

# Vitassay qPCR

## Campylobacter + Salmonella + Shigella

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Shigella*/EIEC en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Shigella*/EIEC in human samples





## Uso previsto

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella*, permite la detección y diferenciación de *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Shigella*/ *Escherichia coli* (EIEC) enteroinvasiva 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 *Shigella*/EIEC.

## Referencias

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* 4x8 -well strip, low profile  
7041010

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* 4x8-well strip, high profile  
7042010

## Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S010/ 7042S010	<i>Campylobacter</i> + <i>Salmonella</i> + <i>Shigella</i> strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C010	<i>Campylobacter</i> + <i>Salmonella</i> + <i>Shigella</i> Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1 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 de congelación y descongelación, se recomienda separar en alícuotas.
- Conservar los reactivos en la oscuridad.

## Material y equipamiento necesario pero no proporcionado

- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL
- Vórtex

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

## Resumen

La gastroenteritis es la mayor causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, tanto en niños desde los 5 años como en la población general.

*Campylobacter* se trata de un género de bacterias gram negativas, delgadas, en forma de espiral y microaerófilas que viven como organismos comensales en el tracto gastrointestinal de muchos animales domésticos como pájaros salvajes y mamíferos. *C. jejuni* y *C. coli* son de lejos los patógenos humanos más importantes dentro del género y representan más del 95% de todos los aislamientos clínicos en todo el mundo.

El género *Salmonella* contiene dos especies distintas, *Salmonella entérica* (dividida en 6 subespecies) y *Salmonella bongori*. Las especies de *Salmonella* son la causa principal bacteriana de gastroenteritis aguda

La Shigellosis produce reacciones inflamatorias y procesos ulcerosos en el epitelio intestinal, seguido de una diarrea mucosa y sanguinolenta. Este cuadro entérico puede estar originado por *E. coli* (EIEC) enteroinvasiva así como por cualquiera de las especies del género *Shigella*, siendo éstas; *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, y *S. sonnei*. La Shigellosis es endémica en muchos países en vías de desarrollo, pudiendo derivar en epidemias que causan una alta morbilidad y mortalidad.

## Principio del test

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región diana conservada del gen 16S rRNA para *Campylobacter*, del gen *invA* para *Salmonella* y del gen *ipaH* para *Shigella*/EIEC. Tras la extracción de DNA, la presencia de *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Shigella*/*Escherichia coli* (EIEC) enteroinvasiva se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella*, se trata de un test *listo para usar* que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana es detectada en el canal Cy5 (*Campylobacter*), FAM (*Salmonella*) y ROX (*Shigella*/EIEC) mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

## Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en los laboratorios.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

## Procedimiento

### Toma de muestra, preparación y extracción de DNA.

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

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

QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN).

QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

### Preparación del control positivo

Reconstituir el Campylobacter + Salmonella + Shigella Positive Control (tubo rojo) liofilizado en 100 µL de PCR grade water suministrado (tubo blanco). Mezclar bien con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar varios 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.

### 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) en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

### Programación del termociclador.

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (\*) a través de los canales Cy5 (*Campylobacter*), FAM (*Salmonella*), ROX (*Shigella*/EIEC) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

### Análisis e interpretación de resultados

El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

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

**Control positivo** El control positivo utilizado en cada serie, debe mostrar una curva de amplificación en los canales de *Campylobacter* (Cy5), *Salmonella* (FAM) y *Shigella*/EIEC (ROX).

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

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

Con la ayuda de la siguiente tabla, analizar los resultados:





Campylobacter (Cy5)	Salmonella (FAM)	Shigella/EIEC (ROX)	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	<i>Campylobacter, Salmonella y Shigella/EIEC Positivos</i>
-	-	-	+	-	+	<i>Campylobacter, Salmonella y Shigella/EIEC Negativos</i>
+	-	-	+/-	-	+	<i>Campylobacter Positivo, Salmonella y Shigella/EIEC Negativos</i>
+	+	-	+/-	-	+	<i>Campylobacter y Salmonella Positivos, Shigella/EIEC Negativos</i>
+	-	+	+/-	-	+	<i>Campylobacter y Shigella/EIEC Positivos, Salmonella Negativo</i>
-	+	-	+/-	-	+	<i>Salmonella Positivo, Campylobacter y Shigella/EIEC Negativos</i>
-	+	+	+/-	-	+	<i>Salmonella y Shigella/EIEC Positivos, Campylobacter Negativo</i>
-	-	+	+/-	-	+	<i>Shigella/EIEC Positivo, Campylobacter y Salmonella Negativos</i>
+	+	+	+	+	+	<b>Inválido</b>
-	-	-	-	-	-	<b>Inválido</b>

**+ Positivo:** Señal de amplificación

**- Negativo:** No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas para todas las bacterias no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

## Control de Calidad

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

## Características técnicas

### Sensibilidad y especificidad clínica

Un total de 400 muestras fecales humanas fueron analizadas mediante Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* y RIDA®GENE Bacterial Stool Panel (r-Biopharm) para *Campylobacter* y *Salmonella*.

