

Vitassay qPCR

Campylobacter + Salmonella + Shigella/EIEC

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* and/or *Shigella*/EIEC in human samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella*/EIEC, permite la detección cualitativa y diferenciación de DNA de las especies de *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Shigella/Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) mediante PCR a tiempo real en muestras de heces humanas. 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*/EIEC 4x8-well strip, low profile 7041010

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella*/EIEC 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 1,8 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 μ L, 20-200 μ L)
- 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*.

La bacteria *Shigella* causa una infección llamada shigelosis. *Shigella* es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae* Gram-negativa. Cuatro especies comprenden el género *Shigella*: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*. Las especies de *Shigella* están muy relacionadas con *Escherichia coli*. La diferenciación de *Shigella* y *E. coli* es aún más complicada con la descripción de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC). La *Shigella* es muy contagiosa. Las personas pueden enfermarse al tocar superficies contaminadas con gérmenes de las heces de una persona enferma, al comer alimentos preparados por alguien que tiene shigelosis, al tragar agua recreativa y al exponerse a las heces a través del contacto sexual.

La mayoría de las personas con infección por *Shigella* tienen diarrea (a veces con sangre), fiebre y calambres estomacales. Los síntomas generalmente comienzan 1 o 2 días después de la infección y duran 7 días. La mayoría de las personas se recuperan sin necesidad de antibióticos. Sin embargo, las personas con enfermedades graves y aquellas con afecciones subyacentes que debilitan el sistema inmunitario deben recibir antibióticos. Algunas personas con shigelosis no tendrán ningún síntoma. Las posibles complicaciones de las infecciones por *Shigella* incluyen artritis post-infecciosa, infecciones del torrente sanguíneo, convulsiones y síndrome urémico hemolítico.

Estimaciones recientes atribuyen a *Shigella* la causa de ~125 millones de episodios de diarrea al año, lo que provoca alrededor de 160 000 muertes, con un tercio de estas asociadas con niños pequeños. *Shigella*, junto con *Escherichia coli* enterotoxigénica, se identificaron como los patógenos bacterianos diarreicos predominantes en poblaciones pediátricas del sur de Asia y África subsahariana. Los CDC estiman que cada año ocurren alrededor de 450 000 casos de shigelosis en los Estados Unidos, lo que la convierte en la tercera enfermedad entérica bacteriana más común. La shigelosis no tiene una marcada estacionalidad, lo que probablemente refleja la importancia de la transmisión de persona a persona.

La infección se diagnostica cuando un laboratorio identifica *Shigella* en las heces de una persona enferma. La prueba puede ser un cultivo que aisle la bacteria o una prueba de diagnóstico rápido que detecte material genético de la bacteria. *Shigella* y EIEC podrían separarse de otras *E. coli* mediante una PCR dirigida al gen *ipaH*.

Principio del test

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella*/EIEC 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* enteroinvasiva (EIEC) se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos oligonucleótidos específicos (primers) y una sonda de hidrolisis marcada con fluorescencia 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* + *Shigella*/EIEC, 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 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* (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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- 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 + Shigella/EIEC kit ha sido testado en muestras fecales humanas. Otros tipos diferentes de muestras deben ser validadas por el usuario.

En general, las muestras clínicas se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (según el tipo de muestra), y ser procesadas a la mayor brevedad posible 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. Los especímenes pueden ser transportados a temperatura ambiente hasta 2 horas, o entre 2-8°C hasta 24 horas, y para transportes de duración mayor de 24 horas, se recomienda realizar el envío a -20°C o menos. Las muestras pueden almacenarse entre 2-8°C hasta 24 horas o pueden congelarse a -20°C o idealmente a -80°C para su conservación durante un tiempo prolongado. 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 se puede utilizar un sistema manual o automático optimizado compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Maxwell® RSC 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el equipo Maxwell® RSC 16 instrument (Promega).

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

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

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Campylobacter + Salmonella + Shigella 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 (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 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 (*Shigella*/EIEC) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). Para comprobar los canales de detección más comunes 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).

