

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*

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 WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 1) / FORMATO OPEN Y ROTOR-GENE CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CPE106L
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CPE106H
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CPE112L
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CPE112H
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CPE136
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-CPE101L
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-CPE101H
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CPE101

Table A 1. References for Open and Rotor-Gene format with internal control products. / Referencias para productos Open and Rotor-Gene Format con control interno.

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 2) / FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 2)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CPE148T

Table A 2. References for Tube format with internal control products. / Referencias para productos formato Tubo con control interno.

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL (SEE ANNEX 3) / OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 3)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CPE106LE
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CPE106HE
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CPE112LE
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CPE112HE
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CPE136E
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-CPE101HE
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-CPE101LE
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CPE101E

Table A 3. References for Open and Rotor-Gene format with extraction control products. / Referencias para productos Open and Rotor-Gene Format con control de extracción.

TUBE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL (SEE ANNEX 4) / FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 4)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CPE148TE

Table A4 References for Tube format with extraction control products. / Referencias para productos formato Tubo con control de extracción.

Content

1.	Intended use	7
2.	Summary and Explanation	7
3.	Principle of the procedure	8
4.	Reagents provided	9
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	9
6.	Transport and storage conditions	10
7.	Precautions for users	10
8.	Test procedure.....	11
8.1.	Specimen collection, transport and storage	12
8.2.	DNA extraction	12
9.	Result interpretation	13
9.1.	References with internal control (references in Annex 1 and 2).....	13
9.2.	References with extraction control (references in Annex 3 and 4)	15
10.	Limitations of the test	17
11.	Quality control.....	18
12.	Performance characteristics.....	18
12.1.	Clinical sensitivity and specificity	18
12.2.	Analytical sensitivity.....	20
12.3.	Analytical specificity	22
12.4.	Analytical reactivity	22
	ANNEX 1	23
A1.1	Principle of the procedure	23
A1.2	Reagents provided	23
A1.3	Test procedure	24
A1.3.1	Lyophilized positive control.....	24
A1.3.2	PCR protocol	25
	ANNEX 2	26
A2.1	Principle of the procedure	26
A2.2	Reagents provided	26
A2.3	Test procedure	27
A2.3.1	Lyophilized positive control.....	27
A2.3.2	Lyophilized reaction mix tube.....	27
A2.3.3	PCR protocol	27

ANNEX 3	29
A3.1 Principle of the procedure	29
A3.2 Reagents provided	29
A3.3 Test procedure	31
A3.3.1 Lyophilized extraction control	31
A3.3.2 Lyophilized positive control.....	31
A3.3.3 PCR protocol	31
ANNEX 4	33
A4.1 Principle of the procedure	33
A4.2 Reagents provided	33
A4.3 Test procedure	34
A4.3.1 Lyophilized extraction control	34
A4.3.2 Lyophilized positive control.....	34
A4.3.3 Lyophilized reaction mix tube.....	34
A4.3.4 PCR protocol	34

Contenido

1. Uso previsto	36
2. Introducción y explicación	36
3. Procedimiento	37
4. Reactivos suministrados	38
5. Material requerido y no suministrado	38
6. Condiciones de transporte y almacenamiento	39
7. Precauciones para el usuario	39
8. Procedimiento del test.....	41
8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras.....	41
8.2. Extracción de DNA.....	42
9. Interpretación de resultados.....	42
9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)	42
9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)	44
10. Limitaciones del test.....	46
11. Control de calidad.....	48
12. Características del test	48
12.1. Sensibilidad y especificidad clínica	48

12.2.	Sensibilidad analítica	49
12.3.	Especificidad analítica	51
12.4.	Reactividad analítica	52
	ANEXO 1	53
A1.1	Procedimiento.....	53
A1.2	Reactivos suministrados	53
A1.3	Procedimiento del test	55
A1.3.1	Control positivo liofilizado	55
A1.3.2	Protocolo PCR	55
	ANEXO 2	57
A2.1	Procedimiento.....	57
A2.2	Reactivos suministrados	57
A2.3	Procedimiento del test	58
A2.3.1	Control positivo liofilizado	58
A2.3.2	Mezcla de reacción liofilizada	58
A2.3.3	Protocolo PCR	58
	ANEXO 3	60
A3.1	Procedimiento.....	60
A3.2	Reactivos suministrados	60
A3.3	Procedimiento del test	62
A3.3.1	Control de extracción liofilizado	62
A3.3.2	Control positivo liofilizado	62
A3.3.3	Protocolo PCR	62
	ANEXO 4	64
A4.1	Procedimiento.....	64
A4.2	Reactivos suministrados	64
A4.3	Procedimiento del test	65
A4.3.1	Control de extracción liofilizado	65
A4.3.2	Control positivo liofilizado	65
A4.3.3	Mezcla de reacción liofilizada	66
A4.3.4	Protocolo PCR	66
	Bibliography/Bibliografía	67
	Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	68
	Trademarks.....	69

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit is designed for the simultaneous qualitative detection and differentiation of the main carbapenemase-encoding genes (*NDM*, *VIM*, *OXA*, *KPC* and/or *IMP*) from bacterial isolates of clinical samples and directly from rectal swabs from individuals suspected of infection by carbapenem-resistant pathogens by their healthcare professional (HCP). This test is intended for use as an aid in the diagnosis of infection caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from bacterial isolates and rectal swabs samples, amplified using real time PCR, and detected using fluorescent reporter dye probes specific for carbapenemase-encoding genes.

