

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



CTX, TEM, SHV & mcr

CE IVD



These instructions for use apply to the following references / *Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:*

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT (SEE ANNEX 1) / OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE (VER ANEXO 1)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-BLC101L
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS- BLC101H
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS- BLC106L
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS- BLC106H
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS- BLC112L
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS- BLC112H
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS- BLC113L
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS- BLC113H
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- BLC101
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- BLC136
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- BLC172

Table A 1. References for Open and Rotor-Gene format products. / *Referencias para productos Open y Rotor-Gene Format.*

TUBE FORMAT (SEE ANNEX 2) / FORMATO TUBO (VER ANEXO 2)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS- BLC196T

Table A 2. References for Tube format products. / *Referencias para productos formato Tubo.*

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Las instrucciones de uso (IFU) se incluyen en el kit en versión inglés/español.

EN For download IFUS from other languages, please enter in certest.es/viasure/labeling. Once you be there, please following the instructions for access to the language that you need. If you need additional information, please contact: viasure@certest.es.

ES Para descargar las IFUS en otros idiomas, por favor, entre en certest.es/viasure/labeling. Una vez esté allí, siga las instrucciones para acceder al idioma que necesite. Si necesita información adicional, contacte: viasure@certest.es.

RO Pentru a descărca IFUS în alte limbi, vă rugăm să accesați certest.es/viasure/labeling. Accesat site-ul, urmați instrucțiunile pentru a selecta limba necesară. Pentru informații suplimentare, contactați: viasure@certest.es.

FR Pour télécharger l'IFUS dans d'autres langues, veuillez vous rendre sur certest.es/viasure/labeling. Une fois sur place, suivez les instructions pour accéder à la langue dont vous avez besoin. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, contactez: viasure@certest.es.

DE Um den IFUS in anderen Sprachen herunterzuladen, gehen Sie bitte zu certest.es/viasure/labeling. Wenn Sie dort sind, folgen Sie den Anweisungen, um auf die gewünschte Sprache zuzugreifen. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich an: viasure@certest.es.

IT Per scaricare l'IFUS in altre lingue, vai su certest.es/viasure/labeling. Una volta che sei lì, segui le istruzioni per accedere alla lingua di cui hai bisogno. Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta: viasure@certest.es.

PT Para baixar o IFUS em outros idiomas europeus, acesse **certest.es/viasure/labeling**. Uma vez lá, siga as instruções para acessar o idioma que você precisa. Se você precisar de informações adicionais, entre em contato: viasure@certest.es.

NE Om de IFUS in andere talen te downloaden, gaat u naar **certest.es/viasure/labeling**. Als je daar bent, volg je de instructies om toegang te krijgen tot de taal die je nodig hebt. Neem voor meer informatie contact op met: viasure@certest.es.

Note: The user should notify the manufacturer and the competent authority of the Member State in which he is established as a user and/or patient of any serious incident related to the product.

Nota: El usuario debe notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido como usuario y/o paciente cualquier incidencia grave relacionada con el producto.

Content

1.	Intended use.....	6
2.	Summary and Explanation	6
3.	Principle of the procedure	7
4.	Reagents provided	7
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	7
6.	Transport and storage conditions.....	8
7.	Precautions for users	8
8.	Test procedure	9
8.1.	Specimen collection, transport and storage	9
8.2.	DNA extraction.....	10
9.	Result interpretation	10
10.	Limitations of the test	12
11.	Quality control.....	13
12.	Performance characteristics.....	13
12.1.	Clinical sensitivity and specificity.....	13
12.2.	Analytical sensitivity	15
12.3.	Analytical specificity	17
12.4.	Analytical reactivity	19
	ANNEX 1	20
A1.1	Principle of the procedure.....	20
A1.2	Reagents provided.....	20
A1.3	Test procedure	21
A1.3.1	Lyophilized positive control.....	21
A1.3.2	PCR protocol.....	22
	ANNEX 2	23
A2.1	Principle of the procedure.....	23
A2.2	Reagents provided.....	23
A2.3	Test procedure	23
A2.3.1	Lyophilized positive control.....	23
A2.3.2	Lyophilized reaction mix tube.....	24
A2.3.3	PCR protocol.....	24

Contenido

1.	Usado previsto.....	25
2.	Introducción y explicación	25
3.	Procedimiento	26
4.	Reactivos suministrados.....	26
5.	Material requerido y no suministrado	26

6.	Condiciones de transporte y almacenamiento	27
7.	Precauciones para el usuario	27
8.	Procedimiento del test	29
8.1.	Recolección, transporte y almacenamiento de muestras	29
8.2.	Extracción de DNA	29
9.	Interpretación de resultados.....	30
10.	Limitaciones del test	32
11.	Control de calidad	33
12.	Características del test.....	33
12.1.	Sensibilidad y especificidad clínica	33
12.2.	Sensibilidad analítica	35
12.3.	Especificidad analítica	37
12.4.	Reactividad analítica	39
	ANEXO 1	41
A1.1	Procedimiento	41
A1.2	Reactivos suministrados	41
A1.3	Procedimiento del test	43
A1.3.1	Control positivo liofilizado	43
A1.3.2	Protocolo PCR	43
	ANEXO 2.....	44
A2.1	Procedimiento	44
A2.2	Reactivos suministrados	44
A2.3	Procedimiento del test	44
A2.3.1	Control positivo liofilizado	44
A2.3.2	Mezcla de reacción liofilizada	45
A2.3.3	Protocolo PCR	45
	Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	47
	Trademarks.....	48

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Real Time PCR Detection Kit is a real time PCR assay designed for the qualitative detection and differentiation of family-specific β -lactamases *CTX-M*, *TEM* and *SHV*; and *mcr-1* colistin genes in gram-negative bacteria associated to resistances in blood culture and swab samples such as biopsy, gluteal swabs, ulcer swabs, wound swabs, conjunctive swab, tongue swab, joint fluid swab, oral swabs, hair swabs, perineal swab, urethral swab, abscess swabs from patients with suspect of bacterial infection and/or multi-resistant infection or colonization and swabs for epidemiological control such as nasal, pharyngeal, rectal swabs, axillary swabs, inguinal swabs, epithelial swabs, colostomy swabs, stoma swab, BAS, BAL and sputum specimens by their healthcare professional (HCP). This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of family-specific *CTX-M*, *TEM* and *SHV*; and *mcr-1* genes in gram-negative bacteria in clinical samples in both, surveillance and timely identification of antibiotic-resistant infections and colonization, in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from clinical specimens amplified using real time PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for *CTX-M*, *TEM*, *SHV* and *mcr-1* genes resistances.

2. Summary and Explanation

β -Lactams are the most widely used class of antibiotics. Since the discovery of benzylpenicillin in the 1920s, new penicillin derivatives and related β -lactam classes of cephalosporins, cephamycins, monobactams, and carbapenems have been discovered. Each new class of β -lactam has been developed either to increase the spectrum of activity to include additional bacterial species or to address specific resistance mechanisms that have arisen in the targeted bacterial population. Resistance to β -lactams is primarily because of bacterially produced β -lactamase enzymes that hydrolyze the β -lactam ring, thereby inactivating the drug. The newest effort to circumvent resistance is the development of novel broad-spectrum β -lactamase inhibitors that work against many problematic β -lactamases, including cephalosporinases and serine-based carbapenemases, which severely limit therapeutic options.

On the other hand, only two polymyxins, polymyxin E (colistin) and polymyxin B, are currently commercially available. Colistin has re-emerged as a last-hope treatment in the mid-1990s against multidrug-resistant Gram-negative pathogens due to the development of extensively drug-resistant Gram-negative bacteria. Unfortunately, rapid global resistance towards colistin has emerged following its resurgence. Different mechanisms of colistin resistance have been characterized, including intrinsic, mutational, and transferable mechanisms.

Multidrug-resistant pathogens are a serious problem not only making treatment difficult but also worsening the prognosis of infected patients.

The detection of the common ESBL genes such as *TEM*, *SHV* and *CTX-M* by molecular methods in the ESBL producing bacteria and their patterns of antimicrobial resistance can provide useful information about their epidemiology and can aid a rational antimicrobial therapy.

3. Principle of the procedure

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis family-specific CTX-M, TEM and SHV genes in gram-negative bacteria associated to resistances in clinical samples. After DNA isolation, the detection of β -lactamases (CTX-M, TEM, SHV) and colistin (*mcr-1*) resistance genes is performed by the amplification of a conserved region of the *Bl_{CTX-M1}*, *Bl_{CTX-M9}*, (*Cluster A or Bl_{CTX-M-A}*), *Bl_{CTX-M-2}*, *Bl_{CTX-M-8}*, *Bl_{CTX-M25}* (*Cluster B or Bl_{CTX-M-B}*), *Bl_{TEM}*, *Bl_{SHV}* genes for β -lactamases resistances and *mcr-1* gene for colistin resistances, using specific primers and fluorescent-labelled probes.

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr 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 CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, and polymerase) in a stabilized format.

4. Reagents provided

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit includes the materials and reagents detailed in Annex 1 for open and rotor-gene format products, Annex 2 for tube format products.

