

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 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 alcuotas.
- 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.

El género *Yersinia* consta de 17 especies, de las cuales 3 son patógenas en humanos y animales, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* y *Yersinia pseudotuberculosis*. *Yersinia enterocolitica* es una enfermedad gastrointestinal zoonótica en seres humanos que puede aislarse a partir de una gran variedad de animales domésticos y salvajes.

Principio del test

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* 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 *ail* para *Yersinia enterocolitica* (si está presente). Tras la extracción de DNA, la presencia de *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Yersinia enterocolitica* se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica*, 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 (*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*.
- 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* + *Yersinia enterocolitica* 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 (*Yersinia enterocolitica*) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, y Stratagene Mx3029P™ 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 *Yersinia enterocolitica* (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)	Yersinia enterocolitica (ROX)	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	<i>Campylobacter, Salmonella y Yersinia enterocolitica</i> Positivos
-	-	-	+	-	+	<i>Campylobacter, Salmonella y Yersinia enterocolitica</i> Negativos
+	-	-	+/-	-	+	<i>Campylobacter</i> Positivo, <i>Salmonella y Yersinia enterocolitica</i> Negativos
+	+	-	+/-	-	+	<i>Campylobacter y Salmonella</i> Positivos, <i>Yersinia enterocolitica</i> Negativos
+	-	+	+/-	-	+	<i>Campylobacter y Yersinia enterocolitica</i> Positivos, <i>Salmonella</i> Negativo
-	+	-	+/-	-	+	<i>Salmonella</i> Positivo, <i>Campylobacter y Yersinia enterocolitica</i> Negativos
-	+	+	+/-	-	+	<i>Salmonella y Yersinia enterocolitica</i> Positivos, <i>Campylobacter</i> Negativo
-	-	+	+/-	-	+	<i>Yersinia enterocolitica</i> Positivo, <i>Campylobacter y Salmonella</i> Negativos
+	+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	-	Inválido

+ 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* + *Yersinia enterocolitica* y RIDA®GENE Bacterial Stool Panel (r-Biopharm) para *Campylobacter*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica*.

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* 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* + *Yersinia enterocolitica* 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* + *Yersinia enterocolitica* detectó *Yersinia enterocolitica* en 4 muestras positivas.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Campylobacter*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* utilizando Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* 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 ≥ 10 copias de DNA por reacción.

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 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 *Yersinia enterocolitica* entre ninguna de las especies:

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

Reactividad analítica

Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Yersinia enterocolitica 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 + Yersinia enterocolitica 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 + Yersinia enterocolitica Real Time PCR para *Yersinia enterocolitica* ha sido evaluado frente a los serotipos O:3, O:8 y O:9 de *Yersinia enterocolitica*, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Yersinia enterocolitica, 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 *Yersinia enterocolitica*. 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:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor
Qiagen
Rotor-Gene®
Cepheid
SmartCycler®

Termocicladores con bloque de alto perfil
Applied Biosystems
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
Bio-Rad
CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™5 Real-Time PCR
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Stratagene / Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
Abbott
Abbott m2000 RealTime System
BIONEER
Exicycler™ 96
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time
Qiagen
Rotor-Gene®
Cepheid
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
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

Intended use

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* allows the detection and differentiation of *Campylobacter*, *Salmonella* y *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

Code	Reagent/Material	Colour	Quantity
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 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 μ L, 20-200 μ L)
- 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.

The genus *Yersinia* consists of 17 species, among which only three species are human and animal pathogens, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Yersinia enterocolitica* is a zoonotic gastrointestinal disease in humans which species can be isolated from a variety of domestic and wildlife animals.

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*, *invA* gene for *Salmonella* and *ail* gene for *Yersinia enterocolitica* (if present). After DNA isolation, the presence of *Campylobacter*, *Salmonella* and/or *Yersinia enterocolitica* is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

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 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 (Stratec).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* 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 (*Yersinia enterocolitica*) 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 (*Yersinia enterocolitica*), 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:

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

(+) **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 + Yersinia enterocolitica and RIDA@GENE Bacterial Stool Panel (R-biopharm) for *Salmonella* and *Campylobacter*.

Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Yersinia enterocolitica 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 + Yersinia enterocolitica 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 + Yersinia enterocolitica detects *Yersinia enterocolitica* in 4 positive samples.

The specificity of Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Yersinia enterocolitica was 100% for *Campylobacter*, *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica*.

Analytical sensitivity

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

Analytical specificity

The analytical specificity for *Campylobacter*, *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica* 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 *Yersinia enterocolitica* was seen between any of the species:

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

Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* 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* + *Yersinia enterocolitica* 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* + *Yersinia enterocolitica* for *Yersinia enterocolitica* was evaluated against *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3, O:8 and O:9, showing positive results.

Compatible real-time PCR equipment

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Yersinia enterocolitica* 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)
- DTPrime 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 *Yersinia enterocolitica* 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
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen
Rotor-Gene®
Cepheid
SmartCycler®

High profile Block Thermocyclers
Applied Biosystems
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
Bio-Rad
CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™5 Real-Time PCR
Eppendorf
Mastercycler™ep <i>realplex</i>
Stratagene / Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
Abbott
Abbott m2000 RealTime System
BIONEER
Exicycler™ 96
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time
Qiagen
Rotor-Gene®
Cepheid
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
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Passive reference option ROX is none
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	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. Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. M. Rosner et al. *BMC Public Health*. 2010; 10: 337.
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. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. S.T. Lambertz et al. *Applied and Environmental Microbiology* 2008;74(19):6060-6067.

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