VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest BIOTEC

S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-SLE106L
VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-SLE106H
VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-SLE112L
VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-SLE112H
VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-SLE113L
VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-SLE113H

For information purposes only

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* and/or *Escherichia coli* in cerebrospinal fluid, blood or culture samples from patients with signs and symptoms of neonatal meningitis. This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* and/or *E. coli* in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using fluorescent reporter dye probes specific for *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* and *E. coli.*

2. Summary and Explanation

Bacterial meningitis is one type of serious bacterial infection (SBI) in neonates (0 to 28 days old) and young infants (29 to 90 days old). The most common causative organism was group B streptococcus, followed by *Escherichia coli* and then *Listeria monocytogenes.*

Streptococcus agalactiae, or group B Streptococcus (GBS), is an important pathogen causing invasive infections in neonates and infants. GBS infections in young infants are usually divided into early-onset disease (EOD, 0-6 days old) and late-onset disease (LOD, 7-89 days old). While there was a satisfactory reduction in EOD, the disease burden of LOD remained substantially high. There are ten known serotypes of GBS: Ia, Ib, and II-IX. They have distinct capsular polysaccharide structure, an important virulence factor causing human diseases. Although neonatal GBS infection is closely related to the maternal genital colonization, previous studies have observed a very different distribution of serotypes and phylogenetic lineages between invasive neonatal disease and maternal colonization. Overall, serotype III caused approximately half of the infections, but serotype Ia predominated in patients younger than 72 h old.

Listeria monocytogenes a gram-positive bacterium and a member of the genus *Listeria*, is a ubiquitous and intracellular pathogen responsible for listeriosis, a fatal disease exhibiting the symptoms of abortion, neonatal death, septicemia, and meningitis. Infection with *Listeria monocytogenes* during pregnancy is associated with miscarriage, preterm birth, and neonatal complications, including sepsis and meningitis. Inflammation of fetal membranes and placental villitis are noted in these cases , but the actual course of events at the maternal-fetal interface that cause fetal demise are poorly understood.

Escherichia coli frequently causes septicemia and meningitis. However, at present, the pathogenesis of meningitis caused by *E. coli* is only partially understood for two reasons: i) this infectious disease is a complex process formed by multiple bacterial-host interactions, and ii) the high genetic diversity of the pathotypes among neonatal meningitis *E. coli* (NMEC) strains. It is known that there are a few features that distinguish these strains. NMEC strains are part of the extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) subgroup, most of which belong to phylogroup B22 and the sequence type (ST) 95 complex. One of the most common serotypes is O18:K1:H7 to which two of the representative NMEC strains belong, C5 and RS218. The K1 capsular antigen has frequently been detected

For information purposes only

among isolates causing septicemia and is also presented by approximately 80% of *E. coli* strains causing neonatal meningitis.

To shorten detection time and improve sensitivity, real-time PCR assays have proven to be a tool for the detection of *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*.

3. Principle of the procedure

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* and/or *E. coli* in clinical samples. After DNA isolation, the identification of *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* and *E. coli* is performed by the amplification of a conserved region of the *cfb* gene for *Streptococcus agalactiae*, *hlyA* gene for *Listeria monocytogenes* and 16S rRNA gene for *Escherichia coli*, using specific primers and a fluorescent–labelled probe.

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit is based on the 5´ exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bounded to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence can be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. *Streptococcus agalactiae* DNA targets are amplified and detected in the FAM channel, *Listeria monocytogenes* DNA targets are amplified and detected in the ROX channel, *Escherichia coli* DNA targets are amplified and detected in the Cy5 channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

For information purposes only

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-SLE1SL/ VS-SLE1SH	*S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-SLE1C	*S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-SLE106L, VS-SLE106H, VS-SLE112L and VS-SLE112H.

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-SLE1PL/ VS-SLE1PH	*S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-SLE1C	*S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-SLE113L and VS-SLE113H.

For information purposes only

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler) (to check compatibility see Annex I).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes.
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40ºC until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20ºC. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use past expiration date.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different kits and/or lots.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

8. Test procedure

8.1. DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in "the instructions for use" of the extraction kit used.

For DNA extraction from clinical specimens or culture samples, you can use your manual or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer´s instructions. We have validated the following extraction kits:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- NucleoMag® Pathogen (Macherey Nagel).
- NucleoSpin RNA Virus (Macherey Nagel).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

For information purposes only

- Maxwell® RSC Blood DNA kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.)
- NX-48 Urine/Swab DNA Kit using the Nextractor® NX-48 system, (Genolution).

8.2. Lyophilized positive control

S. agalactiae, *L. monocytogenes* & *E. coli* Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* & *E. coli* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNAse/DNAse free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20ºC. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

8.3. PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* & *E. coli* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps. Centrifuge briefly.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

3) Set up your thermocycler..