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 CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e. individual tubes, well-strips and/or microplates). Only for Tube format (Annex 2 and 4).
- DNA extraction kit.
- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: -30°C to -10°C and/or \leq -70°C.
- Centrifuge for 1.5mL tubes and PCR well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipetes (0.5-20 μ L, 20-200 μ L).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments). Only for Rotor Gene format (Annex 1 and 3).

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology), DTLite Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-

Technology), Rotor-Gene® Q (Qiagen), Cobas z 480 Analyzer (Roche Molecular Diagnosis), VIASURE V-Lab96 Cycler (CerTest Biotec S.L.) and AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies).

To check thermocycler compatibility and most common detection channels consult website www.certest.es.

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with VIASURE Real Time PCR Detection Kits. This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology): FAM channel -500*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

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

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from light.
- For Tube format kits: Once the CTX, TEM, SHV & mcr Reaction-Mix tube has been reconstituted, it may be kept it at 25°C±5°C or 2°C to 8°C for up to 4 hours. For a longer period of time, it is recommended store at – 20°C and to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles (up to 6 times).

7. Precautions for users

- The product is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of real-time PCR and *in vitro* diagnostic procedures (including training on the Real Time PCR instrument (thermocycler) and Nucleic acid extraction system).
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- 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.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (for references: VS-BLC113L, VS-BLC113H, VS-BLC136 and VS-BLC172). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.

- For references VS-BLC101, VS-BLC136 and VS-BLC172 (compatible for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- 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. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipment required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles, and mask. Do not eat, drink, or smoke in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- 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.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP) or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions, and procedures.

8. Test procedure

Please see Annex 1 for Open and Rotor-Gene format products Test Procedure, Annex 2 for Tube format products Test Procedure.

8.1. Specimen collection, transport and storage

The VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit has been tested in blood culture and swab samples (gluteal, ulcer, wound, conjunctiva, tongue, joint fluid, oral, hair, perineal, urethral, abscess, axillary, inguinal, epithelial and colostomy, nasal, pharyngeal, rectal, stoma swabs, biopsy, BAS, BAL and sputum). Swab

specimens have been collected in AMIES transport medium (DeltaLab). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage, and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, clinical samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at Room Temperature (RT) for up to 2 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 2 hours). It is recommended shipping at -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored frozen at -20°C or ideally at -80°C (if medium allows it) for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94), and García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. 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 samples, you can use your manual or automatic routine optimized system, or any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. The following extraction kits have been validated:

- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

9. Result interpretation

All the result of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. Use the Positive Control amplification curve as a starting point during the run validation (before than interpretation of patient sample results), in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

The use of positive and negative controls in each run validates the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for CTX, TEM, SHV and mcr in the positive control well.

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

(ROX) ¹ Controls	CTX resistance gene (<i>Bla</i> _{CTX-M-A} and <i>Bla</i> _{CTX-M-B}) (FAM) ¹	<i>mcr-1</i> resistance gene (Cy5) ¹	SHV resistance gene (<i>Bla</i> _{SHV}) (ROX) ¹	TEM resistance gene (<i>Bla</i> _{TEM}) (HEX) ¹	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal	>40 or no signal	>40 or no signal	>40 or no signal	Valid

Table 1. Expected Performance of Controls. Ct values. no signal = no amplification curves.

¹ In cases where either or both of the control assays have failed (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the positive control well for any target channel), all results are reported as 'Invalid' and retesting is required.

Assessment of clinical samples test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

For interpretation of individual patient sample results, use the following table, read, and analyse the results:

CTX resistance gene (<i>Bla</i> _{CTX-M-A} and <i>Bla</i> _{CTX-M-B}) (FAM)	<i>mcr-1</i> resistance gene (Cy5)	SHV resistance gene (<i>Bla</i> _{SHV}) (ROX)	TEM resistance gene (<i>Bla</i> _{TEM}) (HEX)	Interpretation for patient's individual samples	
≤37	>40 or no signal	>35 or no signal	>30 or no signal	Valid	CTX resistance gene DNA Detected
≤37	≤40	>35 or no signal	>30 or no signal	Valid	CTX and <i>mcr-1</i> resistance gene DNA Detected
≤37	≤40	≤35	>30 or no signal	Valid	CTX, <i>mcr-1</i> and SHV resistance gene DNA Detected
≤37	≤40	≤35	≤30	Valid	CTX, <i>mcr-1</i>, SHV and TEM resistance gene DNA Detected
≤37	>40 or no signal	≤35	>30 or no signal	Valid	CTX and SHV resistance gene DNA Detected
≤37	>40 or no signal	>35 or no signal	≤30	Valid	CTX and TEM resistance gene DNA Detected
>37 or no signal	≤40	>35 or no signal	>30 or no signal	Valid	<i>mcr-1</i> resistance gene DNA Detected
>37 or no signal	≤40	≤35	>30 or no signal	Valid	<i>mcr-1</i> and SHV resistance gene DNA Detected
>37 or no signal	≤40	>35 or no signal	≤30	Valid	<i>mcr-1</i> and TEM resistance gene DNA Detected
>37 or no signal	≤40	≤35	≤30	Valid	<i>mcr-1</i>, SHV and TEM resistance gene DNA Detected
>37 or no signal	>40 or no signal	≤35	>30 or no signal	Valid	SHV resistance gene DNA Detected
>37 or no signal	>40 or no signal	≤35	≤30	Valid	SHV and TEM resistance gene DNA Detected
≤37	>40 or no signal	≤35	≤30	Valid	CTX, SHV and TEM resistance gene DNA Detected

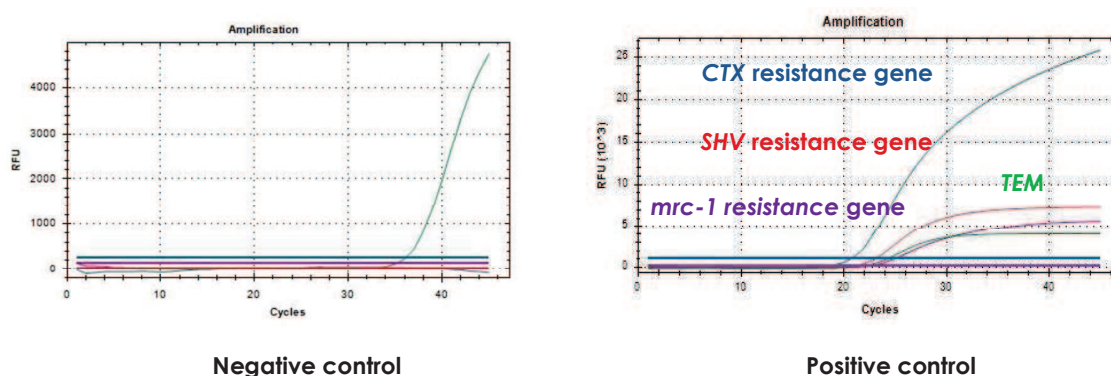
>37 or no signal	>40 or no signal	>35 or no signal	≤30	Valid	TEM resistance gene DNA Detected
>37 or no signal	>40 or no signal	>35 or no signal	>30 or no signal	Valid	Targets not Detected

Table 2. Interpretation of individual patient sample results. Ct values. no signal = no amplification curves.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use; the extraction process used by the user; to verify the correct performance of each qPCR steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. Depending on the available material:

- repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or
- re-extract and retest another aliquot of the same specimen or,
- obtain a new specimen and retest.

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



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 DNA extracted from blood cultures and swab samples such as gluteal, ulcer, wound, conjunctiva, tongue, joint fluid, oral, hair, perineal, urethral, abscess, axillary, inguinal, epithelial and colostomy, nasal, pharyngeal, rectal, stoma swabs, biopsy, BAS, BAL and sputum.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; nucleic acid must be properly extracted from clinical samples.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- 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 by β -lactamases (*CTX-M*, *TEM*, *SHV*) and colistin (*mcr-1*) resistances genes, either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).

- Degradation of the bacterial DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown by β -lactamases (*CTX-M*, *TEM*, *SHV*) and colistin (*mcr-1*) resistances genes mutations.
 - A bacterial load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of antibiotics used to prevent the infection or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable bacteria and does not imply that these bacteria are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of resistance targets bacteria.
 - Negative results do not preclude by β -lactamases (*CTX-M*, *TEM*, *SHV*) and colistin (*mcr-1*) resistances genes bacteria infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak bacterial levels during infections caused by β -lactamases (*CTX-M*, *TEM*, *SHV*) and colistin (*mcr-1*) resistances bacterias have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the resistance genes.
 - If diagnostic tests for β -lactamases (*CTX-M*, *TEM*, *SHV*) and colistin (*mcr-1*) genes resistances are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that bacteria resistances infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
 - Fluorescence values may vary due to multiple factors such as: PCR equipment, extraction system, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.

