para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final.

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 (Ct \leq 40) en los canales de *Campylobacter* (Cy5), *Salmonella* (FAM) y *Yersinia enterocolitica* (ROX).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal (Ct $>$ 40 o no señal) de FAM y ROX y ausencia de señal (Ct $>$ 37 o no señal) de Cy5.

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

El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos del control positivo y control negativo.

Debe tener en cuenta que pueden aparecer curvas de amplificación con Ct >37 en el canal Cy5 debido a *Campylobacter* ambiental. Por lo tanto, se establece un Ct de corte de 37 para esta diana.

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

Campylobacter (Cy5)	Salmonella (FAM)	Yersinia enterocolitica (ROX)	Control Interno (HEX)	Interpretación
- ¹	+	-	+/- ²	ADN <i>Salmonella</i> detectado y ADN <i>Campylobacter</i> y <i>Yersinia enterocolitica</i> no detectados
- ¹	-	+	+/- ²	ADN <i>Yersinia enterocolitica</i> detectado y ADN <i>Campylobacter</i> y <i>Salmonella</i> no detectados
+ ¹	-	-	+/- ²	ADN <i>Campylobacter</i> detectado, ADN <i>Salmonella</i> y <i>Yersinia enterocolitica</i> no detectados
- ¹	+	+	+/- ²	ADN <i>Salmonella</i> y <i>Yersinia enterocolitica</i> detectados y ADN <i>Campylobacter</i> no detectado
+ ¹	+	-	+/- ²	ADN <i>Salmonella</i> y <i>Campylobacter</i> detectados y ADN <i>Yersinia enterocolitica</i> no detectado
+ ¹	-	+	+/- ²	ADN <i>Campylobacter</i> y <i>Yersinia enterocolitica</i> detectados y ADN <i>Salmonella</i> no detectado
+ ¹	+	+	+/- ²	ADN <i>Salmonella</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> y <i>Campylobacter</i> detectados
- ¹	-	-	+ ³	Dianas no detectadas
- ¹	-	-	- ³	Inválido ³

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40)

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct >40 o no señal)

¹ Debe tener en cuenta que pueden aparecer curvas de amplificación con Ct >37 en el canal Cy5 debido a *Campylobacter* ambiental. Por lo tanto, se establece un Ct de corte de 37 para esta diana.

² 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. El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal).

³ En el caso de que la detección de los genes diana de *Campylobacter*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación con $Ct \leq 35$. En el caso de ausencia de señal o valor de $Ct > 35$ del control interno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de fluorescencia. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado, en función del material disponible (obtener un nuevo espécimen y volver a testar, volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, repetir qPCR con la misma muestra de DNA aislada).

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

El rendimiento clínico de Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* se evaluó retrospectivamente utilizando 243 remanentes de muestras fecales de pacientes con sintomatología y signos de infección por *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Yersinia enterocolitica*. La extracción de los ácidos nucleicos se realizó con el MagDEA Dx SV kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y la amplificación a tiempo real se llevó a cabo en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Estas muestras fueron analizadas previamente mediante cultivo y espectrometría de masas (MALDI-TOF) y las incongruencias se resolvieron con un ensayo molecular de referencia con marcado CE-IVD. Finalmente se realizó un análisis estadístico para obtener los valores de sensibilidad y especificidad indicados a continuación:

Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP
<i>Campylobacter</i>	52	189	0	2	0.96 (0.86 – 0.99)	1 (0.98 – 1)
<i>Salmonella</i>	36	207	0	0	1 (0.9-1)	1 (0.98-1)
<i>Y. enterocolitica</i>	24	219	0	0	1(0.85 – 1)	1 (0.98 – 1)

TP: verdadero positivo; TN: verdadero negativo; FP: falso positivo; FN: falso negativo; SE: sensibilidad; SP: especificidad.

