Vitassay qPCR

E. coli pathotypes

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

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

Vitassay

CE IVD

ES EN

ES

Uso previsto

Vitassay qPCR E. coli pathotypes permite la identificación y diferenciación específica de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC), *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)/*Shigella* en muestras de heces humanas procedentes de pacientes con sospecha de infección gastrointestinal. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones causadas por *Escherichia coli*, junto con los datos clínicos del paciente y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

Referencias

Vitassay qPCR E. coli pathotypes 8x8-well strip, low profile	7041064
Vitassay qPCR E. coli pathotypes 8x8-well strip, high profile	7042064

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S064A/ 7042S064A	EHEC, EPEC & EIEC strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7041S064B/ 7042S064B	ETEC + EIEC strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C064	*E. coli* pathotypes 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	-	8 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40ºC hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20ºC. 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

- 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

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria anaerobia facultativa, Gramnegativa, miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. Es el microrganismo que más frecuentemente se encuentra en el tracto gastrointestinal humano y de los animales de sangre caliente, así como uno de sus patógenos más importantes. La bacteria es capaz de crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, lo que la convierte en un importante organismo para su uso en biotecnología. El nicho de *E. coli* comensal es la capa mucosa del colon de los mamíferos.

Estas cepas de *E. coli* comensales causan enfermedades cuando el huésped está inmunodeprimido o cuando las barreras gastrointestinales normales se ven afectadas. Es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en lactantes y niños pequeños. La infección por uno de sus patotipos puede provocar: enfermedad entérica/diarreica, infecciones del tracto urinario (ITU) y sepsis/meningitis.

Las principales categorías de cepas de *E. coli* diarreicas son *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

- EPEC fue el primer patotipo de *E. coli* que se describió. Estas cepas causan diarrea principalmente en niños, sobre todo en condiciones de poca higiene, así como en animales. Clínicamente, la enfermedad por EPEC se caracteriza por diarrea aguda, fiebre, malestar y vómitos.
- Las ETEC son los patógenos más comunes que causan la diarrea del viajero con diarrea acuosa que puede ser leve o severa, en humanos de todas las edades. También es la causa más común de enfermedad diarreica en los militares situados en zonas endémicas. Algunos de los síntomas de la infección son vómitos, ausencia de deshidratación o deshidratación leve, heces acuosas y fiebre.
- La EIEC es causa frecuente de diarrea acuosa y ocasionalmente de disentería tanto en niños como en adultos. Las cepas de EIEC están estrechamente

relacionadas con *Shigella* spp. EIEC tiene características similares a las de *Shigella* (y a veces serotipos similares) con menor virulencia y requiere una mayor dosis infecciosa. Los síntomas son muy similares a los de la shigelosis, como diarrea severa con sangre y mucosa, fiebre y calambres abdominales.

- La EHEC es un patógeno típicamente alimentario que causa colitis hemorrágica o síndrome urémico hemorrágico (SUH). Las cepas de EHEC producen toxinas similares a las de Shiga (denominadas E. *coli* productora de toxina Shiga, STEC), similares a las producidas por *Shigella dysenteriae,* lo que las convierte en las *E. coli* diarreicas más virulentas conocidas hasta la fecha. Los síntomas del SUH son la insuficiencia renal aguda, la trombocitopenia y la anemia hemolítica microangiopática, que se produce en el 2-15% de los casos. La mortalidad del SUH es elevada (3-17%) y muchos pacientes se quedan con discapacidad permanente, insuficiencia renal crónica, hipertensión y déficits neurológicos.

En la actualidad, la resistencia a los antibióticos es un problema sanitario mundial importante y creciente. La mayoría de las bacterias han evolucionado y transmitido su resistencia a otras especies. El consumo excesivo de antibióticos y su uso inadecuado son algunos de los factores que han acelerado este fenómeno. En Europa, la resistencia en las bacterias Gram negativas va en aumento, sobre todo en *E. coli*, lo que dificulta el tratamiento de algunas infecciones graves.