11. Quality control

VIASURE *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Real Time PCR Detection Kit was tested using clinical samples from patients with suspected of bacterial resistance infection and for epidemiological control. In order to determine the clinical diagnostic accuracy, different multicenter evaluations have been conducted through collaboration with national entities. A summary of the sites, sample type and workflow are included in the following table. The results were as follows:

Site	Sample type	Workflow	Target
1 Hospital Royo Villanova (Zaragoza, Spain) and CerTest facilities.	a Blood culture	MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	CTX
			TEM
			SHV
			<i>mcr-1</i>
	b Swab samples*	MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	CTX
			TEM
			SHV
			<i>mcr-1</i>

Table 3. Site, sample type, workflow, and target.

* Swabs samples as gluteal, ulcer, wound, conjunctiva, tongue, joint fluid, oral, hair, perineal, urethral, abscess, axillary, inguinal, epithelial and colostomy, nasal, pharyngeal, rectal, stoma swabs, biopsy, BAS, BAL and sputum.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE CTX, TEM, SHV & *mcr* Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
1a	Culture	CTX	17	401	0	0	1 (0.80-1)	1 (0.99-1)	1 (0.81-1)	1 (0.99-1)
		TEM	54	364	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.99-1)	1 (0.93-1)	1 (0.99-1)
		SHV	26	392	0	0	1 (0.86-1)	1 (0.99-1)	1 (0.87-1)	1 (0.99-1)
	ARM-D® Kit, TEM/SHV/GES Detected Variants (STRECK) and ARM-D® Kit, β-Lactamase Detected Variants (STRECK)	CTX	17	68	0	0	1 (0.80-1)	1 (0.94-1)	1 (0.80-1)	1 (0.94-1)
		TEM	54	31	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.88-1)	1 (0.93-1)	1 (0.88-1)
		SHV	26	59	0	0	1 (0.86-1)	1 (0.93-1)	1 (0.86-1)	1 (0.93-1)
1b	Culture	CTX	97	548	0	0	1 (0.96-1)	1 (0.99-1)	1 (0.96-1)	1 (0.99-1)
		TEM	181	464	0	0	1 (0.98-1)	1 (0.99-1)	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)
		SHV	126	519	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)
	ARM-D® Kit, TEM/SHV/GES Detected Variants (STRECK) and ARM-D® Kit, β-Lactamase Detected Variants (STRECK)	CTX	97	548	0	0	1 (0.96-1)	1 (0.99-1)	1 (0.96-1)	1 (0.99-1)
		TEM	181	464	0	0	1 (0.98-1)	1 (0.99-1)	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)
		SHV	126	519	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)

Table 4. True positive (TP) and negative values (TN), false positive (FP) and false negative (FN) values, sensitivity, specificity, Predictive Positive Values (PPV), Predictive Negative Values (NPV) for VIASURE CTX, TEM, SHV & *mcr* Real Time PCR Detection Kit.

Results show high agreement to detect β-lactamases (CTX-M, TEM, SHV) and colistin (*mcr-1*) resistances genes using VIASURE CTX, TEM, SHV & *mcr* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of 0.02 CFU per reaction for β -lactamase resistance gene CTX (*BlaCTX-M1*, *BlaCTX-M9*, (Cluster A or *BlaCTX-M-A*) and *BlaCTX-M2*, *BlaCTX-M8*, *BlaCTX-M25* (Cluster B or *BlaCTX-M-B*)), 0.08 CFU per reaction for β -lactamase resistance gene type TEM (*BlaTEM* gene), 8.75 copies per reaction for β -lactamase resistance gene type SHV (*Bla_{SHV}* gene), and 0.02 CFU per reaction for colistin resistance gene *mcr-1*, with a positive rate of 95%.

Figure 3. Dilution series of CTX-M-1 and CTX-M-9 gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel FAM).

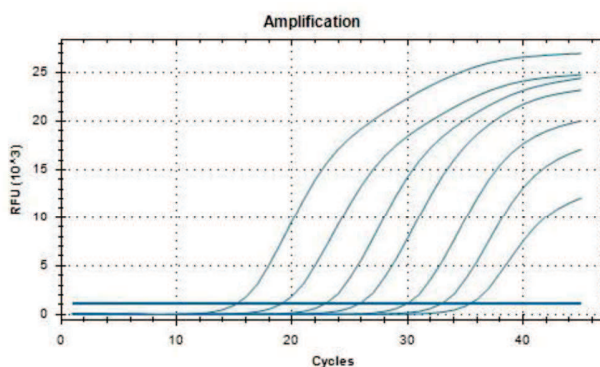


Figure 4. Dilution series of CTX-M-2, CTX-M-8 and CTX-M-25 gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel FAM).

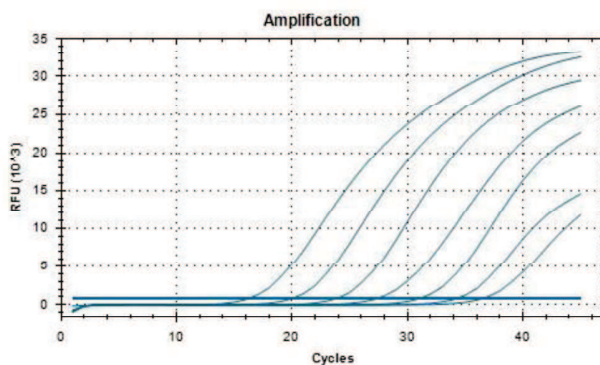


Figure 5. Dilution series of *SHV* gene (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel ROX).

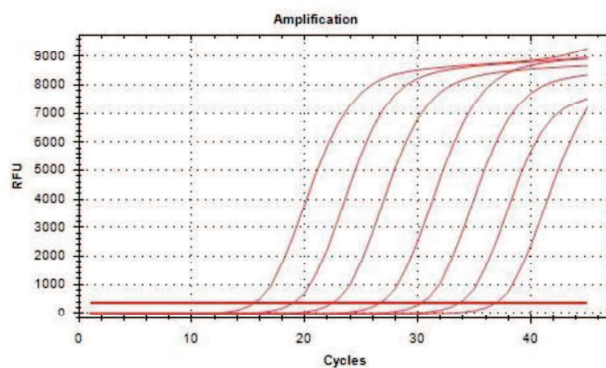


Figure 6. Dilution series of *mcr-1* genes (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel Cy5).

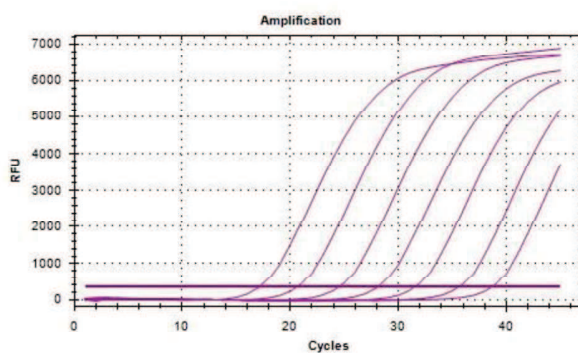
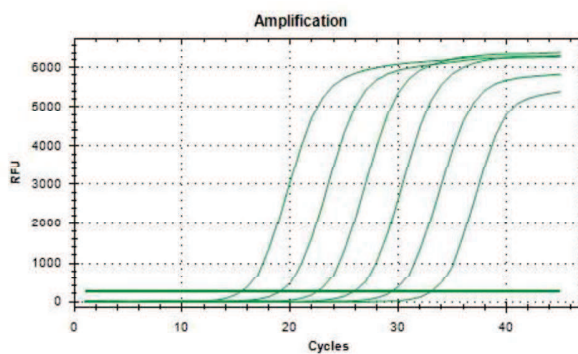


Figure 7. Dilution series of *TEM* genes (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel HEX).



12.3. Analytical specificity

The specificity of VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms associated to gastrointestinal diseases, microorganisms transmitted by blood and microorganisms associated with resistances. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing (wet testing)					
Human Adenovirus type 1, 3 4, 5 8, 13, 31, 40 and 41	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>enteritidis</i>	-	Japanese encephalitis	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> . Serotype 4,5,12:i:1,2	-	Japanese encephalitis virus strain Nakayama	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>gallinarum</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> strain 3D7	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>pullorum</i>	-	Rift Valley Fever Virus AR21229	-
Astrovirus genotype I-VIII	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>paratyphi A</i>	-	Rift Valley Fever Virus MP12	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>paratyphi B</i>	-	St Louis Encephalitis Virus	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhi</i>	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	Sapovirus	-	<i>Usutu Virus</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	West Nile virus strain NY99	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 1	-	West Nile virus strain Heja	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-	West Nile virus strain Ug 37	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Yellow Fever Virus strain 17D	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O1:K1	-	Yellow Fever Virus strain French Neurotropic	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-	Zika virus strain FB-GWUH-2016	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-	Zika Virus African strain	-
<i>Clostridium difficile</i> O:27	-	<i>Anaplasma marginale</i>	-	Zika Virus Asian strain PF13/251013-18	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Bartonella henselae</i> strain Houston-1	-	Zika Virus French Polynesian strain 11474/16	-
Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Borrelia hermsii</i>	-	Zika Virus French Polynesian strain 11468/16	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Borrelia lusitanae</i>	-	<i>Citrobacter brakii</i> carbapenemase positive (VIM-1)	-
<i>Dientamoba fragilis</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Borrelia valaisiana</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i> ESBL/Carbapenemase positive (TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL), NDM-1)	+/-