Los resultados obtenidos muestran una alta concordancia para la detección de estas bacterias utilizando Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* kit.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de las diferentes bacterias (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de 50 copias de DNA por reacción para *Salmonella*, 50 copias de DNA por reacción para *Yersinia enterocolitica* (gen *ail*), 10 copias de DNA por reacción para *Yersinia enterocolitica* (gen *ystB*) y 50 copias de DNA por reacción para *Campylobacter* (tasa positividad 95%).

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de *Campylobacter*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos. No se observaron reacciones cruzadas con ninguna de las especies:

Pruebas de reactividad cruzada		
Sapovirus	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotipo O1:K1	<i>Helicobacter pylori</i> J99
<i>Aeromonas caviae</i>	Echovirus 30	Rotavirus humano A
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> .	<i>Entamoeba dispar</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	<i>Entamoeba histolytica</i> cepa DS4-868	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2c
Astrovirus genotipos 1-8	<i>Enterococcus faecalis</i>	Norovirus genotipos I y II.4
<i>Bacteroides fragilis</i>	Enterovirus 68 y 71	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Blastocystis hominis</i>	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica serotipo O157:H7	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica	Adenovirus serotipos 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41
<i>Clostridium difficile</i> O27	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica serotipo O25:H42	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Giardia intestinalis</i> cepa WB clone C6	<i>Shigella dysenteriae</i> serotipo 1
Coxsackievirus A24, A9 y B3	<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Helicobacter heilmannii</i> *	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Cryptosporidium hominis</i>	<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Dientamoeba fragilis</i>

* Se comprobó que *Helicobacter heilmannii* estaba contaminado con *Salmonella* y *Campylobacter* tras analizarlo y confirmarlo con RIDA®GENE Bacterial Stool panel (R-biopharm)).

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* para *Campylobacter* ha sido evaluado frente a DNA extraído de *Campylobacter coli*; *Campylobacter hyointestinalis* cepa 80-4577-4; *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* cepa LMG 18455; *Campylobacter lari* y *Campylobacter upsaliensis* cepa CCUG 24803 como referencias, obteniéndose resultados positivos para todas ellas.

La reactividad de Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* para *Salmonella* ha sido evaluado frente a DNA extraído de *Salmonella bongori* cepa 1224.72, serotipo Brookfield (66:z41:-); *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *enteritidis*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* cepa LT2, serovar *typhimurium*, serotipo 4,5,12:i:1,2; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *gallinarum*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *pullorum*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *paratyphi A*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *paratyphi B* y *Salmonella*

enterica subsp. *enterica* serovar *thyphi* como referencias, obteniéndose resultados positivos para todas ellas.

La reactividad de Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Yersinia enterocolitica para *Yersinia enterocolitica* ha sido evaluado frente a DNA extraído de *Yersinia enterocolitica* O:3 y *Yersinia enterocolitica* O:9 como referencias, obteniéndose resultados positivos para todas ellas.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Yersinia enterocolitica ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^I
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^{II}
- NEOS-96 Real Time PCR System (Linear)

^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).

^{II}: Para el equipo Rotor-Gene® Q el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos del equipo.

Limitaciones

- Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido validado con DNA extraído de muestras clínicas fecales. 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.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.
- 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 el Campylobacter + Salmonella + Yersinia enterocolitica Positive control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas

concentraciones de DNA molde diana o por productos de PCR de reacciones anteriores.

- La detección puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido el aislamiento de DNA); c) Degradación del DNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) mutaciones potenciales de las secuencias diana de las bacterias identificadas por este test que pueden provocar que el DNA sea indetectable e) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; f) presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); g) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante.
- La detección del DNA puede no indicar la presencia de bacterias viables y/o infecciosas o que estas bacterias sean el agente causante de los síntomas clínicos.
- Los resultados negativos no impiden la infección por *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Yersinia enterocolitica* y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimos y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar las bacterias.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR, el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Yersinia enterocolitica*, y se han descartado otras enfermedades gastrointestinales, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.