Program your thermocycler following the conditions listed below and start the run:

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

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*S. agalactiae*), ROX (*L. monocytogenes*), Cy5 (*E. coli*) and HEX, JOE or VIC channels (CI). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for ROX is none. In the

For information purposes only

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* & *E. coli* in the positive control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer´s instructions.

Using the following table read and analyze the results:

S. agalactiae (FAM)	*L. monocytogenes* (ROX)	*E. coli* (Cy5)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	***S. agalactiae, L. monocytogenes* and *E. coli* Positive**
-	-	-	+	-	+	***S. agalactiae, L. monocytogenes* and *E. coli* Negative**
+	-	-	+/-	-	+	***S. agalactiae* Positive, *L. monocytogenes* and *E. coli* Negative**
+	+	-	+/-	-	+	***S. agalactiae* and *L. monocytogenes* Positive, and *E. coli* Negative**
+	-	+	+/-	-	+	***S. agalactiae* and *E. coli* Positive, and *L. monocytogenes* Negative**
-	+	-	+/-	-	+	***L. monocytogenes* Positive, *S. agalactiae* and *E. coli* Negative**
-	+	+	+/-	-	+	***L. monocytogenes* and *E. coli* Positive, *S. agalactiae* Negative**
-	-	+	+/-	-	+	***E. coli* Positive, *L. monocytogenes* and *S. pneumoniae* Negative**
-	-	-	-	-	+	**Experiment fail**
+	+	+	+	+	-	**Experiment fail**

Table 4. Sample interpretation

+: Amplification curve

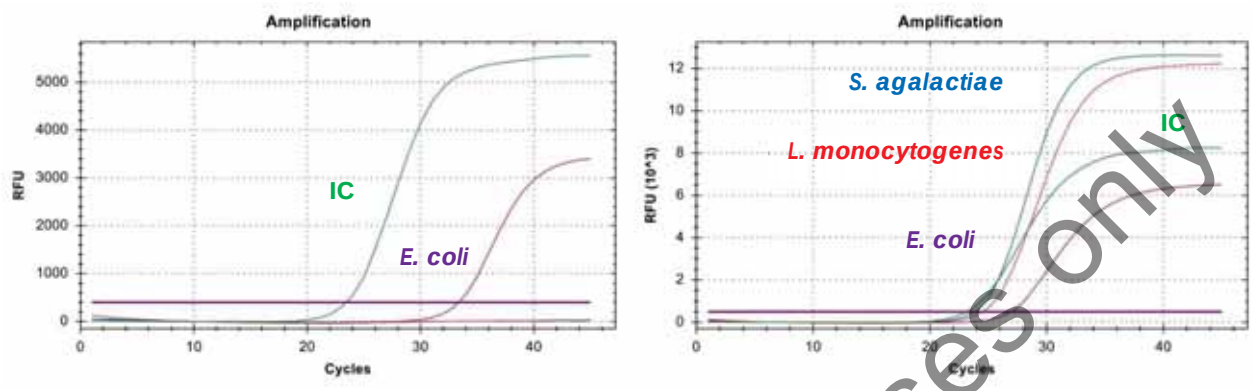
-: No amplification curve

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids

For information purposes only

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



Negative control* **Positive control**

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit for ***E. coli*** requires a cycle threshold cut-off at 30 for patient samples. A sample is considered to be positive for ***E. coli*** if the value of Ct is different from zero and less than 30.

*Please be aware that curves with Ct values >30 may appear in the Negative Control (NC) due to residual *Escherichia coli* nucleic acid within the enzyme preparation or extraction method.

The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated only with from vaginal-rectal swabs, faecal samples, culture samples, synthetic cerebrospinal fluid (CSF), plasma, and samples in saline solution and transport medium.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.

For information purposes only

- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* and *E. coli* either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit was evaluated with 4 EQA panels (QCMD 2017 Group B *Streptococcus* EQA Pilot Study, QCMD 2017 Diarrheagenic *Escherichia coli* EQA Pilot Study, QCMD 2017 Central Nervous System II EQA Pilot Study, and INSTAND 2017 *Listeria* spp). These panels consist of 29 clinical specimens (synthetic cerebrospinal fluid (CSF), plasma, and samples in saline solution or transport medium). The results were compared with the EQA program final reports. 6 of 7 positive samples for *S. agalactiae* samples could be detected, 8/8 were positive for *E. coli* and 3/3 for *L. monocytogenes*. In addition, *Streptococcus pneumonia*, *Neisseria meningitides*, and *Haemophilus influenza* samples could be confirmed as a negative.

In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect *S. agalactiae*, *L. monocytogenes and E. coli* using VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥10 DNA copies per reaction for *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* and 2500 DNA copies for *E. coli* (Figure 2, 3 and 4).