<i>Echovirus 30</i>	-	<i>Borrelia azfeli</i> strain P-Ko/1984	-	<i>Enterococcus avium</i> vancomycin A resistant	-
<i>Entamoeba dispar</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Borrelia bavariensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> vancomycin A resistant	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Borrelia bisetti</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> vancomycin B resistant (equivalent to ATCC51299)	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Borrelia burgdorferi</i> strain IRS	-	<i>Enterococcus faecium</i> vancomycin A resistant LMG16165	-
<i>Enterovirus 68</i> and <i>71</i>	-	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> strain B31	-	<i>Enterococcus faecium</i> vancomycin A resistant IOWA1	-
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> serotype O157:H7	-	<i>Borrelia garinii</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> S + <i>Enterococcus gallinarum</i> vancomycin C resistant (MI12043391 + LMG16289)	-
Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Borrelia japonica</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> vancomycin B and C resistant ENT20120142	-
Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	<i>Escherichia coli</i> carbapenemase positive (OXA-244)	-
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> serotype O25:H42	-	<i>Borrelia spielmanii</i>	-	<i>Escherichia coli</i> carbapenemase positive (TEM-1 (non ESBL), IMP-1)	+/-
<i>Giardia intestinalis</i> strain WB clone C6	-	<i>Coxiella burnetii</i> strain Nine Mile Q	-	<i>Helicobacter pylori</i> claritromycin resistant A2146G	-
<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Leptospira</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i> claritromycin resistant A2147G	-
<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	<i>Rickettsia conorii</i> strain Moroccan	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase positive (SHV-1 (non ESBL), KPC-3, OXA-48)	+/-
<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Theileria annulata</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL/carbapenemase positive (TEM-1 (non ESBL), SHV-1 (non ESBL), CTX-M-2 (ESBL), KPC-2)	+/-
<i>Helicobacter pylori</i> J99	-	Tick-Borne encephalitis virus strain Neudorf1	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (TEM, SHV, CTX-M-1, NDM)	+/-
Human Rotavirus A	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> meticillin resistant N315	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Chikungunya virus S27 Petersfield	-	<i>Staphylococcus aureus</i> meticillin resistant ST398	-
<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2c	-	Chikungunya Virus Martinique	-	<i>Staphylococcus aureus</i> meticillin resistant mecC	-
Norovirus GII (II.4 RNA)	-	Chikungunya Virus F24	-	<i>Escherichia coli</i> (Encodes CTX-M-15 ESBL. Plasmid Pek499)	+/-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	Chikungunya Virus WHO IS (R91064)	-	<i>Escherichia coli</i> (colistin resistant. MCR-1 positive)	+/-

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Dengue virus type 1 strain Hawaii A	-	Dengue virus type 3 strain H87	-
<i>Salmonella bongori</i> serovar 66:z41	-	Dengue virus type 2 strain New Guinea C	-	Dengue virus type 4 strain H241	-

Table 5. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit for CTX-M β -lactamase resistance gene was evaluated against the following strains (as templates), showing positive results:

- *Enterobacter cloacae* ESBL/Carbapenemase positive (SHV-12 (ESBL), **CTX-M-9** (ESBL), OXA-48).
- *Enterobacter cloacae* ESBL/Carbapenemase positive (TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), **CTX-M-15** (ESBL), NDM-1).
- *Klebsiella pneumoniae* ESBL/carbapenemase positive (TEM-1 (non ESBL), SHV-1 (non ESBL), **CTX-M-2** (ESBL), KPC-2).
- *Escherichia coli* (encodes **CTX-M-15** ESBL. Plasmid pEK499) (NCTC 13400).
- *Klebsiella pneumoniae* (TEM, SHV, **CTX-M-1**, NDM).

The reactivity of VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit for TEM β -lactamase resistance gene was evaluated against the following strains (as templates), showing positive results:

- *Enterobacter cloacae* ESBL/Carbapenemase positive (**TEM-1** (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL), NDM-1).
- *Escherichia coli* carbapenemase positive (**TEM-1** (non ESBL), IMP-1).
- *Klebsiella pneumoniae* ESBL/carbapenemase positive (**TEM-1** (non ESBL), SHV-1 (non ESBL), CTX-M-2 (ESBL), KPC-2).
- *Escherichia coli* (encodes CTX-M-15 ESBL. **Plasmid pEK499**) (NCTC 13400).

The reactivity of VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit for SHV β -lactamase resistance gene was evaluated against the following strains (as templates), showing positive results:

- *Enterobacter cloacae* ESBL/Carbapenemase positive (**SHV-12** (ESBL), CTX-M-9 (ESBL), OXA-48).
- *Enterobacter cloacae* ESBL/Carbapenemase positive (TEM-1 (non ESBL), **SHV-12** (ESBL), CTX-M-15 (ESBL), NDM-1).
- *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase positive (**SHV-1** (non ESBL), KPC-3, OXA-48).
- *Klebsiella pneumoniae* ESBL/carbapenemase positive (TEM-1 (non ESBL), **SHV-1** (non ESBL), CTX-M-2 (ESBL), KPC-2).

The reactivity of VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit for Colistin resistance was evaluated against the following strain (as template), showing positive results:

- *Escherichia coli* colistin resistant (MCR-1 positive) (NCTC 13846).

ANNEX 1

OPEN FORMAT AND ROTOR-GENE FORMAT

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS- BLC101L
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS- BLC101H
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS- BLC106L
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS- BLC106H
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS- BLC112L
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS- BLC112H
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS- BLC113L
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS- BLC113H
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- BLC101
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- BLC136
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- BLC172

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format.

Target	Channel	Gene
CTX resistance gene	FAM	<i>Bla_{CTX-M1}</i> , <i>Bla_{CTX-M9}</i> , (Cluster A or <i>Bla_{CTX-M-A}</i>) and <i>Bla_{CTX-M2}</i> , <i>Bla_{CTX-M8}</i> , <i>Bla_{CTX-M25}</i> (Cluster B or <i>Bla_{CTX-M-B}</i>)
<i>mcr-1</i> resistance gene	Cy5	<i>mcr-1</i> gene
SHV resistance gene	ROX	<i>Bla_{SHV}</i> gene
TEM resistance gene	HEX, VIC or JOE*	<i>Bla_{TEM}</i> gene

Table A1 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult the website www.cerTEST.es.

A1.2 Reagents provided

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A1.3, A1.4 and A1.5. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A1.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. Table A1.4 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices. Table A1.5 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.cerTEST.es).

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
CTX, TEM, SHV & mcr 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	1/6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
CTX, TEM, SHV & mcr Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	1/6/12 x 8-cap strip

Table A1 3. Reagents and materials provided in VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-BLC101L, VS-BLC101H, VS-BLC106L, VS-BLC106H, VS-BLC112L and VS-BLC112H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
CTX, TEM, SHV & mcr 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers a in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
CTX, TEM, SHV & mcr Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 x 8-cap strip

Table A1 4. Reagents and materials provided in VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-BLC113L and VS-BLC113H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
CTX, TEM, SHV & mcr 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	Transparent	2/9/18 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
CTX, TEM, SHV & mcr Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	2/9/18 X 4-cap strip

Table A1 5. Reagents and materials provided in VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-BLC101, VS-BLC136 and VS-BLC172. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

A1.3 Test procedure

A1.3.1 Lyophilized positive control

CTX, TEM, SHV & mcr 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 CTX, TEM, SHV & mcr 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 -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A1.3.2 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 *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

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

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

Table A1 6. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*CTX* gene resistance), ROX (*SHV* gene resistance), Cy5 (*mcr-1* gene resistance) and HEX, JOE or VIC (*TEM* resistance gene). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ANNEX 2

TUBE FORMAT

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS- BLC196T

Table A2. 1.References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format.

Target	Channel	Gene
CTX resistance gene	FAM	<i>Bla_{CTX-M1}</i> , <i>Bla_{CTX-M9}</i> , (Cluster A or <i>Bla_{CTX-M-A}</i>) and <i>Bla_{CTX-M2}</i> , <i>Bla_{CTX-M8}</i> , <i>Bla_{CTX-M25}</i> (Cluster B or <i>Bla_{CTX-M-B}</i>)
<i>mcr-1</i> resistance gene	Cy5	<i>mcr-1</i>
SHV resistance gene	ROX	<i>Bla_{SHV}</i> gene
TEM resistance gene	HEX, VIC or JOE*	<i>Bla_{TEM}</i> gene

Table A2. 2.Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, channel, to check most common detection channels consult website www.ceratest.es.

A2.2 Reagents provided

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A2.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
CTX, TEM, SHV & mcr Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	4 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
CTX, TEM, SHV & mcr Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL

Table A2. 3. Reagents and materials provided in VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-BLC196T.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilized positive control

CTX, TEM, SHV & mcr 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 CTX,

TEM, *SHV* & *mcr* 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 -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A2.3.2 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C±5°C or 2-8°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

A2.3.3 PCR protocol

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the tubes with caps or seal the plate. Centrifuge briefly.