Principio del test

Vitassay qPCR E. coli pathotypes se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de los genes *stx1, stx2, eae, It, st1a, st1b e ipaH* para *E.coli* EHEC*, E.coli* EPEC*, E. coli* EIEC/*Shigella y E. coli* ETEC. Tras la extracción de los ácidos nucleicos, la presencia de los patógenos se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

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

Vitassay qPCR E. coli pathotypes, 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. Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la

detección de *E. coli* EHEC, EPEC y EIEC/*Shigella*. Tras la reacción de amplificación, los genes *stx1* y *stx2* se detecta en el canal FAM, el gen *IpaH* se detecta en el canal ROX, el gen *eae* se detecta en Cy5 y el Control Interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado). La segunda tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *E. coli* ETEC y EIEC/*Shigella*. Tras la reacción de amplificación el gen *It* se detecta en el canal FAM, el gen *IpaH* es detectado en el canal ROX, los genes *st1a y st1b* son detectados en el canal Cy5 y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Asegurarse de utilizar un pocillo para la determinación de *E. coli* EHEC, STEC, EPEC y EIEC/*Shigella*, y otro pocillo para la determinación de *E. coli* ETEC y EIEC/*Shigella*. Preste atención para no mezclarlos durante todo el proceso.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de DNA.

Vitassay qPCR E. coli pathotypes ha sido testado en muestras de heces humanas. Otros tipos de muestras deben ser validados por el usuario.

En general, las muestras se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios, 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.

Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, pueden congelarse a -20ºC. En este caso, para poder utilizar las muestras en la prueba deben descongelarse totalmente hasta alcanzar la temperatura ambiente y homogeneizarse vigorosamente. Los ciclos de congelación y descongelación deben ser evitados.

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

- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek Molecular).
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del *E. coli* pathotypes Positive Control (tubo rojo) con 200 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 -20ºC.

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 para cada uno de los ensayos).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.

- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (genes *stx1*, *stx2* y *It*), ROX (gen *ipaH*), HEX, JOE o VIC (Control Interno), y Cy5 (genes *eae* y *st1a* y *st1b*). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

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

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

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación (Ct ≤40) en los canales FAM, ROX, y Cy5.

Control negativo

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

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

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

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

Interpretación de resultados para EHEC, EPEC & EIEC 8-well strips:

EHEC, EPEC & EIEC				Interpretación
Genes *stx1*/*stx2* (FAM)	**Gen *eae* (Cy5)**	**Gen *ipaH* (ROX)**	**Control Interno (HEX)**	
+	+	-	+/-[1]	**EHEC detectado**
+	-	-	+/-[1]	**STEC (EHEC) detectado**
-	+	-	+/-[1]	**EPEC detectado**
-	-	+	+/-[1]	**EIEC/*Shigella* detectado[3]**
+	-	+	+/-[1]	***Shigella dysenteriae* Tipo 1 detectado[3]**
-	-	-	+[2]	**DNA molde diana no Detectado[2]**
-	-	-	-[2]	**Test fallido[2]**

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40)
Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct >40 o no señal)

Interpretación de resultados para ETEC + EIEC 8-well strips:

ETEC + EIEC				Interpretación
Gen *It* (FAM)	Genes *st1a*/*st1b* (Cy5)	Gen *ipaH* (ROX)	Control Interno (HEX)	
+	+	-	+/-[1]	**ETEC detectado**
+	-	-	+/-[1]	**ETEC detectado**
-	+	-	+/-[1]	**ETEC detectado**
-	-	+	+/-[1]	**EIEC/*Shigella* detectado[3]**
-	-	-	+[2]	**DNA molde diana no Detectado[2]**
-	-	-	-[2]	**Test fallido[2]**

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40)
Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct >40 o no señal)

[1] En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal).