For information purposes only

Figure 2. Dilution series of *S. agalactiae* (10^7-10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel FAM).

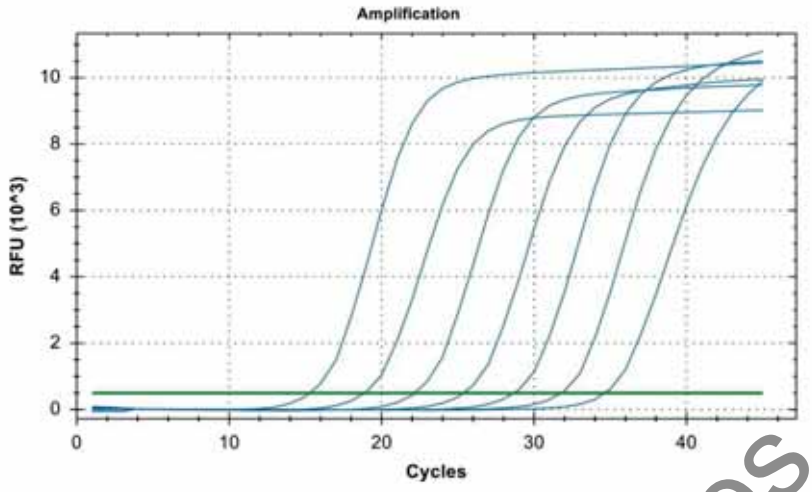


Figure 3. Dilution series of *L. monocytogenes* (10^7-10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel ROX).

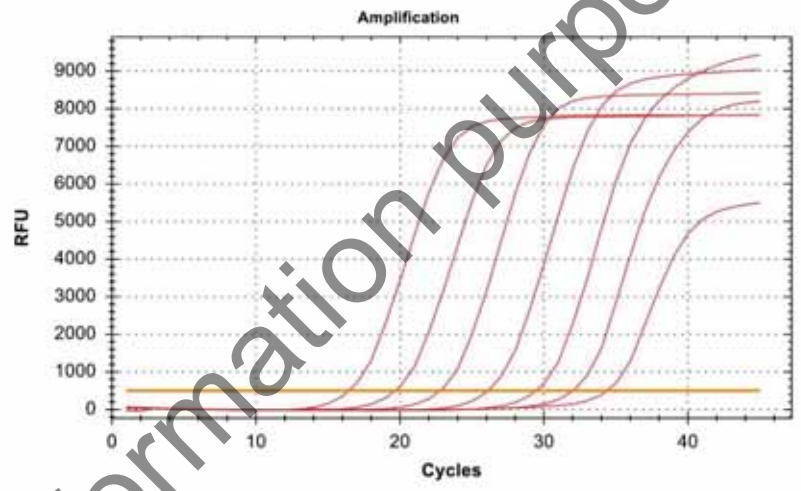
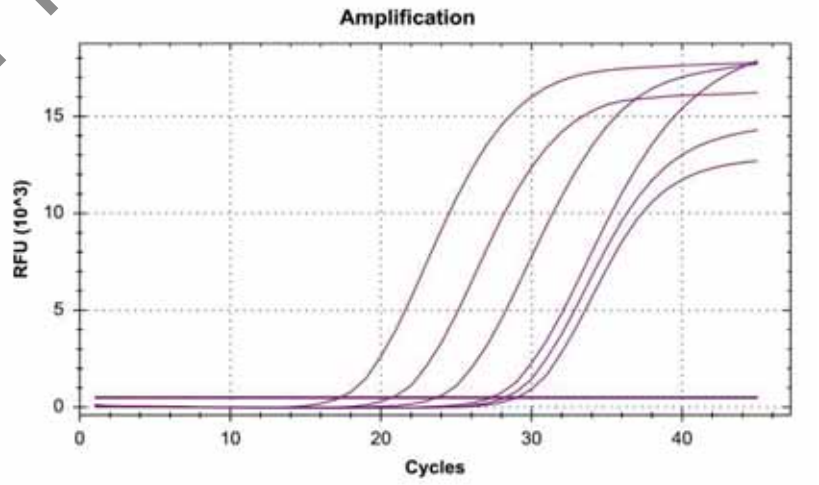


Figure 4. Dilution series of *E. coli* (10^7-10^4, 5000 and 2500 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel Cy5).



For information purposes only

12.3. Analytical specificity

The specificity of the *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* and *E. coli* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common meningitis and encephalitis pathogens. No cross-reactivity was detected between almost any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay, 4 species of *Shigella* and *Listeria ivanovii*. Although, *L. monocytogenes* is the leading cause of human listeriosis and can infect humans and animals; *L. ivanovii*, which had been considered to infect ruminants only, can also cause bacteremia in immunocompromised patients. *Shigella* spp. and *E. coli* belong to the family *Enterobacteriaceae*, share many common phenotypic characteristics and are closely genetic relatedness. In fact, their nucleotide similarity between *Shigella* and *E. coli* was 80% to 90%, which cause their challenging differentiation.