Load the plate, the strips, or tube in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

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

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

Table A2. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*CTX* gene resistance), ROX (*SHV* gene resistance), Cy5 (*mcr-1* gene resistance) and HEX, JOE or VIC (*TEM* resistance gene). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit es una prueba de PCR en tiempo real diseñada para la detección cualitativa y diferenciación de genes específicos de β -lactamasas CTX-M, TEM y SHV; y *mcr-1 colistina* de la familia de bacterias gramnegativas asociados a resistencias en muestras de cultivos de sangre (hemocultivos) e hisopos como biopsia, hisopos de glúteos, hisopos de úlceras, hisopos de heridas, hisopos conjuntivos, hisopos de lengua, hisopos de líquido articular, hisopos orales, hisopos de cabello, hisopos perineales, hisopos uretrales e hisopos de abscesos de pacientes con sospecha de infección bacteriana y/o infección multiresistente o colonización y muestras de hisopos para control epidemiológico como hisopos nasales, faríngeos, rectales, hisopos axilares, hisopos inguinales, hisopos epiteliales, hisopos de colostomía, hisopos de estoma, BAS, BAL y muestras de esputo por su profesional de la salud. Esta prueba está destinada a ser usada tanto como ayuda en el diagnóstico de genes CTX-M, TEM y SHV; y *mcr-1* específicos de familias bacterias que presentan resistencia en muestras clínicas como para la vigilancia e identificación oportuna de infecciones resistentes a antibióticos y colonización, en combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de hemocultivos y de muestras de hisopos (nasales, faríngeos y rectales). La detección se lleva a cabo mediante el uso de oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (quencher) para detectar los genes de resistencia CTX-M, TEM, SHV y *mcr-1*.

2. Introducción y explicación

Los β -lactámicos son la clase de antibióticos más utilizada. Desde el descubrimiento de la bencilpenicilina en la década de 1920, se han descubierto nuevos derivados de penicilina y clases de cefalosporinas, cefamicinas, monobactámicos y carbapenémicos relacionados con β -lactámicos. Cada nueva clase de β -lactámicos se ha desarrollado para aumentar el espectro de actividad para incluir especies bacterianas adicionales o para abordar mecanismos de resistencia específicos que han surgido en la población bacteriana objetivo. La resistencia a los β -lactámicos se debe principalmente a las enzimas β -lactamasas producidas por bacterias que hidrolizan el anillo de β -lactámicos, lo que inactiva el fármaco. El esfuerzo más reciente para eludir la resistencia es el desarrollo de nuevos inhibidores de β -lactamasas de amplio espectro que funcionan contra muchas β -lactamasas problemáticas, incluidas las cefalosporinasas y las carbapenemasas basadas en serina, que limitan severamente las opciones terapéuticas.

Por otro lado, actualmente solo están disponibles comercialmente dos polimixinas, la polimixina E (colistina) y la polimixina B. La colistina ha resurgido como un tratamiento de última esperanza a mediados de la década de 1990 contra patógenos gramnegativos multiresistentes debido al desarrollo de bacterias gramnegativas ampliamente resistentes a los medicamentos. Lamentablemente, tras su resurgimiento ha surgido una rápida resistencia mundial a la colistina. Se han caracterizado diferentes mecanismos de resistencia a la colistina, incluidos mecanismos intrínsecos, mutacionales y transferibles.

Los patógenos multiresistentes son un grave problema que no solo dificultan el tratamiento sino que empeoran el pronóstico de los pacientes infectados.

La detección de los genes ESBL comunes como *TEM*, *SHV* y *CTX-M* por métodos moleculares en las bacterias productoras de ESBL y sus patrones de resistencia a los antimicrobianos puede proporcionar información útil sobre su epidemiología y puede ayudar a una terapia antimicrobiana racional.

3. Procedimiento

VIASURE *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de genes específicos de la familia *CTX-M*, *TEM* y *SHV* en bacterias gramnegativas asociados a resistencias en muestras clínicas. Después del aislamiento del DNA, la detección de genes de resistencias a β -lactamasas (*CTX-M*, *TEM*, *SHV*) y colistina (*mcr-1*) se lleva a cabo mediante la amplificación de las regiones conservadas de los genes de resistencias *BlaCTX-M1*, *BlaCTX-M9*, (*Cluster A* o *BlaCTX-M-A*), *BlaCTX-M-2*, *BlaCTX-M-8*, *BlaCTX-M25* (*Cluster B* o *BlaCTX-M-B*), *BlaTEM*, *BlaSHV* para la resistencia a β -lactamasas y el gen *mcr-1* para la resistencia a colistina, utilizando oligonucleótidos específicos y sondas marcadas con fluorescencia.

VIASURE *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Real Time PCR Detection Kit utiliza 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 *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Real Time PCR Detection Kit incluye los materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para productos "open format" y "rotor-gene format", el Anexo 2 para productos en formato de tubo.

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 *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexos 2 y 4).
- Kit de extracción de DNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: -30°C a -10°C y/o $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20 μL , 20-200 μL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®). Solo para formato Rotor Gene (Anexos 1 y 3).

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology), DTLite Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology), Rotor-Gene® Q (Qiagen), Cobas z 480 Analyzer (Roche Molecular Diagnosis), VIASURE V-Lab96 Cycler (CerTest Biotec S.L.) y AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies).

Para comprobar la compatibilidad del termociclador y los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es.

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test VIASURE Real Time PCR Detection Kits. Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.

- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.
- Para kits en formato tubo: Una vez el vial CTX, TEM, SHV & mcr Reaction-Mix ha sido reconstituido puede mantenerse a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.

- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- 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.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para referencias: VS-BLC113L, VS-BLC113H, VS-BLC136 y VS-BLC172,). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- 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 y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para VS-BLC101, VS-BLC136 y VS-BLC172 (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas, así como para evitar la contaminación.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- 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. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo de dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit y cualquier otro reactivo y equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas 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.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

- De conformidad con el Reglamento (CE) n° 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad debido a que se clasifican como no peligroso para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) n° 1272/2008 (CLP) o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para productos "open format" y "rotor-gene format", el Anexo 2 para formato de tubo.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en hemocultivos y muestras de hisopo como biopsia, hisopos de glúteos, hisopos de úlceras, hisopos de heridas, hisopos conjuntivos, hisopos de lengua, hisopos de líquido articular, hisopos orales, hisopos de cabello, hisopos perineales, hisopos uretrales, hisopos de abscesos, hisopos nasales, faríngeos, rectales, hisopos axilares, hisopos inguinales, hisopos epiteliales, hisopos de colostomía, hisopos de estoma, BAS, BAL y muestras de esputo. Las muestras de hisopos recogidos en medio de transporte AMIES (DeltaLab). Otros tipos de muestras deben ser validados por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, la sangre y los hisopos (nasales, faríngeos y rectales) se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra), y ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los especímenes pueden ser transportados a temperatura ambiente hasta 2 horas, conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Para transportes largos de duración mayor de 2 horas, se recomienda realizar el envío a -20°C o menos. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse congeladas a -20°C o idealmente a -80°C °C (si el medio lo permite) para su conservación durante un tiempo prolongado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben ser recogidas, transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas. Para más detalle, consulte la guía IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94) y García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. 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 puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático o 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:

- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

9. Interpretación de resultados

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

Se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. Utilizar la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la ejecución (antes de la interpretación de los resultados de la muestra del paciente), para asegurarse de que los umbrales caen dentro de la fase exponencial de las curvas de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo. El valor umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a diferentes intensidades de señal.

El uso de controles positivos y negativos en cada run valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para CTX, TEM, SHV and mcr en el pocillo de control positivo.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	Gen de Resistencia CTX (<i>Bla_{CTX-M-A}</i> and <i>Bla_{CTX-M-B}</i>) (FAM) ¹	Gen de Resistencia <i>mcr-1</i> (Cy5) ¹	Gen de Resistencia SHV (<i>Bla_{SHV}</i>) (ROX) ¹	Gen de Resistencia TEM (<i>Bla_{TEM}</i>) (HEX) ¹	Interpretación de los Controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	>40 o sin señal	>40 o sin señal	>40 o sin señal	>40 o sin señal	Válido

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles. Ct valores. sin señal = sin curva de amplificación.

¹ En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal), todos los resultados se consideran "no válidos" y se requiere repetir el ensayo.