[2] En el caso de que la detección de las regiones diana de *E. coli* resulte negativa, 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 "invalido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

[3] Si una muestra de paciente presenta una curva de amplificación para el gen *ipaH* (*Shigella*) en el canal ROX en las mezclas de reacción EHEC, EPEC & EIEC y/o ETEC + EIEC se considerarán positivas para *Shigella*/EIEC. Además, si la muestra positiva de *Shigella* (canal ROX, gen *ipaH*) también es positiva en FAM en la mezcla de reacción EHEC, EPEC & EIEC (genes stx1/stx2), *Shigella* se subtipará como *Shigella dysenteriae* tipo 1.

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

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

Control de Calidad

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

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

En un estudio realizado en las instalaciones de la empresa se analizaron 25 muestras fecales de pacientes sintomáticos y con sospecha clínica de infección por *E. coli*, con la mezcla de reacción EHEC, EPEC & EIEC. Los resultados obtenidos se confirmaron los resultados del kit comercial RIDA®GENE EHEC/EPEC PCR multiplex en tiempo real (R-biopharm) y se muestran a continuación:

- 6 muestras positivas para STEC
- 1 muestra positiva para *Shigella dysenteriae* Tipo 1
- 2 muestras para EHEC
- 4 muestras para EPEC

En otro estudio, también realizado en las instalaciones de la empresa, se analizaron 87 muestras fecales de pacientes, con la mezcla de reacción ETEC + EIEC. Los resultados obtenidos se confirmaron con los resultados del kit comercial RIDA®GENE ETEC/EIEC PCR multiplex en tiempo real (R-biopharm) y se muestran a continuación:

- 2 muestras positivas para ETEC
- 5 muestras positivas para EIEC/Shigella

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares 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 los genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ipaH*, *It*, *st1a* y *st1b*.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de las variantes patógenas *de Escherichia coli* fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre casi ninguna de las especies, excepto los patógenos diana de cada ensayo:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada					
Helicobacter pylori	-	*Campylobacter coli*	-	*Candida albicans*	-
Helicobacter hepaticus	-	*Campylobacter jejuni subsp. jejuni*	-	*Arcobacter butzleri*	-
Helicobacter cinaedi	-	*Campylobacter upsaliensis*	-	*Pseudomonas aeruginosa*	-
Helicobacter heilmannii	-	*Proteus vulgaris*	-	*Enterococcus faecalis*	-
Shigella flexneri	-/+	*Citrobacter freundii*	-	*Yersinia enterocolitica* O:3	-
Shigella dysenteriae	-/+	*Staphylococcus aureus subsp. aureus*	-	*Yersinia enterocolitica* O:9	-
Salmonella typhi	-	*Serratia liquefaciens*	-	*Bacteroides fragilis*	-
Salmonella paratyphi A	-	*Listeria monocytogenes*	-	Adenovirus serotipos 40/41	-
Salmonella paratyphi B	-	*Clostridium difficile*	-	Rotavirus A	-
Salmonella typhimurium	-	*Clostridium perfringens*	-	Norovirus Genotipos I and II	-
Salmonella bongori	-	*Escherichia coli Enterotoxigénica*	-/+	Astrovirus Genotipos I-VIII	-
Salmonella enteritidis	-	*Blastocystis hominis*	-	Sapovirus	-
Salmonella enterica subsp. enterica	-	*Escherichia coli Enterohemorrágica*	-/+	*Entamoeba histolytica*	-
Salmonella pullorum	-	*Klebsiella oxytoca*	-	*Entamoeba dispar*	-
Salmonella gallinarum	-	*Vibrio parahaemolyticus*	-	*Cryptosporidium parvum/hominis*	-
Campylobacter lari	-	*Aeromonas caviae*	-	*Giardia intestinalis*	-
Campylobacter fetus	-	*Aeromonas hydrophila subsp. Hydrophila*	-	*Dientamoba fragilis*	-

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR E. coli pathotypes se evaluó frente a las cepas de *E. coli* de cada patotipo, y frente a diferentes especies de *Shigella* que contenían los siguientes factores de virulencia: genes *stx1* y/o *stx2* y *eae* (EHEC), genes *stx1* y/o *stx2* (STEC), gen *eae* (EPEC), genes *It* y/o *st1a* y/o *st1b* (ETEC) y gen *ipaH* (EIEC, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S.sonnei* y *S. boydii*), mostrando resultados positivos.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR E. coli pathotypes ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) [I]
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)

[l]: 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

- Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido validado con DNA extraído de muestras 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.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada ya sea con *E. coli* pathotypes 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.