El valor de threshold puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal. 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. 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), *Shigella/EIEC* (ROX) y Control interno (HEX).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal (Ct $>$ 40 o no señal) en los canales FAM y ROX, ausencia de señal (Ct $>$ 37 o no señal) en el canal Cy5, y presencia de señal (Ct \leq 40) en el canal HEX.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo y/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 \leq 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)	Shigella/EIEC (ROX)	Control Interno (HEX)	Interpretación
- ¹	+	-	+/-*	Salmonella detectada, Shigella/EIEC y Campylobacter no detectados
- ¹	-	+	+/-*	Shigella/EIEC detectado, Salmonella y Campylobacter no detectados
+ ¹	-	-	+/-*	Campylobacter detectado, Salmonella y Shigella/EIEC no detectados
- ¹	+	+	+/-*	Salmonella y Shigella/EIEC detectados, Campylobacter no detectado
+ ¹	+	-	+/-*	Salmonella y Campylobacter detectados, Shigella/EIEC no detectado
+ ¹	-	+	+/-*	Shigella/EIEC y Campylobacter detectados, Salmonella no detectado
+ ¹	+	+	+/-*	DNA de todas las dianas detectado
- ¹	-	-	+ [#]	Dianas no detectadas
- ¹	-	-	- [#]	Inválido

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.

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

[#] En el caso de que los genes diana de *Salmonella*, *Campylobacter* y *Shigella/EIEC* resulten negativo, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 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 la 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

La sensibilidad y la especificidad clínica de Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella*/EIEC se evaluó utilizando 400 muestras fecales. La extracción se realizó con Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex), y el termociclador utilizado fue el AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies).

Los resultados obtenidos con Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella*/EIEC se compararon con los valores obtenidos con el método rutinario (cultivo + MALDI-TOF). En caso de obtener resultados negativos, se procede con PCR convencional y secuenciación para confirmar los resultados negativos y resolver resultados discrepantes. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<i>Campylobacter</i>	53	329	12	0	1 (0.93-1)	0.97(0.94-0.98)	1 (0.99-1)	0.82 (0.70-0.90)
<i>Salmonella</i>	22	377	0	1	0.96 (0.78-0.99)	1 (0.99-1)	1 (0.99-1)	1 (0.85-1)
<i>Shigella</i> /EIEC	2	398	0	0	1 (0.16-1)	1 (0.99-1)	1 (0.16-1)	1 (0.99-1)

TP = Verdaderos positivos, TN = Verdaderos negativos, FP = Falsos Positivos, FN = Falsos Negativos, SE = Sensibilidad, SP = Especificidad, PPV = Valor predictivo positivo, NPV = Valor predictivo negativo.

Estos resultados muestran una alta concordancia para detectar *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *Shigella*/EIEC utilizando Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella*/EIEC kit.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de los diferentes patógenos (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de 10 copias de DNA por reacción para *Salmonella* y *Shigella*/EIEC, y 50 copias de DNA por reacción para *Campylobacter*, con una tasa de positividad del 95%.

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 entre ninguna de las especies:

Pruebas de reactividad cruzada		
Sapovirus	<i>Cryptosporidium hominis</i>	<i>Helicobacter pylori</i> J99
<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Dientamoeba fragilis</i>	Rotavirus A humano
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> .	Ecovirus 30	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	<i>Entamoeba dispar</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2c
Astrovirus genotipos 1-8	<i>Entamoeba histolytica</i> cepa DS4-868	Norovirus genotipos I y II.4
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Blastocystis hominis</i>	Enterovirus 68 y 71	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	Adenovirus serotipos 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Clostridium difficile</i> O27	<i>Giardia intestinalis</i> cepa WB clon C6	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotipo O1:K1
Coxsackievirus A24, A9 y B3	<i>Helicobacter heilmannii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 y O:9
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Helicobacter hepaticus</i>	

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella/EIEC kit para *Salmonella* se evaluó frente a DNA extraído de *Salmonella bongori* serotipo *Brookfield* (66:z41:-); *Salmonella enterica subsp. enterica* serotipo 4,5,12:i:1,2 serovar *Typhimurium*; *Salmonella enterica subsp. enterica* serovares *paratyphi A* y *B*; *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *enteritidis*; *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Typhi*; *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *pullorum*; *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *gallinarum* y *Salmonella enterica* serovar *tennessee* como referencias, mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella/EIEC kit para *Campylobacter* se evaluó frente a DNA extraído de *Campylobacter jejuni subsp. jejuni*; *Campylobacter upsaliensis*; *Campylobacter lari*; *Campylobacter fetus*; *Campylobacter coli* y *Campylobacter hyointestinalis* como referencias, mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella/EIEC kit para *Shigella/EIEC* se evaluó frente a DNA extraído de *Shigella dysenteriae* serotipo 1; *Shigella flexneri*; *Escherichia coli enteroinvasiva* como referencias, mostrando resultados positivos.