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
AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
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™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾
Azure Cielo 6
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Roche
LightCycler® 480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}
LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}

Formatos especiales ⁽⁷⁾
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cycler
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Qiagen
Rotor-Gene® Q

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 ⁽¹⁾
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena
qTOWER
BIONEER
Exicycler™ 96
BIOER
QuantGene 9600
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽⁸⁾
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
QIAquant 96

- (1) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos de PCR a tiempo real.
- (2) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (3) No lectura en canal ROX.
- (4) No lectura en canal Cy5.
- (5) Lectura solo en canales FAM y HEX.
- (6) Se requiere compensación de color específica.
- (7) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento de la prueba) y transvasar a los tubos específicos Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q o geneLEAD VIII System.
- (8) Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición.

Adjunto II. 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 siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480 II	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	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	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 para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	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	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III. Configuración valores de exposición

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

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	250
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	500
	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 *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* allows the detection and differentiation of *Campylobacter*, *Salmonella* and/or *Yersinia enterocolitica* by real-time PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of *Campylobacter*, *Salmonella* and/or *Yersinia enterocolitica* infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica*

4x8 -well strip, low profile

7041011

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica*

4x8-well strip, high profile

7042011

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S011/ 7042S011	<i>Campylobacter</i> + <i>Salmonella</i> + <i>Yersinia enterocolitica</i> strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C011	<i>Campylobacter</i> + <i>Salmonella</i> + <i>Yersinia enterocolitica</i> Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4x8-cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. 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

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- DNA extraction kit

- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 ml tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µl, 20-200 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Campylobacter is 1 of 4 key global causes of diarrheal diseases. It is considered the most common bacterial cause of human gastroenteritis in the world. *Campylobacter* is a gram-negative, microaerophilic genus of bacteria of the family *Campylobacteriaceae*. The *Campylobacter* genus consists of a large and diverse group of bacteria currently comprising 26 species, not all of which cause human illness. Approximately 90% of human *Campylobacter* illness is caused by one species, *Campylobacter jejuni*. Less common species, such as *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. fetus*, and *C. lari*, can also infect people.

Anyone can become infected with *Campylobacter*, but infection is more common in males, children younger than 5 years, and people 65 years and older. People can get *Campylobacter* infection by eating raw or undercooked poultry, eating something that touched it, eating other foods (including seafood, meat, and produce), or by contact with animals, and by drinking untreated water. People with *Campylobacter* infection usually have diarrhea (often bloody), fever, and stomach cramps. Nausea and vomiting may accompany the diarrhea. These symptoms usually start 2 to 5 days after the person ingests *Campylobacter* and last about one week. Although people with *Campylobacter* infection usually recover on their own, some need antibiotic treatment. Sometimes *Campylobacter* infections cause complications, such as irritable bowel syndrome, temporary paralysis, and arthritis. In people with weakened immune systems, such as those with a blood disorder, with AIDS, or receiving chemotherapy, *Campylobacter* occasionally spreads to the bloodstream and causes a life-threatening infection.

The burden of foodborne diseases, including *Campylobacteriosis*, is substantial: every year almost 1 in 10 people fall ill. *Campylobacter* causes an estimated 1.5 million illnesses each year in the United States. *Campylobacter* outbreaks are not commonly reported, considering how often people get sick from this bacterium, but the frequency has been increasing. Outbreaks have been associated with unpasteurized dairy products, contaminated water, poultry, and produce.

Campylobacter infection is diagnosed when a laboratory test detects *Campylobacter* bacteria in stool (poop), body tissue, or fluids. The test could be a culture that isolates the bacteria. As an alternative to culture-based methods, both

stool antigen tests and nucleic acid amplification tests (NAATs) are now commercially available. The use of PCR tests for the direct detection of *Campylobacter* in stool is increasing.

Salmonella is 1 of 4 key global causes of diarrhoeal diseases. *Salmonella* is a genus of the family *Enterobacteriaceae*. It is a Gram-negative, non-spore-forming, rod-shaped and facultative anaerobic bacterium. The genus is classified into two species: *Salmonella enterica* and *Salmonella bongori*. Biochemical and genomic analysis of *Salmonella enterica* has led to further classification into subspecies, including *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* and *indica*. The clinically important *Salmonella* species are classified under *Salmonella enterica*, which is further classified into more than 2,579 serovars based on their antigenicity.

The bacterium can be transmitted through faecal–oral routes, where susceptible hosts may acquire *Salmonella* through contaminated foods and water. Infection of humans with *Salmonella* results in three main infectious diseases, namely typhoid fever, paratyphoid fever and NTS infections. Typhoid and paratyphoid fevers are caused by *S. Typhi* and *Salmonella enterica* serovar *Paratyphi* (*S. Paratyphi*), respectively, and are characterized by gastroenteritis and complications such as septicemia, immunological symptoms, leukopenia, and neurological symptoms. NTS infections are restricted to gastroenteritis (nausea, vomiting and diarrhoea) or occasional bacteremia, and are usually non-fatal. Most people who get ill from *Salmonella* have diarrhea, fever, and stomach cramps. Some people may also have nausea, vomiting, or a headache. Symptoms usually begin 6 hours to 6 days after infection and last 4 to 7 days. Most people recover without specific treatment and should not take antibiotics.

Research has estimated that *Salmonella* infection causes 2.8 billion cases of diarrhoea annually worldwide. CDC estimates *Salmonella* bacteria cause about 1.35 million infections, 26,500 hospitalizations, and 420 deaths in the United States every year. Although large *Salmonella* outbreaks usually attract media attention, 60–80% of all salmonellosis cases are not recognized as part of a known outbreak and are classified as sporadic cases.

Diagnosing *Salmonella* infection requires testing a specimen such as stool or blood. The test could be a culture that isolates the bacteria or a culture-independent diagnostic test that detects genetic material of the bacteria such as polymerase chain reaction. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is another useful tool in the diagnosis of *Salmonella* infection.

Yersinia enterocolitica is a gram-negative bacillus shaped bacterium, of the *Enterobacteriaceae* family, that causes a zoonotic disease called yersiniosis. *Y. enterocolitica* comprises a heterogeneous group of strains, traditionally classified by biotyping into 6 biogroups based on their phenotypic characteristics. Concomitantly, they are also classified regarding the serotype, and more than 60 serotypes defined by

their O (lipopolysaccharide or LPS) surface antigen. Nevertheless, the pathogenic serotypes in humans are 4/O:3 2/O:5,27, 1B/O:8. and 2/ O:9. Of these, biotype 4/ O:3 is the most common in European countries followed by 2/O:9, whilst serogroup 1B/O:8 is more prevalent in the US.

Yersinia infections can manifest as an acute yersiniosis, presenting diarrhoea, abdominal pain, nausea, vomiting and fever. These symptoms usually appear 4 to 7 days after exposure and may last 1 to 3 weeks or longer. In addition, acute yersiniosis can mimic appendicitis, being more common among children and infants. In case of immunocompromised patients, the infection can develop into a sepsis and can be fatal.

The way of transmission is most commonly through the faecal-oral route and undercook and/or raw pork consumption is usually a source of it. Once it is ingested, the bacteria pass through the intestinal walls, thanks to the ureases that confer the ability to survive the gastric acids in the stomach and gets to the lymphoid tissue and mesenteric lymph nodes.

Diagnostic methods for *Yersinia* are based on conventional isolation and identification procedures, but these techniques require time and are arduous. To address this matter, faster and more sensitive methods, such as PCR, have been developed.

Principle of the test

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* test is based on the real-time amplification of a conserved region of the *16S rRNA* gene for the identification of *Campylobacter*, the *invA* gene for *Salmonella* and the *ail* and *ystB* genes for *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica* biotype 1A, respectively. After DNA isolation, the *Campylobacter*, *Salmonella* and/or *Yersinia enterocolitica* presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon 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 *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* test is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the *Campylobacter* DNA target sequence is detected through the Cy5 channel, *Salmonella* DNA target in FAM channel and *Yersinia*

enterocolitica DNA in ROX channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC, or JOE channel (depending on the equipment used).