Cross-reactivity testing					
E. coli 0.1285;O18:H7:K1	-/+	*Shigella flexneri*	-/+	Herpes simplex virus 1 (HSV1) MacIntyre strain	-
Enterococcus durans	-	*Shigella boydii*	-/+	Herpes simplex virus 2 (HSV2) MS	-
Enterococcus faecalis	-	*Shigella dysenteriae* serotype 1	-/+	Human herpesvirus 6 (HHV6) strain Z29	-
Enterococcus faecium Serotype 11	-	Dengue 1 virus strain Hawaii A	-	Human herpesvirus 6 (HHV6) Type A	-
Haemophilus influenza MinnA	-	Dengue 2 virus strain New Guinea C	-	Human herpesvirus 6 (HHV6) Type B	-
Listeria innocua serovar 6a	-	Dengue 3 virus strain H87	-	Varicella-Zoster Virus Ellen	-
Listeria ivanovii subsp. ivanovii serovar 5	-/+	Dengue 4 virus strain H241	-	Varicella Zoster Virus OKA	-
Listeria monocytogenes Serotype 1/2b	-/+	Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-	Coxsackievirus type A9	-
Listeria monocytogenes Serovar 4b/Strain CIP 59.53	-/+	Yellow Fever Virus strain 17D	-	Coxsackievirus type A24	-
Neisseria meningitides Serogroup A	-	St Louis Encephalitis Virus strain 17D	-	Coxsackievirus type B3	-
Streptococcus agalactiae Z019	-/+	West Nile Virus Heja	-	Echovirus Type type 11	-
Streptococcus pneumonia Z022	-	West Nile Virus Ug37	-	Echovirus type 30	-
Staphylococcus aureus subsp. aureus	-	West Nile Virus strain NY99	-	Enterovirus type 68	-
Cryptococcus gattii Z156	-	Tick-Borne Encephalitis virus strain Neudorfl	-	Enterovirus type 71	-
Candida albicans	-	Epstein-Barr virus	-	Parechovirus type 3	-
Shigella sonnei	-/+	Citomegalovirus strain AD169	-		

Table 5. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit for *Streptococcus agalactiae* was evaluated against *Streptococcus agalactiae* strain Z019, showing positive result.

The reactivity of VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit for *Listeria monocytogenes* was evaluated against *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2b and *Listeria monocytogenes* Serovar 4b/Strain CIP 59.53, showing positive result.

For information purposes only

The reactivity of VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit for *E. coli* was evaluated against *E. coli* 0.1285;O18:H7:K1, showing positive result.

For information purposes only

ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a low profile block, like the systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a high or regular profile block, like the systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	**Model**
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler ®480 Real-Time PCR System#
Roche	LightCycler ®96 Real-Time PCR System#
Roche	Cobas z480 Analyzer#
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	**Model**
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep *realplex*
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System †
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler †
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System †
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System †

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.

** The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into the specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.*

 # Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.

† See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.

For information purposes only

ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

The fluorescence detection channels for some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.

For information purposes only

ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Set exposition values as follow:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -150, HEX channel – 3000, ROX channel – 2000 and Cy5 channel - 1500.

- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 150, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel – 100.

For information purposes only

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* y/o *E. coli* en muestras de fluido cerebroespinal, sangre y cultivos procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección por meningitis neonatal. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* y/o *E. coli* en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las muestras, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* y *E. coli*.

2. Introducción y explicación

La meningitis bacteriana es un tipo de infección bacteriana grave (SBI) en recién nacidos (de 0 a 28 días) y bebés pequeños (de 29 a 90 días). El organismo causal más común es el estreptococo del grupo B, seguido de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.

Streptococcus agalactiae, o Streptococcus del grupo B (GBS), es un patógeno importante que causa infecciones invasivas en recién nacidos y bebés. Las infecciones de GBS en bebés pequeños generalmente se dividen en enfermedad de inicio temprano (EOD, 0-6 días de vida) y enfermedad de inicio tardío (LOD, 7-89 días de vida). Si bien hubo una reducción satisfactoria de EOD, la carga de morbilidad de LOD se mantuvo sustancialmente alta. Hay diez serotipos conocidos de GBS: Ia, Ib y II-IX. Tienen una estructura capsular polisacárida distinta, un importante factor de virulencia que causa enfermedades humanas. Aunque la infección neonatal por GBS está estrechamente relacionada con la colonización genital materna, estudios previos han observado una distribución muy diferente de los serotipos y linajes filogenéticos entre la enfermedad neonatal invasiva y la colonización materna. En general, el serotipo III causa aproximadamente la mitad de las infecciones, pero el serotipo la predomina en pacientes menores de 72 h.