Termocicladores compatibles

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

- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Linear NEOS-96 Real Time PCR System

¹: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- La prueba es para uso profesional de diagnóstico *in vitro*. Esta prueba proporciona un diagnóstico preliminar de infección por *Campylobacter*, *Salmonella* y/o *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.
- 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 falsos positivos debido a la contaminación cruzada con los diferentes patógenos, ya sea por el gran número de copias de DNA molde que contiene cada vial *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* Positive Control, por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de 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/o 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 del genoma de los patógenos 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 qPCR 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 o tratar la infección por *Salmonella*, *Campylobacter* y/o *Shigella*/EIEC); g) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante.
- La detección del DNA bacteriano puede no indicar la presencia de bacterias viables y/o infecciosas o que estos patógenos sean los agentes causantes de los síntomas clínicos.
- Los resultados negativos no impiden la infección por *Salmonella*, *Campylobacter* y/o *Shigella*/EIEC y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras para la identificación de *Salmonella*, *Campylobacter* y/o *Shigella*/EIEC 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 los patógenos.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección por *Salmonella*,

Campylobacter y/o *Shigella*/EIEC, y se han descartado otras enfermedades gastrointestinales, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.

- 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.

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	Termocicladores con bloque de alto perfil
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Azure Biosystems	Agilent Technologies
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96	qTOWER
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	BIOER
Roche	QuantGene 9600
LightCycler®480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	Bio-Rad
LightCycler®96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	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⁾
Formatos especiales ⁽⁷⁾	DNA-Technology
Bio Molecular Systems	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Mic Real Time PCR Cycler	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Precision System Science Co., Ltd.	Qiagen
geneLEAD VIII System	QIAquant 96
Qiagen	
Rotor-Gene® Q	

- (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®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
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	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

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

Intended use

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

References

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

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

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S010/ 7042S010	<i>Campylobacter</i> + <i>Salmonella</i> + <i>Shigella</i> strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C010	<i>Campylobacter</i> + <i>Salmonella</i> + <i>Shigella</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 on 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 μ L, 20-200 μ L)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Campylobacter is 1 of 4 key global causes of diarrheal diseases. It is considered to be 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 on the basis of 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.

Shigella bacteria cause an infection called shigellosis. *Shigella* is a member of the Gram-negative *Enterobacteriaceae* family. Four species comprise the genus *Shigella*: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, and *S. sonnei*. *Shigella* species are so related to *Escherichia coli*. The differentiation of *Shigella* and *E. coli* is even more complicated with the description of *enteroinvasive E. coli* (EIEC). *Shigella* is very

contagious. People could get sick by touching surfaces contaminated with germs from stool from a sick person, eating food that was prepared by someone who is sick with shigellosis, swallowing recreational water and by exposure to feces through sexual contact.

Most people with *Shigella* infection have diarrhea (sometimes bloody), fever, and stomach cramps. Symptoms usually begin 1–2 days after infection and last 7 days. Most people recover without needing antibiotics. However, people with severe illness and those with underlying conditions that weaken the immune system should be given antibiotics. Some people with shigellosis will not have any symptoms. Possible complications from *Shigella* infections include post-infectious arthritis, bloodstream infections, seizures, and hemolytic-uremic syndrome.

Recent estimates attribute *Shigella* to cause ~125 million diarrhoeal episodes annually, leading to around 160000 deaths, with a third of these associated with young children. *Shigella*, along with enterotoxigenic *Escherichia coli* (*E. coli*), were identified as the predominant bacterial diarrhoeal pathogens in paediatric populations of South Asia and sub-Saharan Africa. CDC estimates about 450,000 cases of shigellosis occur in the United States every year, making it the third most common bacterial enteric disease. Shigellosis does not have a marked seasonality, likely reflecting the importance of person-to-person transmission.

Infection is diagnosed when a laboratory identifies *Shigella* in the stool (poop) of an ill person. The test could be a culture that isolates the bacteria or a rapid diagnostic test that detects genetic material of the bacteria. *Shigella* and EIEC could be separated from other *E. coli* by a PCR targeting the *ipaH*-gene.

Principle of the test

Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella*/EIEC 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* and/or *Shigella*/ enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) 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* + *Shigella*/EIEC 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 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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

Specimen collection, conservation, and transport should be maintained per the conditions validated by the user. Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella*/EIEC kit has been tested in human stool samples. Other sample types must be validated by the user.

Overall, clinical samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and be processed as soon as possible to guarantee the test 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 2h or at 2°C to 8°C for up to 24 hours and for long term transport (more than 24 hours), it is recommended 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 ideally at -80°C for conservation during a long time. 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, 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 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® RSC 16 instrument (Promega).

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

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

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* Positive Control (red tube) in the 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 extracted DNA, negative control (yellow tube) or 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 (*Shigella*/EIEC) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channels (See 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.

The threshold value may vary between different instruments due to different signal intensities. Use the positive control amplification curve as a starting point during the 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. 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 ≤40) for Cy5 (*Campylobacter*), FAM (*Salmonella*), ROX (*Shigella*/EIEC) and HEX (internal control), 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 channels, the signal absence (Ct >37 or no signal) in Cy5, and the signal presence (Ct ≤40) in HEX channel, which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is amplification signal in negative control and/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 ≤40) in positive 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:

<i>Campylobacter</i> (Cy5)	<i>Salmonella</i> (FAM)	<i>Shigella</i> /EIEC (ROX)	Internal Control (HEX)	Interpretation
- ¹	+	-	+/-*	<i>Salmonella</i> detected, <i>Shigella</i> /EIEC and <i>Campylobacter</i> not detected
- ¹	-	+	+/-*	<i>Shigella</i> /EIEC detected, <i>Salmonella</i> and <i>Campylobacter</i> not detected
+ ¹	-	-	+/-*	<i>Campylobacter</i> detected, <i>Salmonella</i> and <i>Shigella</i> /EIEC not detected
- ¹	+	+	+/-*	<i>Salmonella</i> and <i>Shigella</i> /EIEC detected, <i>Campylobacter</i> not detected
+ ¹	+	-	+/-*	<i>Salmonella</i> and <i>Campylobacter</i> detected, <i>Shigella</i> /EIEC not detected
+ ¹	-	+	+/-*	<i>Shigella</i> /EIEC and <i>Campylobacter</i> detected, <i>Salmonella</i> not detected
+ ¹	+	+	+/-*	All targets' DNA detected
- ¹	-	-	+ [#]	Targets' DNA not detected
- ¹	-	-	- [#]	Invalid

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

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

¹Note 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 Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

[#]In the case of *Salmonella*, *Campylobacter* and *Shigella*/EIEC target genes negative, 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 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. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

The clinical sensitivity and specificity of Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella*/EIEC was evaluated using 400 stool samples. The extraction was performed with the Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex), and the thermal cycler used was the AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies).

The results obtained with Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella*/EIEC were compared with the values obtained by the routine method (culture + MALDI-TOF). In case of negative results, conventional PCR and sequencing are performed to confirm the negative results and resolve discrepant results. The obtained results are shown in the following table:

Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<i>Campylobacter</i>	53	329	12	0	1 (0.93-1)	0.97(0.94-0.98)	1 (0.99-1)	0.82 (0.70-0.90)
<i>Salmonella</i>	22	377	0	1	0.96 (0.78-0.99)	1 (0.99-1)	1 (0.99-1)	1 (0.85-1)
<i>Shigella</i> /EIEC	2	398	0	0	1 (0.16-1)	1 (0.99-1)	1 (0.16-1)	1 (0.99-1)

TP = True Positive, TN = True Negative, FP = False Positive, FN = False Negative, SE = Sensibility, SP = Specificity, PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value.

These results show a high agreement to detect *Campylobacter*, *Salmonella* and/or *Shigella* / EIEC using Vitassay qPCR *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella*/EIEC kit.

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/reaction. This assay has a detection limit of 10 DNA copies per reaction for *Salmonella* and for *Shigella*/EIEC, and 50 DNA copies per reaction for *Campylobacter*, with a positive rate of $\geq 95\%$.