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, use la siguiente tabla:

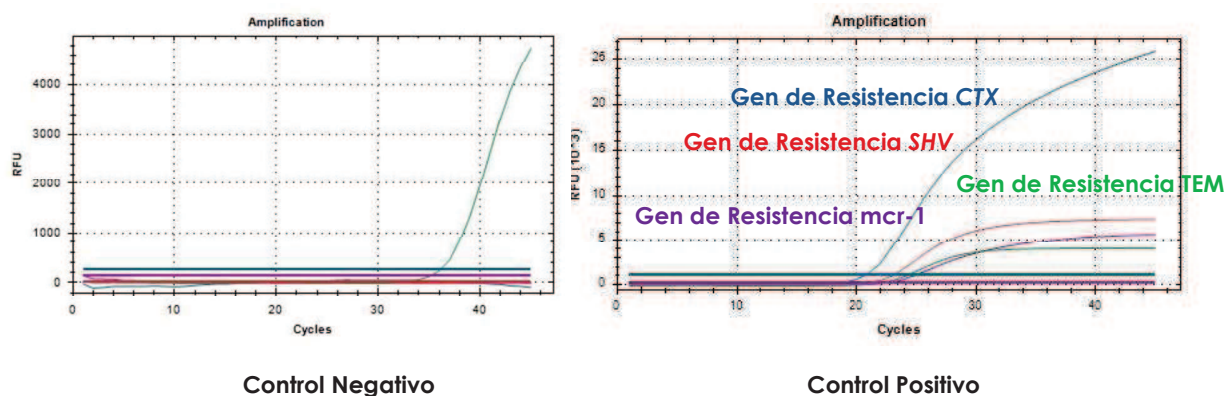
Gen de Resistencia CTX (<i>Bla_{CTX-M-A}</i> and <i>Bla_{CTX-M-B}</i>) (FAM)	Gen de Resistencia <i>mcr-1</i> (Cy5)	Gen de Resistencia SHV (<i>Bla_{SHV}</i>) (ROX)	Gen de Resistencia TEM (<i>Bla_{TEM}</i>) (HEX)	Interpretación de muestras individuales de pacientes	
≤37	>40 o sin señal	>35 o sin señal	>30 o sin señal	Válido	DNA del gen de resistencia CTX Detectado
≤37	≤40	>35 o sin señal	>30 o sin señal	Válido	DNA del gen de resistencia CTX y <i>mcr-1</i> Detectado
≤37	≤40	≤35	>30 o sin señal	Válido	DNA del gen de resistencia CTX, <i>mcr-1</i> y SHV Detectado
≤37	≤40	≤35	≤30	Válido	DNA del gen de resistencia CTX, <i>mcr-1</i> , SHV y TEM Detectado
≤37	>40 o sin señal	≤35	>30 o sin señal	Válido	DNA del gen de resistencia CTX y SHV Detectado
≤37	>40 o sin señal	>35 o sin señal	≤30	Válido	DNA del gen de resistencia CTX y TEM Detectado
>37 o sin señal	≤40	>35 o sin señal	>30 o sin señal	Válido	DNA del gen de resistencia <i>mcr-1</i> Detectado
>37 o sin señal	≤40	≤35	>30 o sin señal	Válido	DNA del gen de resistencia <i>mcr-1</i> y SHV Detectado
>37 o sin señal	≤40	>35 o sin señal	≤30	Válido	DNA del gen de resistencia <i>mcr-1</i> y TEM Detectado
>37 o sin señal	≤40	≤35	≤30	Válido	DNA del gen de resistencia <i>mcr-1</i> , SHV y TEM Detectado
>37 o sin señal	>40 o sin señal	≤35	>30 o sin señal	Válido	DNA del gen de resistencia SHV Detectado
>37 o sin señal	>40 o sin señal	≤35	≤30	Válido	DNA del gen de resistencia SHV y TEM Detectado
≤37	>40 o sin señal	≤35	≤30	Válido	DNA del gen de resistencia CTX, SHV y TEM Detectado
>37 o sin señal	>40 o sin señal	>35 o sin señal	≤30	Válido	DNA del gen de resistencia TEM Detectado
>37 o sin señal	>40 o sin señal	>35 o sin señal	>30 o sin señal	Válido	Dianas no detectadas

Tabla 2. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct valores. sin señal = sin curva de amplificación.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario; verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- Repetir la qPCR con la misma muestra de DNA aislada, o
- Volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra o,
- Obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

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



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 DNA extraído de hemocultivos y muestras de hisopos como biopsia, hisopos de glúteos, hisopos de úlceras, hisopos de heridas, hisopos conjuntivos, hisopos de lengua, hisopos de líquido articular, hisopos orales, hisopos de cabello, hisopos perineales, hisopos uretrales, hisopos de abscesos, hisopos nasales, faríngeos, rectales, hisopos axilares, hisopos inguinales, hisopos epiteliales, hisopos de colostomía, hisopos de estoma, BAS, BAL y muestras de esputo.
- 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.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.
- 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 genes de resistencia a β -lactamasas (*CTX-M*, *TEM*, *SHV*) y colistina (*mcr-1*) ya sea a causa de muestras con una elevada concentración de DNA diana o por contaminación a causa de productos de la PCR de reacciones previas.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Degradación del DNA bacteriano durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de nuevas o desconocidas mutaciones de resistencias a β -lactamasas (*CTX-M*, *TEM*, *SHV*) y colistina (*mcr-1*).
 - Una carga bacteriana en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de los antibióticos utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma.

- No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de bacterias viables y no implica que estas bacterias sean infecciosas o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de genes de resistencia en las bacterias.
- Resultados negativos no excluyen padecer infección bacteriana por genes de resistencia a β -lactamasas (CTX-M, TEM, SHV) y colistina (*mcr-1*) y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de la carga bacteriana durante las infecciones causadas bacterias con genes de resistencia a β -lactamasas (CTX-M, TEM, SHV) y colistina (*mcr-1*). La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar los genes de resistencia.
- Si las pruebas de diagnóstico para resistencias a β -lactamasas (CTX-M, TEM, SHV) y colistina (*mcr-1*) son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por bacterias resistentes, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado, sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.

11. Control de calidad

VIASURE CTX, TEM, SHV & *mcr* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

La sensibilidad y especificidad clínica de VIASURE CTX, TEM, SHV & *mcr* Real Time PCR Detection Kit fueron evaluadas utilizando muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección bacteriana resistente y control epidemiológico. Para determinar la precisión del diagnóstico clínico se han realizado diferentes evaluaciones multicéntricas en colaboración con entidades nacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de los sitios, el tipo de muestra y el flujo de trabajo:

Lugar		Tipo de muestra	Proceso	Diana
1 Hospital Royo Villanova (Zaragoza, Spain) and CerTest facilities.	a	Hemocultivo	MagDEA Dx SV kit, utilizando magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.) + DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	CTX
				TEM
				SHV
				<i>mcr-1</i>
	b	Muestras de hisopos*	MagDEA Dx SV kit, utilizando magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.) + DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	CTX
				TEM
				SHV
				<i>mcr-1</i>

Tabla 3. Lugar, muestras, proceso y diana.

*Muestras como biopsia, hisopos de glúteos, hisopos de úlceras, hisopos de heridas, hisopos conjuntivos, hisopos de lengua, hisopos de líquido articular, hisopos orales, hisopos de cabello, hisopos perineales, hisopos uretrales, hisopos de abscesos, hisopos nasales, faríngeos, rectales, hisopos axilares, hisopos inguinales, hisopos epiteliales, hisopos de colostomía, hisopos de estoma, BAS, BAL y muestras de esputo.

Los verdaderos valores positivos y negativos, los valores de falsos positivos y negativos, la sensibilidad, especificidad, PPV, NPV para VIASURE CTX, TEM, SHV & *mcr* Real Time PCR Detection Kit fueron calculados en relación con cada ensayo de comparación como se muestra en la siguiente tabla:

Lugar	Ensayo Comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
1a	Cultivo	CTX	17	401	0	0	1 (0.80-1)	1 (0.99-1)	1 (0.81-1)	1 (0.99-1)
		TEM	54	364	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.99-1)	1 (0.93-1)	1 (0.99-1)
		SHV	26	392	0	0	1 (0.86-1)	1 (0.99-1)	1 (0.87-1)	1 (0.99-1)
	ARM-D® Kit, TEM/SHV/GES Detected Variants (STRECK) and ARM-D® Kit, β-Lactamase Detected Variants (STRECK)	CTX	17	68	0	0	1 (0.80-1)	1 (0.94-1)	1 (0.80-1)	1 (0.94-1)
		TEM	54	31	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.88-1)	1 (0.93-1)	1 (0.88-1)
		SHV	26	59	0	0	1 (0.86-1)	1 (0.93-1)	1 (0.86-1)	1 (0.93-1)
1b	Cultivo	CTX	97	548	0	0	1 (0.96-1)	1 (0.99-1)	1 (0.96-1)	1 (0.99-1)
		TEM	181	464	0	0	1 (0.98-1)	1 (0.99-1)	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)
		SHV	126	519	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)
	ARM-D® Kit, TEM/SHV/GES Detected Variants (STRECK) and ARM-D® Kit, β-Lactamase Detected Variants (STRECK)	CTX	97	548	0	0	1 (0.96-1)	1 (0.99-1)	1 (0.96-1)	1 (0.99-1)
		TEM	181	464	0	0	1 (0.98-1)	1 (0.99-1)	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)
		SHV	126	519	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)

Tabla 4. Valores de verdadero positivo (TP) y negativo (TN), valores de falso positivo (FP) y falso negativo (FN), sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (PPV), valores predictivos negativos (NPV) para VIASURE CTX, TEM, SHV & *mcr* Real Time PCR Detection Kit.