Listeria monocytogenes, una bacteria gram-positiva y miembro del género *Listeria*, es un patógeno ubicuo e intracelular responsable de la listeriosis, una enfermedad mortal que presenta los síntomas de aborto, muerte neonatal, septicemia y meningitis. La infección con *Listeria monocytogenes* durante el embarazo se asocia con abortos espontáneos, partos prematuros y complicaciones neonatales, que incluyen sepsis y meningitis. La inflamación de las membranas fetales y la vellosidad placentaria se observan en estos casos, pero el curso real de los acontecimientos en la interfaz materno-fetal que causa la muerte fetal no se conoce bien.

Escherichia coli causa frecuentemente septicemia y meningitis. Sin embargo, en la actualidad, la patogénesis de la meningitis causada por *E. coli* solo se entiende parcialmente por dos motivos: i) esta enfermedad infecciosa es un proceso complejo formado por múltiples interacciones bacteria-huésped, y ii) la alta diversidad genética de los patotipos entre las cepas de *E. coli* (NMEC) de la meningitis neonatal. Se sabe que hay algunas características que distinguen estas cepas. Las cepas de NMEC son parte del subgrupo de *E. coli* patógeno extraintestinal (ExPEC), la mayoría de las cuales pertenecen al grupo phylogrupo B22 y al complejo de tipo

For information purposes only

secuencia (ST) 95. Uno de los serotipos más comunes es O18: K1: H7 al que pertenecen dos de las cepas representativas de NMEC, C5 y RS218. El antígeno capsular K1 se ha detectado con frecuencia entre los aislados que causan septicemia y también lo presenta aproximadamente el 80% de las cepas de *E. coli* que causan meningitis neonatal.

Para acortar el tiempo de detección y mejorar la sensibilidad, los ensayos de PCR en tiempo real han demostrado ser una herramienta para la detección de *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli.*

3. Procedimiento

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* y/o *E. coli* en muestras clínicas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* y *E. coli* se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan en una región conservada de los genes *cfb* para *Streptococcus agalactiae*, *hlyA* para *Listeria monocytogenes* y 16S rRNA para *Escherichia coli*.

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5´ exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la reacción de amplificación *Streptococcus agalactiae* se detecta en el canal FAM, *Listeria monocytogenes* se detecta en el canal ROX, *Escherichia coli* se detecta en el canal Cy5 y el control interno(CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2:

For information purposes only

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-SLE1SL/ VS-SLE1SH	*S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-SLE1C	*S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-SLE106L, VS-SLE106H, VS-SLE112L y VS-SLE112H.

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-SLE1SL/ VS-SLE1SH	*S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-SLE1C	*S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-SLE113L y VS-SLE113H.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador) (para comprobar la compatibilidad ver Anexo I).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL.
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

For information purposes only

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40ºC hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20ºC tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

For information purposes only

8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de DNA a partir de muestras clínicas o muestras de cultivo puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- NucleoMag® Pathogen (Macherey Nagel).
- NucleoSpin RNA Virus (Macherey Nagel).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- Maxwell® RSC Blood DNA kit, utilizando Maxwell® 16 instrument (Promega).
- MagDEA Dx SV kit, utilizando magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.)
- NX-48 Urine/Swab DNA Kit utilizando Nextractor® NX-48 system, (Genolution).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20ºC tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador.

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

For information purposes only

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

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*S. agalactiae*), ROX (*L. monocytogenes*), Cy5 (*E. coli)* y HEX, JOE o VIC (Control Interno). 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. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli*. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

For information purposes only

S. agalactiae (FAM)	*L. monocytogenes* (ROX)	*E. coli* (Cy5)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	***S. agalactiae, L. monocytogenes* y *E. coli* Positivos**
-	-	-	+	-	+	***S. agalactiae, L. monocytogenes* y *E. coli* Negativos**
+	-	-	+/-	-	+	***S. agalactiae* Positivo *L. monocytogenes* y *E. coli* Negativos**
+	+	-	+/-	-	+	***S. agalactiae* y *L. monocytogenes* Positivos, y *E. coli* Negativo**
+	-	+	+/-	-	+	***S. agalactiae* y *E. coli* Positivos, y *L. monocytogenes* Negativo**
-	+	-	+/-	-	+	***L. monocytogenes* Positivo, *S. agalactiae* y *E. coli* Negativos**
-	+	+	+/-	-	+	***L. monocytogenes* y *E. coli* Positivos, *S. agalactiae* Negativo**
-	-	+	+/-	-	+	***E. coli* Positivo, *S. agalactiae* y *L. monocytogenes* Negativos**
-	-	-	-	-	+	**Inválido**
+	+	+	+	+	-	**Inválido**