Analytical specificity

The analytical specificity for *Campylobacter*, *Salmonella* and/or *Shigella*/EIEC detection was tested within the panel of different microorganisms. No cross-reactivity was observed between any of the species:

Cross-reactivity assay		
Sapovirus	<i>Cryptosporidium hominis</i>	<i>Helicobacter pylori</i> J99
<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Dientamoeba fragilis</i>	Human Rotavirus A
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> .	Echovirus 30	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	<i>Entamoeba dispar</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2c
Astrovirus genotypes 1-8	<i>Entamoeba histolytica</i> strain DS4-868	Norovirus genotypes I and II.4
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Blastocystis hominis</i>	Enterovirus 68 and 71	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Candida albicans</i>	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	Adenovirus serotypes 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41
<i>Citrobacter freundii</i>	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Clostridium difficile</i> O27	<i>Giardia intestinalis</i> strain WB clone C6	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O1:K1
Coxsackievirus A24, A9 and B3	<i>Helicobacter heilmannii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 and O:9
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Helicobacter hepaticus</i>	

Analytical reactivity

The Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella/EIEC kit's reactivity for *Salmonella* was evaluated against DNA extracted from *Salmonella bongori* serotype Brookfield (66:z41:-); *Salmonella enterica subsp. enterica* serotype 4,5,12:i:1,2 serovar Typhimurium; *Salmonella enterica subsp. enterica* serovars paratyphi A and B; *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar enteritidis; *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar typhi; *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar pullorum; *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar gallinarum and *Salmonella enterica* serovar tennessee as templates, showing positive results.

The Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella/EIEC kit's reactivity for *Campylobacter* was evaluated against DNA extracted from *Campylobacter jejuni subsp. jejuni*; *Campylobacter upsaliensis*; *Campylobacter lari*; *Campylobacter fetus*; *Campylobacter coli* and *Campylobacter hyointestinalis* as templates, showing positive results.

The Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella/EIEC kit's reactivity for *Shigella/EIEC* was evaluated against DNA extracted from *Shigella dysenteriae* serotype 1; *Shigella flexneri* and enteroinvasive *Escherichia coli* as templates, showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Campylobacter + Salmonella + Shigella/EIEC has been validated on the following equipment:

- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Linear NEOS-96 Real Time PCR System

¹: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- The test is for professional *in vitro* diagnostic use. This test provides a presumptive diagnosis of *Campylobacter*, *Salmonella* and/or *Shigella/EIEC* infection. All obtained results must be interpreted by a specialist together with other clinical information and laboratory findings available.

- This assay was tried with human faecal samples. The use of other samples has not been established.
- The test quality depends on the sample's quality; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This is a qualitative test.
- 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 by high number of DNA template copies which contains each *Campylobacter* + *Salmonella* + *Shigella* Positive Control vial, samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to 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, and/or 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 pathogens genome 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 qPCR inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent or treat *Salmonella*, *Campylobacter* and/or *Shigella*/EIEC infection was not performed); g) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures.
- Detection of bacterial DNA may not indicate the presence of viable and/or infectious bacteria or that these pathogens are the causative agents for clinical symptoms.
- Negative results do not preclude *Salmonella*, *Campylobacter* and/or *Shigella*/EIEC infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Specimen types for the *Salmonella*, *Campylobacter* and/or *Shigella*/EIEC identification 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.
- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible *Salmonella*, *Campylobacter* and/or *Shigella*/EIEC infection, and other gastrointestinal illnesses have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type and its previous treatment, among others.

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	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Azure Biosystems	Agilent Technologies
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96	qTOWER
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	BIOER
Roche	QuantGene 9600
LightCycler®480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	Bio-Rad
LightCycler®96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	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⁾
Special Formats ⁽⁷⁾	DNA-Technology
Bio Molecular Systems	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Mic Real Time PCR Cycler	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Precision System Science Co., Ltd.	Qiagen
geneLEAD VIII System	QIAquant 96
Qiagen	
Rotor-Gene® Q	

- (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"
	HEX	Yellow	

	ROX	Orange	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".
	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	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

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










Bibliography/Bibliografía

1. 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. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Shigella-Shigellosis*. Available from: <https://www.cdc.gov/shigella/> Accessed March 2022
8. Baker S, The HC. (2018). Recent insights into *Shigella*. Curr Opin Infect Dis. Oct;31(5):449-454.
9. Lampel KA, Formal SB, Maurelli AT. (2018). A Brief History of *Shigella*. EcoSal Plus. Jan;8(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2017.
10. Van den Beld MJ, Reubsat FA. (2012). Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Jun;31(6):899-904.

Trademarks

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

Symbols for 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