Los resultados muestran un alto nivel de concordancia para la detección de los genes de resistencia a β -lactamasas (*CTX-M*, *TEM*, *SHV*) and colistina (*mcr-1*) utilizando VIASURE *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de 0.02 UFC por reacción para el gen de resistencia a β -lactamasas *CTX* (*BlaCTX-M1*, *BlaCTX-M9*, (Cluster A o *BlaCTX-M-A*) y *BlaCTX-M2*, *BlaCTX-M8*, *BlaCTX-M25* (Cluster B o *BlaCTX-M-B*)), 0.08 UFC por reacción para el gen de resistencia a β -lactamasa tipo *TEM* (*BlaTEM* gen), 8.75 copias por reacción para el gen de resistencia a β -lactamasas tipo *SHV* (*Bla_{SHV}* gen), y 0.02 UFC por reacción para el gen de resistencia a colistina *mcr-1*, con una tasa de positividad del 95%.

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar de los genes *CTX-M-1* y *CTX-M-9* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal FAM).

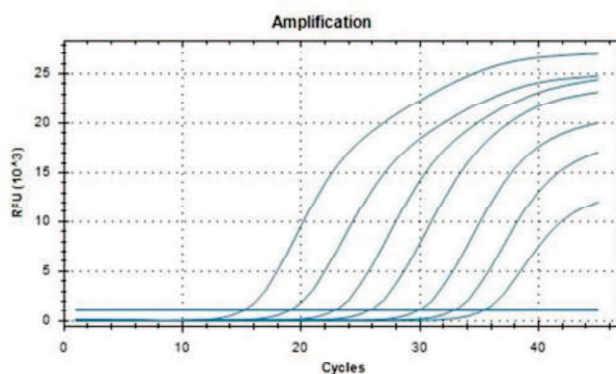


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar del los genes *CTX-M-2*, *CTX-M-8* y *CTX-M-25* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal FAM).

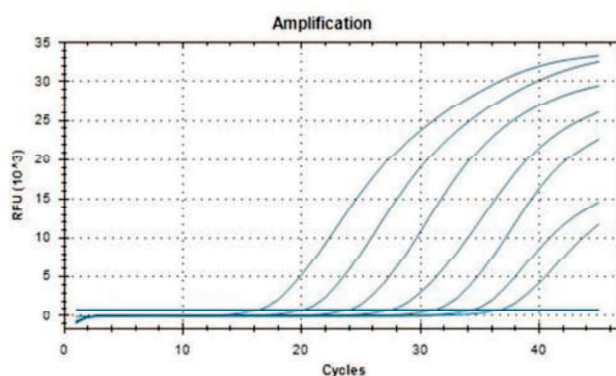


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar del gen *SHV* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal ROX).

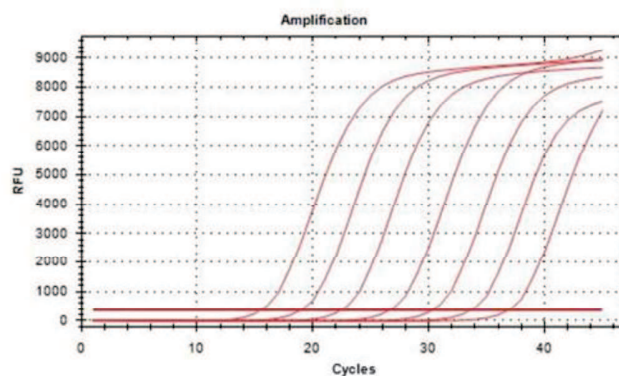


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar del gen *mcr-1* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal Cy5).

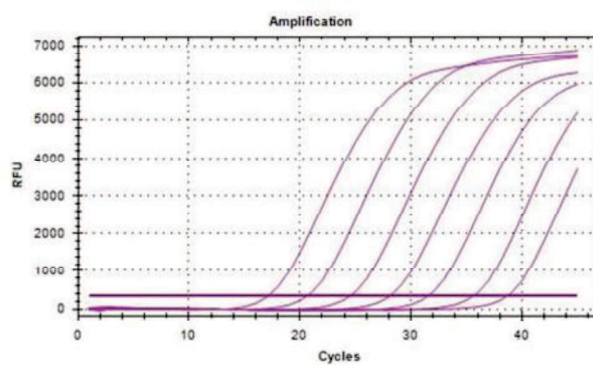
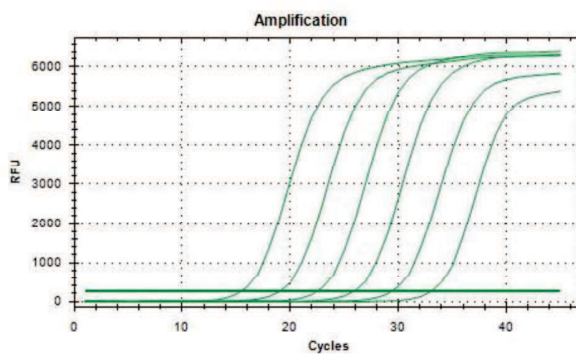


Figura 7. Diluciones seriada de un estándar del gen *TEM* (10^7 - 10^1 Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal HEX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad de VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos asociados a enfermedades gastrointestinales, microorganismos transmitidos por sangre y microorganismos asociados a resistencias. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Prueba de reactividad cruzada					
Human Adenovirus type 1, 3 4, 5 8, 13, 31, 40 and 41	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>enteritidis</i>	-	Japanese encephalitis	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> . Serotype 4,5,12:i:1,2	-	Japanese encephalitis virus strain Nakayama	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>gallinarum</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> strain 3D7	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>pullorum</i>	-	Rift Valley Fever Virus AR21229	-
Astrovirus genotype I-VIII	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>paratyphi A</i>	-	Rift Valley Fever Virus MP12	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>paratyphi B</i>	-	St Louis Encephalitis Virus	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhi</i>	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	Sapovirus	-	<i>Usutu Virus</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	West Nile virus strain NY99	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 1	-	West Nile virus strain Heja	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-	West Nile virus strain Ug 37	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Yellow Fever Virus strain 17D	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O1:K1	-	Yellow Fever Virus strain French Neurotropic	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-	Zika virus strain FB-GWUH-2016	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-	Zika Virus African strain	-
<i>Clostridium difficile</i> O:27	-	<i>Anaplasma marginale</i>	-	Zika Virus Asian strain PF13/251013-18	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Bartonella henselae</i> strain Houston-1	-	Zika Virus French Polynesian strain 11474/16	-
Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Borrelia hermsii</i>	-	Zika Virus French Polynesian strain 11468/16	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Borrelia lusitanae</i>	-	<i>Citrobacter brakii</i> carbapenemase positive (VIM-1)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Borrelia valaisiana</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i> ESBL/Carbapenemase positive	+/-

				(TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL), NDM-1)	
<i>Echovirus 30</i>	-	<i>Borrelia azfeli</i> strain P-Ko/1984	-	<i>Enterococcus avium</i> vancomycin A resistant	-
<i>Entamoeba dispar</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Borrelia bavariensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> vancomycin A resistant	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Borrelia bisetti</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> vancomycin B resistant (equivalent to ATCC51299)	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Borrelia burgdorferi</i> strain IRS	-	<i>Enterococcus faecium</i> vancomycin A resistant LMG16165	-
<i>Enterovirus 68</i> and 71	-	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> strain B31	-	<i>Enterococcus faecium</i> vancomycin A resistant IOWA1	-
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> serotype O157:H7	-	<i>Borrelia garinii</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> S + <i>Enterococcus gallinarum</i> vancomycin C resistant (MI12043391 + LMG16289)	-
Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Borrelia japonica</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> vancomycin B and C resistant ENT20120142	-
Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	<i>Escherichia coli</i> carbapenemase positive (OXA-244)	-
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> serotype O25:H42	-	<i>Borrelia spielmanii</i>	-	<i>Escherichia coli</i> carbapenemase positive (TEM-1 (non ESBL), IMP-1)	+/-
<i>Giardia intestinalis</i> strain WB clone C6	-	<i>Coxiella burnetii</i> strain Nine Mile Q	-	<i>Helicobacter pylori</i> claritromycin resistant A2146G	-
<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Leptospira</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i> claritromycin resistant A2147G	-
<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	<i>Rickettsia conorii</i> strain Moroccan	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase positive (SHV-1 (non ESBL), KPC-3, OXA-48)	+/-
<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Theileria annulata</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL/carbapenemase positive (TEM-1 (non ESBL), SHV-1 (non ESBL), CTX-M-2 (ESBL), KPC-2)	+/-
<i>Helicobacter pylori</i> J99	-	Tick-Borne encephalitis virus strain Neudorfl	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (TEM, SHV, CTX-M-1, NDM)	+/-
Human Rotavirus A	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> met icilin resistant N315	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Chikungunya virus S27 Petersfield	-	<i>Staphylococcus aureus</i> met icilin resistant ST398	-
<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2c	-	Chikungunya Virus Martinique	-	<i>Staphylococcus aureus</i> met icilin resistant mecC	-
Norovirus GII (II.4 RNA)	-	Chikungunya Virus F24	-	<i>Escherichia coli</i> (Encodes CTX-M-15 ESBL. Plasmid Pek499)	+/-

<i>Proteus vulgaris</i>	-	Chikungunya Virus WHO IS (R91064)	-	<i>Escherichia coli</i> (colistin resistant. MCR-1 positive)	+/-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Dengue virus type 1 strain Hawaii A	-	Dengue virus type 3 strain H87	-
<i>Salmonella bongori</i> serovar 66:z41	-	Dengue virus type 2 strain New Guinea C	-	Dengue virus type 4 strain H241	-

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

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit para la detección del gen de resistencia a β -lactamasa CTX-M se evaluó frente a las siguientes cepas (como modelo, mostrando resultados positivos).