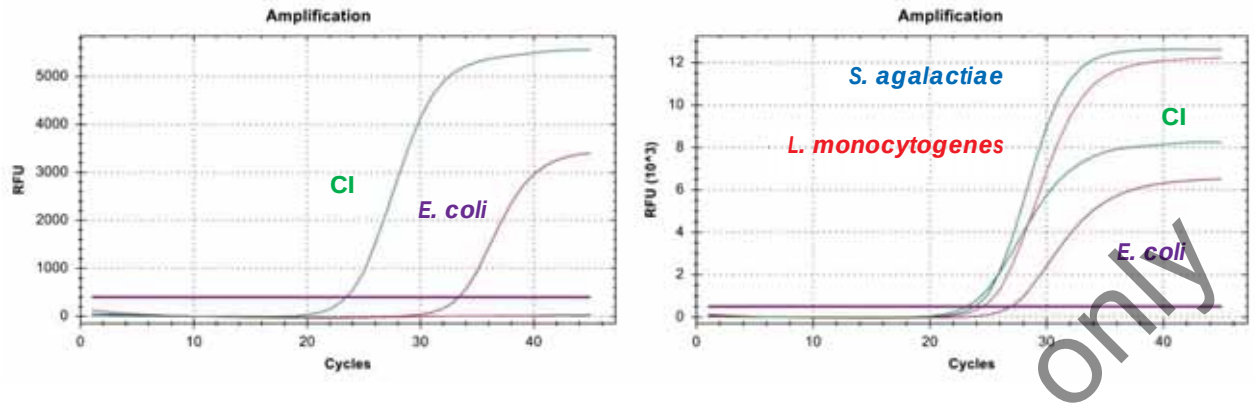
Tabla 4. Interpretación
+: curva de amplificación
-: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. 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.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

For information purposes only

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™Real-Time PCR Detection System.



Control Negativo* **Control Positivo**

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* & *E. coli* Real Time PCR Detection Kit para ***E. coli*** require un valor de Ct de 30 para muestras de pacientes. Una muestra se considera positiva para ***E. coli*** si el valor de Ct es diferente de cero y menor de 30.

*Tenga en cuenta que las curvas con valores de Ct>30 pueden aparecer en el control negativo (CN) debido al ácido nucleico residual de *Escherichia coli* dentro del método de preparación o extracción de la enzima.

El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con muestras de frotis vaginal-rectal, muestras fecales, muestras de cultivo, fluido cerebroespinal sintético, plasma y muestras de solución salina y medio de transporte.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias 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 *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* y *E. coli* ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

For information purposes only

11. Control de calidad

VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clinica

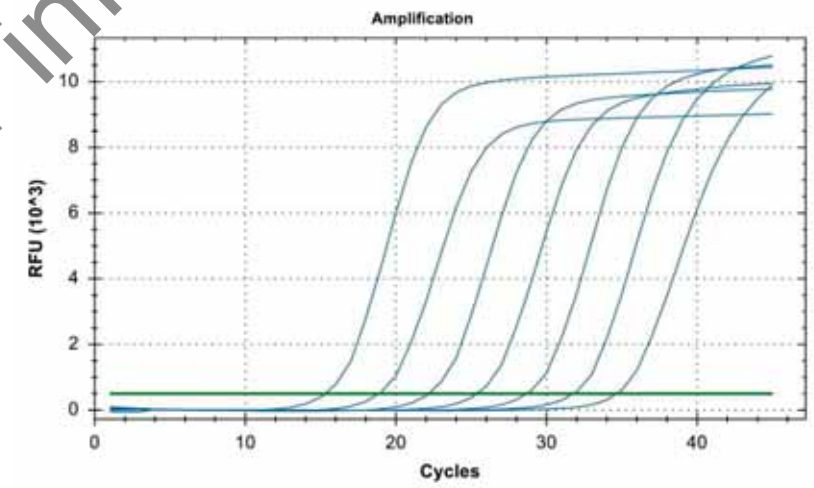
VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit se evaluó con 4 paneles EQA (QCMD 2017 Group B Streptococcus EQA Pilot Study, QCMD 2017 Diarrheagenic Escherichia coli EQA Pilot Study, QCMD 2017 Central Nervous System II EQA Pilot Study e INSTAND 2017 Listeria spp). Estos paneles se componen de 29 muestras clínicas (fluido cerebrospinal sintético, plasma y muestras en solución salina o medio de transporte). Los resultados se compararon con los informes finales de los programas EQA. 6 de 7 muestras positivas para *S. agalactiae* pudieron ser detectadas, 8/8 fueron positivas para *E. coli* y 3/3 para *L. monocytogenes.* Además, las muestras de *Streptococcus pneumonia, Neisseria meningitides,* y *Haemophilus influenza* fueron confirmadas como negativas.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *S. agalactiae, L. monocytogenes* y *E. coli*; utilizando VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analitica

VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥10 copias de DNA por reacción para *S. agalactiae, L. monocytogenes* y 2500 copias de DNA para *E. coli.* (Figura 2, 3 y 4).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar *S. agalactiae* (10^7-10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).



For information purposes only

Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar *L. monocytogenes* (10^7-10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).

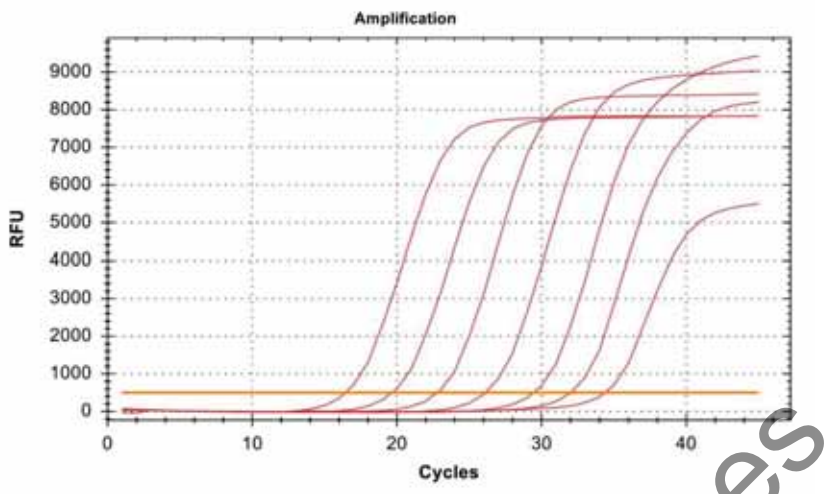
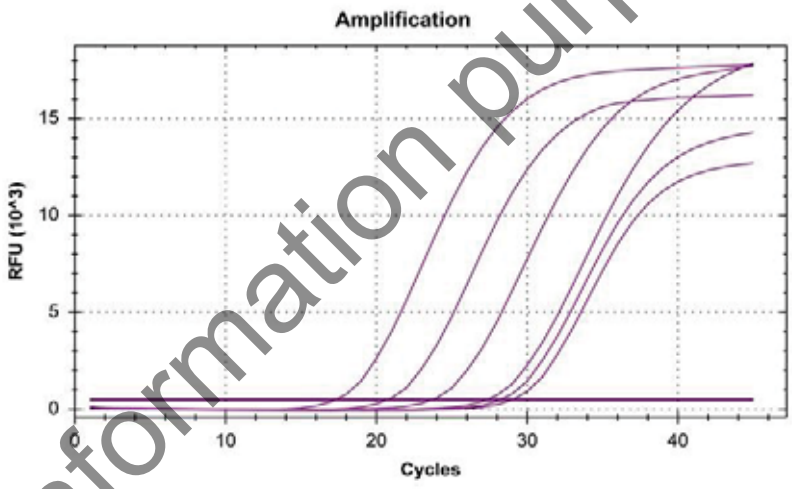


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar *E. coli* (10^7-10^4, 5000 y 2500 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal Cy5).



For information purposes only

12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos de meningitis y encefalitis más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo, 4 especies de *Shigella* y *Listeria ivanovii.* Aunque *L. monocytogenes* es considerada la principal causa de listeriosis humana y puede infectar a humanos y animales; *L. ivanovii*, que se había considerado que solo infectaba a los rumiantes, también puede causar bacteriemia en pacientes inmunocomprometidos. *Shigella* spp. y *E. coli* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, comparten muchas características fenotípicas comunes y tienen una estrecha relación genética. De hecho, su similitud de nucleótidos entre *Shigella* y *E. coli* fue del 80% al 90%, lo que causa su desafiante diferenciación.