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- 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. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- 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.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the tube bottom, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the test functionality.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, transport, and conservation

For specimen collection, conservation, and transport, user-validated conditions must be followed. Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* has been tested in human stool samples. Other sample types should be validated by the user.

Overall, clinical samples should be collected appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type), correctly labelled and promptly processed to ensure the test's quality. It is recommended to use fresh specimens for the test. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. The specimens should be transported at room temperature for up to 2 hours, or at 2°C to 8°C for up to 24 hours. For long term transport (more than 24 hours), we recommend shipping at -20°C or lower. The samples can be stored at 2°C to 8°C for up to 24 hours or frozen at -20°C or lower (at -80°C ideally) for long-term conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For more information, refer to the following guidelines:

- Miller JM, et al. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. Aug 31;67(6):e1-e94.

- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

DNA extraction

For nucleic acid isolation from clinical specimens, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The assay has been validated with the following extraction kits:

Maxwell® RSC Blood DNA Kit using the Maxwell® RSC 16 instrument (Promega).

QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* 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 is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative control (yellow tube) or reconstituted positive control (red tube) 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 Cy5 (*Campylobacter*), FAM (*Salmonella*), ROX (*Yersinia enterocolitica*) and HEX, JOE, or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (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.

Use the positive control amplification curve as a starting point during reaction validation (prior to interpretation of sample results), to ensure that the threshold falls within the exponential phase of the amplification curves and above any background noise signals. The threshold value may vary between different instruments due to different signal intensities. It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end user.

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 ($Ct \leq 40$) for Cy5 (*Campylobacter*), FAM (*Salmonella*) and ROX (*Yersinia enterocolitica*), which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show the signal absence ($Ct > 40$ or no signal) in FAM and ROX and the signal absence ($Ct > 37$ or no signal) in Cy5, which validates the reaction.

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

The Internal Control (IC) should show an amplification signal ($Ct \leq 40$) in positive control and negative control wells.

Note that amplification curves with $Ct > 37$ may appear in channel Cy5 due to ambient *Campylobacter*. Therefore, a cut-off Ct of 37 is set for this target.

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

Campylobacter (Cy5)	Salmonella (FAM)	Yersinia enterocolitica (ROX)	Internal Control (HEX)	Interpretation
- ¹	+	-	+/- ²	<i>Salmonella</i> DNA detected and <i>Campylobacter</i> and <i>Yersinia enterocolitica</i> DNA not detected
- ¹	-	+	+/- ²	<i>Yersinia enterocolitica</i> DNA detected and <i>Campylobacter</i> and <i>Salmonella</i> DNA not detected
+ ¹	-	-	+/- ²	<i>Campylobacter</i> DNA detected, <i>Salmonella</i> and <i>Yersinia enterocolitica</i> DNA not detected
- ¹	+	+	+/- ²	<i>Salmonella</i> and <i>Yersinia enterocolitica</i> DNA detected and <i>Campylobacter</i> DNA not detected
+ ¹	+	-	+/- ²	<i>Salmonella</i> and <i>Campylobacter</i> DNA detected and <i>Yersinia enterocolitica</i> DNA not detected
+ ¹	-	+	+/- ²	<i>Campylobacter</i> and <i>Yersinia enterocolitica</i> DNA detected and <i>Salmonella</i> DNA not detected
+ ¹	+	+	+/- ²	<i>Salmonella</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> and <i>Campylobacter</i> DNA detected
- ¹	-	-	+ ³	Targets not detected
- ¹	-	-	- ³	Invalid ³

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤40)

(-) Negative: No amplification signal (Ct >40 or no signal)

¹ Note that amplification curves with Ct >37 may appear in channel Cy5 due to ambient *Campylobacter*. Therefore, a cut-off Ct of 37 is set for this target.

² Sometimes, the IC detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids. The Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal).

³ In the case of negative *Salmonella*, *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica* target genes detection, IC must show an amplification signal with Ct ≤ 35. If there is an absence of signal or Ct value > 35 of the Internal Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR by diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each qPCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate, depending on the available material (repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, obtain a new specimen and retest).