- *Enterobacter cloacae* ESBL/Carbapenemasa positiva (SHV-12 (ESBL), **CTX-M-9** (ESBL), OXA-48).
- *Enterobacter cloacae* ESBL/ Carbapenemasa positiva (TEM-1 (no ESBL), SHV-12 (ESBL), **CTX-M-15** (ESBL), NDM-1).
- *Klebsiella pneumoniae* ESBL/ Carbapenemasa positiva (TEM-1 (no ESBL), SHV-1 (no ESBL), **CTX-M-2** (ESBL), KPC-2).
- *Escherichia coli* (encodes **CTX-M-15** ESBL. Plásmido pEK499) (NCTC 13400).
- *Klebsiella pneumoniae* (TEM, SHV, **CTX-M-1**, NDM).

La reactividad de VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit para la detección del gen de resistencia a β -lactamasa TEM se evaluó frente a las siguientes cepas (como modelo, mostrando resultados positivos).

- *Enterobacter cloacae* ESBL/ Carbapenemasa positiva (**TEM-1** (no ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL), NDM-1).
- *Escherichia coli* carbapenemase positive (**TEM-1** (no ESBL), IMP-1).
- *Klebsiella pneumoniae* ESBL/ Carbapenemasa positiva (**TEM-1** (no ESBL), SHV-1 (no ESBL), CTX-M-2 (ESBL), KPC-2).
- *Escherichia coli* (encodes CTX-M-15 ESBL. **Plasmid pEK499**) (NCTC 13400).

La reactividad de VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit para la detección del gen de resistencia a β -lactamasa SHV se evaluó frente a las siguientes cepas (como modelo, mostrando resultados positivos).

- *Enterobacter cloacae* ESBL/ Carbapenemasa positiva (**SHV-12** (ESBL), CTX-M-9 (ESBL), OXA-48).
- *Enterobacter cloacae* ESBL/ Carbapenemasa positiva (TEM-1 (non ESBL), **SHV-12** (ESBL), CTX-M-15 (ESBL), NDM-1).
- *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasa positiva (**SHV-1** (no ESBL), KPC-3, OXA-48).
- *Klebsiella pneumoniae* ESBL/ Carbapenemasa positiva (TEM-1 (no ESBL), **SHV-1** (no ESBL), CTX-M-2 (ESBL), KPC-2).

La reactividad de VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit para la detección del gen de resistencia a colistina se evaluó frente a las siguientes cepas (como modelo, mostrando resultados positivos).

- *Escherichia coli* colistin resistente (MCR-1 positivo) (NCTC 13846).

ANEXO 1

OPEN Y ROTOR-GENE FORMAT

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS- BLC101L
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS- BLC101H
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS- BLC106L
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS- BLC106H
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS- BLC112L
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS- BLC112H
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS- BLC113L
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS- BLC113H
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- BLC101
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- BLC136
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- BLC172

Tabla A1. 1.Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado.

Diana	Canal	Gen
gen de resistencia CTX	FAM	<i>Bla_{CTX-M1}</i> , <i>Bla_{CTX-M9}</i> , (Cluster A o <i>Bla_{CTX-M-A}</i>) and <i>Bla_{CTX-M2}</i> , <i>Bla_{CTX-M8}</i> , <i>Bla_{CTX-M25}</i> (Cluster B o <i>Bla_{CTX-M-B}</i>)
gen de resistencia <i>mcr-1</i>	Cy5	Gen <i>mcr-1</i>
gen de resistencia SHV	ROX	Gen <i>Bla_{SHV}</i>
gen de resistencia TEM	HEX, VIC or JOE*	Gen <i>Bla_{TEM}</i>

Tabla A1. 2. Diana, canal y genes.

* seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3, A1.4 y A1.5. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos, y por tanto, comercializar en múltiples formatos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.4 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos. La Tabla A1.5 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
CTX, TEM, SHV & mcr 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1/6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
CTX, TEM, SHV & mcr Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	1/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-BLC101L, VS-BLC101H, VS-BLC106L, VS-BLC106H, VS-BLC112L and VS-BLC112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
CTX, TEM, SHV & mcr 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
CTX, TEM, SHV & mcr Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-BLC113L and VS-BLC113H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
CTX, TEM, SHV & mcr 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	2/9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
CTX, TEM, SHV & mcr Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A1 5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-BLC101, VS-BLC136 and VS-BLC172. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0,1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de CTX, TEM, SHV & mcr 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 CTX, TEM, SHV & mcr 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 -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A1.3.2 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 CTX, TEM, SHV & mcr Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

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

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

Tabla A1. 6. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (gen de resistencia CTX), ROX (gen de resistencia SHV), Cy5 (gen de resistencia mcr-1) y HEX, JOE o VIC (gen de resistencia TEM). Dependiendo del equipo usado seleccione el canal de detección adecuado (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

ANEXO 2

FORMATO TUBO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit, 4 tubos x 24 reactions	VS- BLC196T

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado.

Diana	Canal	Gen
gen de resistencia CTX	FAM	<i>Bla_{CTX-M1}</i> , <i>Bla_{CTX-M9}</i> , (Cluster A o <i>Bla_{CTX-M-A}</i>) and <i>Bla_{CTX-M2}</i> , <i>Bla_{CTX-M8}</i> , <i>Bla_{CTX-M25}</i> (Cluster B o <i>Bla_{CTX-M-B}</i>)
gen de resistencia <i>mcr-1</i>	Cy5	Gen <i>mcr-1</i>
gen de resistencia SHV	ROX	Gen <i>Bla_{SHV}</i>
gen de resistencia TEM	HEX, VIC or JOE*	Gen <i>Bla_{TEM}</i>

Tabla A2. 2. Diana, canal y genes.

* seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.cerfest.es.

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
CTX, TEM, SHV & mcr Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	4 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
CTX, TEM, SHV & mcr Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A2. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE CTX, TEM, SHV & mcr Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-BLC196T.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de CTX, TEM, SHV & mcr 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 *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* 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 -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrir y manipular el tubo *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Reaction-Mix en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A2.3.3 Protocolo PCR

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL de *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *CTX*, *TEM*, *SHV* & *mcr* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los tubos con los tapones o sellar la placa. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

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

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











Tabla A2. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (gen de resistencia CTX), ROX (gen de resistencia SHV), Cy5 (gen de resistencia mcr-1) y HEX, JOE o VIC (gen de resistencia TEM). Dependiendo del equipo usado seleccione el canal de detección adecuado (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

Bibliography/Bibliografía

- Centers for Disease Control and Prevention (<https://www.cdc.gov/>)
- World Health Organization (<http://www.who.int/en/>)
- Roschanski N, Fischer J, Guerra B, Roesler U. Development of a multiplex real-time PCR for the rapid detection of the predominant beta-lactamase genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-type AmpCs in Enterobacteriaceae. PLoS One. 2014 Jul 17;9(7):e100956. doi: 10.1371/journal.pone.0100956. PMID: 25033234; PMCID: PMC4102473.
- Irrgang A, Roschanski N, Tenhagen BA, Grobbel M, Skladnikiewicz-Ziemer T, Thomas K, Roesler U, Käsbohrer A. Prevalence of mcr-1 in E. coli from Livestock and Food in Germany, 2010-2015. PLoS One. 2016 Jul 25;11(7):e0159863. doi: 10.1371/journal.pone.0159863. PMID: 27454527; PMCID: PMC4959773.
- Tolosi R. Rapid detection and quantification of plasmid-mediated colistin resistance genes (mcr-1 to mcr-5) by real-time PCR in bacterial and environmental samples. Journal of Applied Microbiology. 2020 2 June. doi:10.1111/jam.14738.
- Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: origin and diffusion. Frontiers in microbiology. 2012 April. doi: 10.3389/fmicb.2012.00110.
- El-Sayed Ahmed, M. A. E. G., Zhong, L. L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., & Tian, G. B. (2020). Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 868–885. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Occurrence of the CTX-M, SHV and the TEM Genes Among the Extended Spectrum β -Lactamase Producing Isolates of Enterobacteriaceae in a Tertiary Care Hospital of North India. *J Clin Diagn Res*. 2013 Apr; 7(4): 642–645. Published online 2013 Apr 1. doi: [10.7860/JCDR/2013/5081.2872](https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5081.2872)

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

 In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Keep dry Almacenar en lugar seco	 Use by Fecha de caducidad	 Manufacturer Fabricante	 Batch code Número de lote
 Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	 Temperature limitation Limitación de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	 Unique Device Identification Identificación única de dispositivo	 Catalogue number Número de referencia

Trademarks

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

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

Change Control / Control de Cambios		
Version No. / Versión nº	Changes / Cambios	Fecha / Date
00	Original Version / Versión Original	16/05/2022

Table A 3. Control change table / Tabla de Control de Cambios.

Revision: 16th May 2022

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead