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

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

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System (1) (2)
7500 Fast Dx Real-Time PCR System (1) (2)
QuantStudio™12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System (3)
StepOne Plus™ Real-Time PCR System (3)
StepOne™ Real-Time PCR System (4)
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems
Azure Cielo 3 (5)
Azure Cielo 6
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System (5)
Roche
LightCycler ®480 Real-Time PCR System (1) (6)
LightCycler ®96 Real-Time PCR System (1)
Cobas z480 Analyzer (1) (6)

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

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

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

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

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

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96 ™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480 II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para “Temperature Control” (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú “Run Profile”). Seleccionar “Acquire on” para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana “Cycling”). Utilice los valores del “Gain” por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquaring". 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 Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

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

Intended use

Vitassay qPCR E. coli pathotypes allows the specific identification and differentiation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), Enterotoxigenic *Escherichia c*oli (ETEC) and Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)/Shigella in human stool samples from patients with suspected gastrointestinal infection. This product is intended to aid in the diagnosis of *Escherichia coli* infections, alongside the patient's clinical data and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR E. coli pathotypes 8x8-well strip, low profile	7041064
Vitassay qPCR E. coli pathotypes 8x8-well strip, high profile	7042064

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S064A/ 7042S064A	EHEC, EPEC & EIEC strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7041S064B/ 7042S064B	ETEC + EIEC strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C064	*E. coli* pathotypes 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	-	8 x 8-cap strip

Transport and storage

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

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

Summary

Escherichia coli (*E. coli*) is a facultative anaerobic Gram-negative bacteria member of the bacterial family of *Enterobacteriaceae*. It is the most prevalent commensal inhabitant in human gastrointestinal tract and warm-blooded animals, as well as one of the most important pathogens. The bacterium is able to grow under both aerobic and anaerobic condition, making it an important host organism in biotechnology. The niche of commensal *E. coli* is the mucous layer of the mammalian colon.

This commensal *E. coli* strains cause disease when the host is immunocompromised or where the normal gastrointestinal barriers are breached. It is a major cause of morbidity and mortality in infants and young children. Three general clinical syndromes can result from infection with one of these pathotypes: enteric/diarrheal disease, urinary tract infections (UTIs) and sepsis/meningitis.

The major categories of diarrheagenic *E. coli* strains include enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) and enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC).

- EPEC was the first pathotype of *E. coli* to be described. These strains cause diarrhea primarily in children, particularly under conditions of poor hygiene, as well as in animals. Clinically, EPEC illness is characterized by acute diarrhea, fever, malaise, and vomiting.
- ETEC are the most common pathogens causing travelers' diarrhea with mild to severe watery diarrhea in humans of all ages. It is also the most common causes of diarrheal illness in military deployed to endemic areas. Some of the symptoms of infection include vomiting, none or mild dehydration, watery stool, and fever.
- EIEC is frequently cause of watery diarrhea and occasionally dysentery in both children and adults. EIEC strains are closely related to *Shigella* spp. EIEC has similar characteristics to *Shigella* (and sometimes similar serotypes) with a milder virulence and a higher infectious dose required. The symptoms are very similar to shigellosis, such as severe bloody, mucous diarrhea, fever, and abdominal cramps.