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. Moreover, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

The Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* kit's clinical performance was evaluated retrospectively using 243 fecal sample remnants from patients with symptomatology and signs of *Campylobacter*, *Salmonella* and/or *Yersinia enterocolitica* infection. Nucleic acid extraction was performed with the MagDEA Dx SV kit using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and real-time amplification was performed on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). These samples were previously analyzed by culture and mass spectrometry (MALDI-TOF) and inconsistencies were resolved with a CE-IVD-labeled reference molecular assay. Finally, a statistical analysis was performed to obtain the sensitivity and specificity values indicated below:

Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP
<i>Campylobacter</i>	52	189	0	2	0.96 (0.86 – 0.99)	1 (0.98 – 1)
<i>Salmonella</i>	36	207	0	0	1 (0.9-1)	1 (0.98-1)
<i>Y. enterocolitica</i>	24	219	0	0	1(0.85 – 1)	1 (0.98 – 1)

TP: true positive; TN: true negative; FP: false positive; FN: false negative; SE: sensitivity; SP: specificity

The obtained results show a high concordance for these bacteria detection using Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* kit.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of standards from *Campylobacter*, *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica* ranging from 10^7 to 10^1 copies/reaction. This assay has a detection limit of 50 DNA copies per reaction for *Salmonella*, 50 DNA copies per reaction for *Yersinia enterocolitica* (*ail* gene), 10 DNA copies per reaction for *Yersinia enterocolitica* (*ystB* gene) and 50 DNA copies per reaction for *Campylobacter* (positive rate 95%).

Analytical specificity

The analytical specificity for *Campylobacter*, *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica* detection was tested within the panel of following microorganisms. No cross-reactivity was observed with any of the species:

Cross-reactivity testing		
Sapovirus	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O1:K1	<i>Helicobacter pylori</i> J99
<i>Aeromonas caviae</i>	Echovirus 30	Human Rotavirus A
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> .	<i>Entamoeba dispar</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	<i>Entamoeba histolytica</i> strain DS4-868	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2c
Astrovirus genotypes 1-8	<i>Enterococcus faecalis</i>	Norovirus genotypes I and II.4
<i>Bacteroides fragilis</i>	Enterovirus 68 and 71	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Blastocystis hominis</i>	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> serotype O157:H7	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Candida albicans</i>	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	Adenovirus serotypes 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41
<i>Clostridium difficile</i> O27	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> serotype O25:H42	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Giardia intestinalis</i> strain WB clone C6	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 1
Coxsackievirus A24, A9 and B3	<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Helicobacter heilmannii</i> *	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Cryptosporidium hominis</i>	<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Dientamoeba fragilis</i>

* The *Helicobacter heilmannii* strain has been demonstrated to be contaminated with *Salmonella* and *Campylobacter* after analysis and confirmation with RIDA®GENE Bacterial Stool panel (R-biopharm)).

Analytical reactivity

The Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* kit's reactivity for *Campylobacter* was evaluated against DNA extracted from *Campylobacter coli*; *Campylobacter hyointestinalis* strain 80-4577-4; *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strain LMG 18455; *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis* strain CCUG 24803 as templates, showing positive results.

The Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* kit's reactivity for *Salmonella* was evaluated against DNA extracted from *Salmonella bongori* strain

1224.72, serotype *Brookfield* (66:z41:-); *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *enteritidis*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain *LT2*, serovar *typhimurium*, serotype 4,5,12:i:1,2; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *gallinarum*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *pullorum*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *paratyphi A*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *paratyphi B* and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *thyphi* as templates, showing positive results.

The Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* kit's reactivity for *Yersinia enterocolitica* was evaluated against DNA extracted from *Yersinia enterocolitica* O:3 and *Yersinia enterocolitica* O:9 as templates, showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* has been validated on the following equipment:

- Cobas Z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^I
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^{II}
- NEOS-96 Real Time PCR System (Linear)

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

^{II}: For Rotor-Gene® Q thermocycler the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q tubes.