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* detectó *Campylobacter* en 58 muestras positivas. Este test incluso identificó 13 muestras adicionales como positivas débiles, cuyo resultado pudo ser confirmado por un kit comercial de PCR en tiempo real (Mericon-*Campylobacter* spp QIAGEN).

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* detectó *Salmonella* en 21 muestras positivas. Este test incluso identificó 1 muestra adicional como positiva débil, cuyo resultado pudo ser confirmado mediante cultivo para *Salmonella* G.

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* detectó *Shigella*/EIEC en 2 muestras positivas. Este resultado se confirmó mediante un Kit de PCR a tiempo real comercial (RIDA®GENE EHEC/EPEC (rBiopharm), que detecta y diferencia EHEC, STEC (EHEC), EPEC, *Shigella dysenteriae* tipo 1 y *Shigella*/EIEC).

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Campylobacter*, *Salmonella* y *Shigella*/EIEC utilizando Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* kit.

### Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de las diferentes bacterias ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de DNA por reacción.

## Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de *Campylobacter*, *Salmonella* y *Shigella*/EIEC fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos.

No se observaron reacciones cruzadas de *Campylobacter* entre ninguna de las especies:

<i>Shigella flexneri</i>	<i>Helicobacter heilmannii</i>	<i>Arcobacter butzleri</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Giardia intestinalis</i>
<i>Salmonella paratyphi B</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9
<i>Salmonella bongori</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>entérica</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	Adenovirus serotipo 40
<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	Adenovirus serotipo 41
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Rotavirus A
<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Norovirus Genotipo I y II
<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Candida albicans</i>	Astrovirus Genotipo I-VIII

No se observaron reacciones cruzadas de *Salmonella* entre ninguna de las especies:

<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	<i>Arcobacter butzleri</i>
<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Helicobacter heilmannii</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 y O:9
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Campylobacter lari</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Giardia intestinalis</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	Adenovirus serotipos 40/41
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Rotavirus A
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Norovirus Genotipos I y II
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Candida albicans</i>	Astrovirus Genotipos I-VIII

No se observaron reacciones cruzadas de *Shigella*/EIEC entre ninguna de las especies:

<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>Salmonella typhi</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3
<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9
<i>Salmonella paratyphi B</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Salmonella bongori</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Giardia intestinalis</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Adenovirus serotipos 40
<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	Adenovirus serotipos 41
<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	Rotavirus A
<i>Campylobacter lari</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Norovirus Genotipos I y II
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Astrovirus Genotipos I-VIII

### Reactividad analítica

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* Real Time PCR para *Campylobacter* ha sido evaluado frente a *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter helveticus*, *Campylobacter curvus* y *Campylobacter rectus*, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* Real Time PCR para *Salmonella* ha sido evaluado frente a *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella bongori*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella mbandaka* y *Salmonella braenderup*, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* Real Time PCR para *Shigella*/EIEC ha sido evaluado frente a *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

### Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella*, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)
- SmartCycler® (Cepheid)

Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

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

### **Limitaciones**

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por *Campylobacter*, *Salmonella* y *Shigella*/EIEC. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras fecales humanas. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas humanas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con las diferentes bacterias, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

## Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

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

<b>Termocicladores con bloque de bajo perfil</b>
<b>Applied Biosystems</b>
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
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
<b>Bio-Rad</b>
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
<b>Roche</b>
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
<b>Agilent Technologies</b>
AriaMx Real-Time PCR System
<b>DNA-Technology</b>
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene®
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®

<b>Termocicladores con bloque de alto perfil</b>
<b>Applied Biosystems</b>
7500 Real-Time PCR
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Real-Time PCR
<b>Bio-Rad</b>
CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™5 Real-Time PCR
<b>Eppendorf</b>
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
<b>Analytik Jena Biometra</b>
TOptical
qTOWER 2.0
<b>Abbott</b>
Abbott m2000 RealTime System
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>DNA-Technology</b>
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene®
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®

## 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
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene®Q Qiagen</b>	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	





## Intended use

Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella allows the detection and differentiation of *Campylobacter*, *Salmonella* y *Shigella*/ enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) by real-time PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Shigella*/EIEC infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

## References

Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella 4x8 -well strip, low profile  
7041010

Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella 4x8-well strip, high profile  
7042010

## Materials/reagents provided

Code	Reagent/Material	Colour	Quantity
7041S010/ 7042S010	Campylobacter + Salmonella + Shigella strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C010	Campylobacter + Salmonella + Shigella Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4x8 cap strip

## Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, we recommend to separate in aliquots.
- Keep all reagents of in the dark.