- EHEC is a typically food-born pathogen causing hemorrhagic colitis or hemorrhagic uremic syndrome (HUS). EHEC strains produce Shiga-like toxins (named Shiga toxin product *E. coli*, STEC) similar to those produced by *Shigella dysenteriae* making them the most virulent diarrhoeagenic *E. coli* known to date. HUS symptoms are acute renal failure, thrombocytopenia, and microangiopathic hemolytic anemia, which occurs in 2-15% of cases. Mortality from HUS is high (3-17% and a significant number suffer a range of permanent disabilities, including chronic renal insufficiency, hypertension, and neurological deficits.

Nowadays, antimicrobial resistance is a major and increasing global healthcare problem. Most of bacteria have evolved and transmitted antimicrobial resistance to other species. The excessive consumption of antibiotics and the inappropriate use are among factors which further accelerated this phenomenon. In Europe, antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria is on the rise, particularly in *E. coli*, making difficult the treatment of several serious infections.

Principle of the test

Vitassay qPCR E. coli pathotypes is based on the real-time amplification of a conserved region of *stx1, stx2, eae, It, st1a, st1b* e *ipaH* genes for *E. coli* EHEC, *E. coli* EPEC, *E. coli* EIEC/Shigella and *E. coli* ETEC. After nucleic acid isolation, the pathogens presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

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

Vitassay qPCR E. coli pathotypes is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible inhibition reaction. Each kit includes two kind of strips and each one corresponds to one different assay. The first strip contains the multiplex reaction mix for the detection of *E. coli* EHEC, EPEC and EIEC/*Shigella*. After the amplification reaction, *stx1* and *stx2* genes are detected in FAM channel, the *ipaH* gene is detected in ROX channel, *eae* gene is detected in Cy5 channel and the Internal Control (IC) is detected in HEX, VIC, or JOE channels (depending on the equipment used). The second strip contains the multiplex reaction mix for the detection of E. coli ETEC and EIEC/Shigella. After the amplification reaction, *It* gene is detected in FAM channel, *ipaH* gene is detected in ROX channel, *st1a* and *st1b* genes are detected in Cy5

channel and the Internal Control (IC) is detected in HEX, VIC, or JOE channels (depending on the equipment used).

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Make sure to use a well for determining *E. coli* EHEC, STEC, EPEC, and EIEC/Shigella and another well for determining *E. coli* ETEC and EIEC/Shigella. Be careful not to mix them throughout the process.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, processing, and DNA extraction

The Vitassay qPCR E. coli pathotypes has been tested in human stool samples. Other sample types must be validated by the user.

Overall, samples should be collected and labelled appropriately in clean containers 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.

To preserve samples for a long time, we recommend freeze at -20°C. The samples must be fully thawed to room temperature and homogenized thoroughly before they can be used in the test. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

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:

- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek Molecular).
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized E. coli pathotypes Positive Control (red tube) with 200 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 -20ºC.

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 for each assay.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative (yellow tube) or positive (red tube) controls and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (*stx1*, *stx2* and *It* genes), ROX (*ipaH* gene), HEX, JOE or VIC (Internal Control), and Cy5 (*eae* and *st1a* and *st1b* genes). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none (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.

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) in FAM, ROX, and Cy5 channels, which validates the reaction.

Negative control

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

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

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

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

Results' interpretation for EHEC, EPEC & EIEC 8-well strips:

EHEC, EPEC & EIEC				Interpretation
stx1/*stx2* genes (FAM)	*eae* gene (Cy5)	*ipaH* gene (ROX)	Internal Control (HEX)	
+	+	-	+/-[1]	**EHEC detected**
+	-	-	+/-[1]	**STEC (EHEC) detected**
-	+	-	+/-[1]	**EPEC detected**
-	-	+	+/-[1]	**EIEC/*Shigella* detected[3]**
+	-	+	+/-[1]	***Shigella dysenteriae* Type 1 detected[3]**
-	-	-	+[2]	**Targets not Detected[2]**
-	-	-	-[2]	**Test failure[2]**

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤40)
(-) Negative: No amplification signal (Ct >40 or no signal)

Results' interpretation for ETEC + EIEC 8-well strips:

ETEC + EIEC				Interpretation
lt gene (FAM)	*st1a*/*st1b* genes (Cy5)	*ipaH* gene (ROX)	Internal Control (HEX)	
+	+	-	+/-[1]	**ETEC detected**
+	-	-	+/-[1]	**ETEC detected**
-	+	-	+/-[1]	**ETEC detected**
-	-	+	+/-[1]	**EIEC/*Shigella* detected[3]**
-	-	-	+[2]	**Targets not Detected[2]**
-	-	-	-[2]	**Test failure[2]**

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤40)
(-) Negative: No amplification signal (Ct >40 or no signal)

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

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

[3] If a patient sample presents an amplification curve for *ipaH* gene (*Shigella*) in ROX channel in EHEC, EPEC & EIEC and/or ETEC + EIEC reaction mixes, it will be considered positive for *Shigella*/EIEC. In addition, if the *Shigella* positive sample (ROX channel, *ipaH* gene) is also FAM positive in EHEC, EPEC & EIEC reaction mix (*stx1*/*stx2* genes), *Shigella* will be subtyping as *Shigella dysenteriae* type 1.

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

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

Quality Control

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

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

In one study performed at company facilities, 25 fecal samples from symptomatic patients with clinical suspicion of *E. coli* infection were analyzed with the EHEC, EPEC & EIEC reaction mix. The obtained results were confirmed with that obtained by the commercial RIDA®GENE EHEC/EPEC Real-Time multiplex PCR kit (R-Biopharm) and are shown below:

- 6 positive samples for STEC
- 1 positive sample for *Shigella dysenteriae* Type 1
- 2 positive samples for EHEC
- 4 positive samples for EPEC

In another study also performed at company facilities, 87 fecal samples from patients were analyzed with the ETEC + EIEC reaction mix. The obtained results were confirmed

with that obtained by the commercial RIDA®GENE ETEC/EIEC Real-Time multiplex PCR kit (R-Biopharm) and are shown below:

- 2 positive samples for ETEC
- 5 positive samples for EIEC/Shigella

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of standards from the pathogens ranging from 10^7 to 10^1 copies/reaction. This assay has a detection limit of ≥10 DNA copies per reaction for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ipaH*, *It*, *st1a* and *st1b* genes.

Analytical specificity

The analytical specificity for the *Escherichia coli* pathogen variants detection was tested within a panel consisting of the following different microorganisms, where no cross-reactivity was observed between almost any of the species except the targeted pathogens of each assay:

Cross-reactivity testing					
Helicobacter pylori	-	*Campylobacter coli*	-	*Candida albicans*	-
Helicobacter hepaticus	-	*Campylobacter jejuni subsp. jejuni*	-	*Arcobacter butzleri*	-
Helicobacter cinaedi	-	*Campylobacter upsaliensis*	-	*Pseudomonas aeruginosa*	-
Helicobacter heilmannii	-	*Proteus vulgaris*	-	*Enterococcus faecalis*	-
Shigella flexneri	-/+	*Citrobacter freundii*	-	*Yersinia enterocolitica* O:3	-
Shigella dysenteriae	-/+	*Staphylococcus aureus subsp. aureus*	-	*Yersinia enterocolitica* O:9	-
Salmonella typhi	-	*Serratia liquefaciens*	-	*Bacteroides fragilis*	-
Salmonella paratyphi A	-	*Listeria monocytogenes*	-	Adenovirus serotypes 40/41	-
Salmonella paratyphi B	-	*Clostridium difficile*	-	Rotavirus A	-
Salmonella typhimurium	-	*Clostridium perfringens*	-	Norovirus Genotypes I and II	-
Salmonella bongori	-	*Escherichia coli Enterotoxigénica*	-/+	Astrovirus Genotypes I-VIII	-
Salmonella enteritidis	-	*Blastocystis hominis*	-	Sapovirus	-
Salmonella enterica subsp. enterica	-	*Escherichia coli Enterohemorrágica*	-/+	*Entamoeba histolytica*	-
Salmonella pullorum	-	*Klebsiella oxytoca*	-	*Entamoeba dispar*	-
Salmonella gallinarum	-	*Vibrio parahaemolyticus*	-	*Cryptosporidium parvum/hominis*	-
Campylobacter lari	-	*Aeromonas caviae*	-	*Giardia intestinalis*	-
Campylobacter fetus	-	*Aeromonas hydrophila subsp. Hydrophila*	-	*Dientamoba fragilis*	-