Limitations

- All obtained results must be interpreted by a specialist in conjunction with available clinical information and laboratory findings.
- This assay has been validated with DNA extracted from stool clinical samples. The use of other samples has not been established.
- The correct test performance depends on the sample quality; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This test is a qualitative assay.
- Extremely low levels of target DNA below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.

- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination, either by *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* Positive Control during its reconstitution, by samples containing high concentrations of target DNA or by PCR products from previous reactions.
- Detection may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage, handling; b) procedural errors (including DNA isolation); c) DNA degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) potential mutations of the target regions of the bacteria covered by this test which may result in DNA being undetectable e) pathogen load below the limit of detection for the assay; f) the presence of Real-Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics, or immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection was not performed); g) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures.
- Detection of DNA may not indicate the presence of viable and/or infectious bacteria or that those bacteria are the causative agents for clinical symptoms.
- Negative results do not preclude *Campylobacter*, *Salmonella* and/or *Yersinia enterocolitica* infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Optimal specimen types and/or stage of infection most suitable for its collection have not been established yet. Consider the collection of multiple specimens from the same patient at different time points, which may increase the probability of detecting the bacteria.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type and its previous treatment, among others.
- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible *Campylobacter*, *Salmonella* and/or *Yersinia enterocolitica* infection, and other gastrointestinal diseases have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.

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
AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
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™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾
Azure Cielo 6
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}
LightCycler®96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}

Special Formats ⁽⁷⁾
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cycler
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Qiagen
Rotor-Gene® Q

High profile Block Thermocyclers
Abbott
Abbott m2000 ⁽¹⁾
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena
qTOWER
BIONEER
Exicycler™ 96
BIOER
QuantGene 9600
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™5 Real-Time PCR
My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽⁸⁾
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
QIAquant 96

- (1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.
- (2) Select Ramp Speed "Standard".
- (3) No ROX caption.
- (4) No Cy5 caption.
- (5) Only FAM and HEX caption.
- (6) Specific compensation color is required.
- (7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.
- (8) 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	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	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	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	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	
BIONEER Exicycler™ 96	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	250
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	500
	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. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Campylobacter* (Campylobacteriosis). Available from: <https://www.cdc.gov/campylobacter/> Accessed March 2022
2. World Health Organization (WHO). *Campylobacter*. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter> Accessed March 2022
3. Fitzgerald C. (2015). *Campylobacter*. Clin Lab Med. Jun;35(2):289-98.
4. Gut AM, Vasiljevic T, Yeager T, Donkor ON. (2018). Salmonella infection - prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. Microbiology (Reading). Nov;164(11):1327-1344.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Salmonella*. Available from: <https://www.cdc.gov/salmonella/> Accessed March 2022
6. World Health Organization (WHO). *Salmonella (non-typhoidal)*. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)) Accessed March 2022
7. Aziz M, Yelamanchili VS. (2022) *Yersinia Enterocolitica*. Apr 30. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan—.
8. Rusak LA, de Castro Lisboa Pereira R, Freitag IG, Hofer CB, Hofer E, Asensi MD, Vallim DC. (2018) Rapid detection of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 using a duplex PCR assay. J Microbiol Methods. Nov;154:107-111.
9. Bui TH, Ikeuchi S, O'Brien YS, Niwa T, Hara-Kudo Y, Taniguchi T, Hayashidani H. (2021). Multiplex PCR method for differentiating highly pathogenic *Yersinia enterocolitica* and low pathogenic *Yersinia enterocolitica*, and *Yersinia pseudotuberculosis*. J Vet Med Sci. Dec 23;83(12):1982-1987.
10. Fàbrega A, Vila J. (2012) *Yersinia enterocolitica*: pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. Enferm Infecc Microbiol Clin. Jan;30(1):24-32.
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Yersinia enterocolitica* (Yersiniosis). Available from: <https://www.cdc.gov/yersinia/index.html> Accessed June 2022

Trademarks

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

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

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



VA Vitassay

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

www.vitassay.com