## Additional equipment and material required

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)

- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

## Summary

Gastroenteritis is a major cause of morbidity and mortality, worldwide, both in children 5 years old and in the general population.

*Campylobacter* are gram negative, slender, spirally curved, microaerophilic bacteria that live as commensal organisms in the gastrointestinal tract of many domestic and wild birds and mammals. *C. jejuni* and *C. coli* are by far the most important human pathogens in the genus and account for more than 95% of all clinical isolates worldwide.

The genus *Salmonella* contains two distinct species, designated *Salmonella enterica* (divided into six subspecies) and *Salmonella bongori*. *Salmonella* species are a leading bacterial cause of acute gastroenteritis.

Shigellosis produces inflammatory reactions and ulceration on the intestinal epithelium followed by bloody or mucoid diarrhea. It is caused by enteroinvasive *E. coli* (EIEC) as well as any species of the genus *Shigella*, namely, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, and *S. sonnei*. Shigellosis is endemic in many developing countries and also occurs in epidemics causing considerable morbidity and mortality.

## Principle of the test

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* test is based on the real-time amplification of a conserved region of the *16S rRNA* gene for the identification of *Campylobacter*, *invA* gene for *Salmonella* and *ipaH* gene for *Shigella*/EIEC. After DNA isolation, the presence of *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Shigella*/ enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* 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 *Shigella*/EIEC DNA in ROX channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

## Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the laboratories.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

## **Procedures**

### **Specimen collection, processing and DNA extraction**

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

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

QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN).

QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).

### **Positive control preparation**

Reconstitute the lyophilized *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* Positive Control (red tube) in the 100 µL of PCR grade water (transparent tube) supplied. To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

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

### 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) into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative and positive controls into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly(optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

### Programm your thermocycler.

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (\*) through the Cy5 (*Campylobacter*), FAM (*Salmonella*), ROX (*Shigella/EIEC*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached 2)

### Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer’s instructions.

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

**Positive control**

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for Cy5 (*Campylobacter*), FAM (*Salmonella*) and ROX (*Shigella*/EIEC), which validates the reaction.

**Negative control**

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

The experiment seems to be fail if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The result interpretation is summarized in the following table:

<b>Campylobacter (Cy5)</b>	<b>Salmonella (FAM)</b>	<b>Shigella/EIEC (ROX)</b>	<b>Internal Control</b>	<b>Negative Control</b>	<b>Positive Control</b>	<b>Interpretation</b>
+	+	+	+/-	-	+	<i>Campylobacter, Salmonella and Shigella/EIEC Positives</i>
-	-	-	+	-	+	<i>Campylobacter, Salmonella and Shigella/EIEC Negatives</i>
+	-	-	+/-	-	+	<i>Campylobacter Positive, Salmonella and Shigella/EIEC Negatives</i>
+	+	-	+/-	-	+	<i>Campylobacter and Salmonella Positives, Shigella/EIEC Negative</i>
+	-	+	+/-	-	+	<i>Campylobacter and Shigella/EIEC Positives, Salmonella Negative</i>
-	+	-	+/-	-	+	<i>Salmonella Positive, Campylobacter and Shigella/EIEC Negatives</i>
-	+	+	+/-	-	+	<i>Salmonella and Shigella/EIEC Positives, Campylobacter Negative</i>
-	-	+	+/-	-	+	<i>Shigella/EIEC Positive, Campylobacter and Salmonella Negatives</i>
+	+	+	+	+	+	<b>Invalid</b>
-	-	-	-	-	-	<b>Invalid</b>

(+) **Positive:** Amplification signal  
 (-) **Negative:** No amplification signal

If the negative samples not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

## Quality Control

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

## Performance evaluation

### Clinical sensitivity and specificity

A total of 400 faecal specimens from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella and RIDA®GENE Bacterial Stool Panel (R-biopharm) for *Salmonella* and *Campylobacter*.

Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella detects *Campylobacter* in 58 positive samples. This test identified even 13 additional low positives that could be confirmed as positive by an additional commercial Real Time PCR Kit (Mericon-Campylobacter spp, QIAGEN).

Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella detects *Salmonella* in 21 positive samples. This test identified even 1 additional low positive that could be confirmed as positive by culture for *Salmonella G*.

Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella detects *Shigella*/EIEC in 2 positive sample. This result was confirmed by a commercial Real Time PCR Kit ("RIDA®GENE EHEC/EPEC" (r-Biopharm), which detects and differentiates EHEC, STEC (EHEC), EPEC, *Shigella dysenteriae* type 1 and *Shigella*/EIEC).

The specificity of Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella was 100% for *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*/EIEC.

### Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*/EIEC templates ranging from  $10^7$  to  $10^1$  copies/rxn. This assay has a detection limit of  $\geq 10$  DNA copies per reaction.

## Analytical specificity

The analytical specificity for *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*/EIEC was tested within the panel of different microorganisms.

No cross-reactivity of *Campylobacter* was seen between any of the species:

<i>Shigella flexneri</i>	<i>Helicobacter heilmannii</i>	<i>Arcobacter butzleri</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Giardia intestinalis</i>
<i>Salmonella paratyphi B</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9
<i>Salmonella bongori</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>entérica</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	Adenovirus serotipo 40
<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	Adenovirus serotipo 41
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Rotavirus A
<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Norovirus Genotipo I y II
<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Candida albicans</i>	Astrovirus Genotipo I-VIII

No cross-reactivity of *Salmonella* was seen between any of the species:

<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	<i>Arcobacter butzleri</i>
<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Helicobacter heilmannii</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 y O:9
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Campylobacter lari</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Giardia intestinalis</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	Adenovirus serotipos 40/41
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Rotavirus A
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Norovirus Genotipos I y II
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Candida albicans</i>	Astrovirus Genotipos I-VIII



No cross-reactivity of *Shigella*/EIEC was seen between any of the species:

<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>Salmonella typhi</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3
<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9
<i>Salmonella paratyphi B</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Salmonella bongori</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Giardia intestinalis</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Adenovirus serotipos 40
<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	Adenovirus serotipos 41
<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	Rotavirus A
<i>Campylobacter lari</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Norovirus Genotipos I y II
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Astrovirus Genotipos I-VIII

### Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* for *Campylobacter* was evaluated against *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter helveticus*, *Campylobacter curvus* and *Campylobacter rectus*, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* for *Salmonella* was evaluated against *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella bongori*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella mbandaka* and *Salmonella braenderup*, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* for *Shigella*/EIEC was evaluated against *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* and *Shigella sonnei*, showing positive result.

## Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)
- SmartCycler® (Cepheid)

For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler tubes.

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

## Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of *Campylobacter*, *Salmonella* and/or *Shigella*/EIEC infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with human faecal samples. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical specimens must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different bacteria, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

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

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

Low profile Block Thermocyclers
<b>Applied Biosystems</b>
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
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
<b>Bio-Rad</b>
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
<b>Roche</b>
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
<b>Agilent Technologies</b>
AriaMx Real-Time PCR System
<b>DNA-Technology</b>
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene®
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®

High profile Block Thermocyclers
<b>Applied Biosystems</b>
7500 Real-Time PCR
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Real-Time PCR
<b>Bio-Rad</b>
CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™5 Real-Time PCR
<b>Eppendorf</b>
Mastercycler™ep <i>realplex</i>
<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
<b>Analytik Jena Biometra</b>
TOptical
qTOWER 2.0
<b>Abbott</b>
Abbott m2000 RealTime System
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>DNA-Technology</b>
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene®
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®

**Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment**

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

Real-time pcr thermocycler	Vitassay channel	Detection channel	Observations
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Passive reference option ROX is none
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene®Q Qiagen</b>	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

## Bibliography/Bibliografía

1. Campylobacter virulence and survival factors. Declan J. Bolton. Food Microbiology. 2015; 48: 99-108.
2. Automated 59 Nuclease PCR Assay for Identification of *Salmonella enterica*. J. Hoorfar *et al.* *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 3429–3435.
3. Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the *ipaH* gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam. V. D. Thiem *et al.* *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(5): 2031-2035.
4. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. N. Botteldoorn *et al.* *Journal of Applied Microbiology* 2008; 105(6):1909-1918.
5. Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the *ipaH* gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam. V. D. Thiem *et al.* *Journal of Clinical Microbiology*
6. 2004; 42(5): 2031-2035.

## Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.









Mx3000P™ and Mx3029™ are registered trademarks of Agilent Technologies.

Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.

Rotor-Gene® Q is a registered trademark of Qiagen.

SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

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

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





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

[www.vitassay.com](http://www.vitassay.com)