Analytical reactivity

The Vitassay qPCR E. coli pathotypes reactivity was evaluated against *E. coli* strains of each pathotype and different *Shigella* species which contain the following virulence factors: *stx1* and/or *stx2* and *eae* genes (EHEC), *stx1* and/or *stx2* genes (STEC), *eae* gene (EPEC), *It* and/or *st1a* and/or *st1b* genes (ETEC) and *ipaH* gene (EIEC, *S*. *dysenteriae*, *S*. *frexneri*, *S*. *sonnei* and *S*. *boydii*), showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR E. coli pathotypes has been validated on the following equipment:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) [l]
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)

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

Limitations

- All obtained results must be interpreted by a specialist together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay has been validated with DNA extracted from human fecal 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.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination either by *E. coli* pathotypes Positive Control, by 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, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System (1) (2)
7500 Fast Dx Real-Time PCR System (1) (2)
QuantStudio™12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System (3)
StepOne Plus™ Real-Time PCR System (3)
StepOne™ Real-Time PCR System (4)
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems
Azure Cielo 3 (5)
Azure Cielo 6
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System (5)
Roche
LightCycler ®480 Real-Time PCR System (1) (6)
LightCycler ®96 Real-Time PCR System (1)
Cobas z480 Analyzer (1) (6)

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

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

(1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.

(2) Select Ramp Speed “Standard”.

(3) No ROX caption.

(4) No Cy5 caption.

(5) Only FAM and HEX caption.

(6) Specific compensation color is required.

(7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.

(8) See Attached III to configure exposure settings.

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

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

Thermocycler	Vitassay Channel	Detection Channel	Observations
Bio-Rad CFX96 ™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	In the “Run Profile” menu, introduce the correct parameters for “Temperature Control” (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the thermal profile. In the “Cycling” window, select the “Acquire on” option for all the channels by clicking on them. Use the default “Gain” values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquaring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III. Optical measurement exposure setting

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

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	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

- Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF and Di Ilio, Carminie. (2013). Escherichia coli in Europe: An Overview. International journal of environmental research and public health. 10(12), 6235-6254.
- Belotserkovsky I and Sansonetti PJ. (2018). Shigella and Enteroinvasive Escherichia Coli. Current topics in microbiology and immunology. 416:1-16.
- Chen HD and Frankel G. (2005). Enteropathogenic Escherichia coli: unravelling pathogenesis. FEMS microbiology reviews. 29(1):83-98.
- Fleckenstein JM and Kuhlmann FM. (2019). Enterotoxigenic Escherichia coli Infections. Current infectious disease reports. 21(3):9.
- Gomes T A, Elias WP, Scaletsky IC, Guth BE, Rodrigues JF, Piazza RM, Ferreira LC, and Martinez MB. (2016). Diarrheagenic Escherichia coli. Brazilian journal of microbiology.Brazilian Society for Microbiology. 47(Suppl 1):3–30.
- Kaper JB, Nataro JP and Mobley HL. (2004). Pathogenic Escherichia coli. Nature reviews. Microbiology. 2(2):123-140.
- Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS and Sack RB. (2005). Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clinical microbiology reviews. 18(3):465-483.
- Welinder-Olsson C and Kaijser B. (2005). Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC). Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 37(6-7):405-416.

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

IVD	Producto para diagnóstico *in vitro* 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
LOT	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
		REF	Número de referencia Catalogue number

Vitassay

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