Prueba de reacción cruzada					
E. coli 0.1285;O18:H7:K1	-/+	*Shigella flexneri*	-/+	Virus Herpes simplex 1 (HSV1) cepa MacIntyre	-
Enterococcus durans	-	*Shigella boydii*	-/+	Virus Herpes simplex 2 (HSV2) MS	-
Enterococcus faecalis	-	*Shigella dysenteriae* serotipo 1	-/+	Human herpesvirus 6 (HHV6) cepa Z29	-
Enterococcus faecium Serotype 11	-	Virus Dengue 1 cepa Hawaii A	-	Human herpesvirus 6 (HHV6) Tipo A	-
Haemophilus influenza MinnA	-	Virus Dengue 2 cepa New Guinea C	-	Human herpesvirus 6 (HHV6) Tipo B	-
Listeria innocua serovar 6a	-	Virus Dengue 3 cepa H87	-	Virus Varicella-Zoster Ellen	-
Listeria ivanovii subsp. ivanovii serovar 5	-/+	Virus Dengue 4 cepa H241	-	Virus Varicella Zoster OKA	-
Listeria monocytogenes Serotype 1/2b	-/+	Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	-	Coxsackievirus tipo A9	-
Listeria monocytogenes Serovar 4b/Strain CIP 59.53	-/+	Virus Yellow Fever cepa 17D	-	Coxsackievirus tipo A24	-
Neisseria meningitides Serogroup A	-	Virus St Louis Encephalitis cepa 17D	-	Coxsackievirus tipo B3	-
Streptococcus agalactiae Z019	-/+	Virus West Nile Heja	-	Echovirus Type tipo 11	-
Streptococcus pneumonia Z022	-	Virus West Nile Ug37	-	Echovirus tipo 30	-
Staphylococcus aureus subsp. aureus	-	Virus West Nile cepa NY99	-	Enterovirus tipo 68	-
Cryptococcus gattii Z156	-	Virus Tick-Borne Encephalitis cepa Neudorfl	-	Enterovirus tipo 71	-
Candida albicans	-	Virus Epstein-Barr	-	Parechovirus tipo 3	-
Shigella sonnei	-/+	Citomegalovirus cepa AD169	-		

Tabla 5. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *H S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit para *Streptococcus agalactiae* se evaluó frente a *Streptococcus agalactiae* cepa Z019, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit para *Listeria monocytogenes* se evaluó frente a *Listeria monocytogenes* Serotipo 1/2b y *Listeria monocytogenes* Serovar 4b/cepa CIP 59.53 cepa Z022, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *S. agalactiae, L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit para *E. coli* se evaluó frente a *E. coli* 0.1285;O18:H7:K1, mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. D. Kotzbauer *et al.* Etiology and Laboratory Abnormalities in Bacterial Meningitis in Neonates and Young Infants. *International Journal of Clinical Practice* 2017; 7(2): 943.
2. C.W. Lo *et al.* Serotype distribution and clinical correlation of *Streptococcus agalactiae* causing invasive disease in infants and children in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2017; S1684-1182(17)30228-1.
3. B. Wolfe *et al.* Acute Fetal Demise with First Trimester Maternal Infection Resulting from *Listeria monocytogenes* in a Nonhuman Primate Model. *mBio* 2017; 8(1): e01938-16.

For information purposes only

4. E. Sáez-López *et al*. Outbreak Caused by *Escherichia coli* O18:K1:H7 Sequence Type 95 in a Neonatal Intensive Care Unit in Barcelona, Spain. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2017; 36(11):1079–1086.
5. J-Q Chen *et al*. PCR-based Methodologies for Detection and Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in Foods and Environmental Sources. *Food Science and Human Wellness* 2017; 6(2):39-59.
6. M.V. Gianfranceschi *et al*. European validation of a real-time PCR-based method for detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *International Journal of Food Microbiology* 2013; 128–133.
7. M. van den Brand *et al*. Development of a multiplex real-time PCR assay for the rapid diagnosis of neonatal late onset sepsis. *Journal of Microbiological Methods* 2014; 8–15.
8. C. Guillet et al. Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*. Emerging Infectious Diseases 2010; 16(1): 136-138.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

IVD	*In vitro* diagnostic device Producto para diagnóstico *in vitro*		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante	LOT	Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura	Σ	Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	DIL	Sample diluent Diluyente de muestra	REF	Catalogue number Número de referencia

For information purposes only

ANEXO 1

Compatibilidad de los equipos a tiempo real más comunes

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	**Modelo**
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler ®480 Real-Time PCR System#
Roche	LightCycler ®96 Real-Time PCR System#
Roche	Cobas z480 Analyzer#
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
Qiagen	Rotor-Gene®Q*
Cepheid	SmartCycler®

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	**Modelo**
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep *realplex*
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System†
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler†
Qiagen	Rotor-Gene®Q*
Cepheid	SmartCycler®
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System†
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System†

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.

** El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®*

 # Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.

† Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.

For information purposes only

ANEXO 2

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 Tabla A3.

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

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real.

For information purposes only

ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -150, canal HEX - 3000, canal ROX - 2000 y canal Cy5 -1500.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -150, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 100.

For information purposes only

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System and VIASURE 96 Real Time PCR System. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

VIASURE *S. agalactiae*, *L. monocytogenes & E. coli* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

For information purposes only

- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

CerTest Biotec, S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840. San Mateo de Gállego. Zaragoza (Spain)
www.certest.es

VIASURE online

For information purposes only

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

CerTest BIOTEC