2. Summary and Explanation

Antimicrobial resistance is a major public health problem nowadays, but the resistance to carbapenem antimicrobials is becoming particularly concerning. Carbapenem antibiotics are commonly considered to be the most potent group of antimicrobial agents with proven efficacy in the treatment of patients with severe bacterial infections, including those caused by antimicrobial-resistant strains. However, the recent increase in the global detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) represents one of the most pressing threats to public health. This is mainly due to their implication in numerous outbreaks and Health Care Associated Infection (HAI), which imply longer lengths of stay, increased healthcare costs, and higher mortality than carbapenem-susceptible infections. The current definition of CRE recommended by CDC is an *Enterobacteriaceae* isolate that is resistant to ertapenem, imipenem, meropenem, or doripenem, according to the current Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints, or documentation that the isolate produces carbapenemase (carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* – CPE –). Both the terms CRE and CPE are used sometimes interchangeably, but the former refers to the resistance phenotype, whereas the latter implies the mechanism underlying the phenotype. CPE are mostly CRE that are resistant to carbapenems due to carbapenemase production, which is the most prominent mechanism underlying carbapenem resistance in Gram-negative pathogens.

Enterobacteriaceae is an ubiquitous family of Gram-negative bacteria, from which certain species are part of the normal human flora, but frequently associated to diarrheal disease and extraintestinal infections. They are responsible of a variety of community and healthcare-acquired infections, and a major driving force of resistance is the production of β -lactamases (encoded by *bla* gene). The most frequently occurring species of CRE are *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) and *Escherichia coli* (*E. coli*). While some strains are innately resistant to carbapenems, others contain mobile genetic elements (for example, plasmids, transposons) which can be readily horizontal transmitted between among various bacterial species and genera. The surge in CRE is mostly driven by the emergence and spread of carbapenemases, a specific group of β -lactamases that are capable of hydrolyzing carbapenems, along with other β -lactams. There are currently five major carbapenemases, for which are all on mobile genetic elements: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), New Delhi metallo- β -lactamase (NDM), the carbapenem hydrolyzing oxacillinases (OXA-48 and OXA-48-like), Verona integron-encoded metallo- β -lactamase (VIM) and metallo- β -lactamase active on imipenem (IMP).

The prevalence of CRE and types of carbapenemases is highly dependent on geography, being *K. pneumoniae* the predominant specie of *Enterobacteriaceae* across regions. Increasing trends of invasive isolates of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* were observed from 2012-2015. According to a point prevalence survey of HAI and antimicrobial use in Europe, 18 of 28 countries reported CRE and three countries reported HAI with more than 20% of resistant isolates, with the highest percentage (39.9%) in Greece. In the United States of America (USA), 49.5% of *A. baumannii*, 19.2% of *P. aeruginosa*, 7.9% of *K. pneumoniae* and 0.6% of *E. coli* invasive isolates submitted to the National Healthcare Safety Network were resistant to carbapenems in 2014. KPC is the most common observed carbapenemase, being prevalent in countries like Greece, Italy, Brazil, China, and several others including USA and Colombia. However, while in Indian subcontinent (India, Pakistan, Bangladesh) NDM is the most common carbapenemase, OXA-48 is concentrated in European and Mediterranean countries including North Africa.

The most important source for CRE dissemination is intestinal carriers (infected or colonized people) and their prompt identification is crucial to reduce cross-transmission of CRE through direct person-to-person contact in community and healthcare settings. They primarily affect patients in acute and long-term healthcare settings, who are being treated for another condition, patients who have compromised immune systems or have invasive devices like tubes going into their body. Once these bacteria have spread outside the gut, they could cause serious infections, such as pneumonia, bacteremia, urinary tract infections, wound infections, surgical site infections and meningitis.

The phenotypic methods for identification of CPE, like modified Hodge test, have been considered 'reference' methods, but they may be complex, occasionally inconclusive and time-consuming owing to the wide range of carbapenem minimum inhibitory concentration. Therefore, molecular methods for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) represent an advantageous tool for faster identification of CRE and allow precise differentiation of the carbapenemase type.

NOTE: For a better comprehension of nomenclature, we will refer to carbapenemase-encoding genes as follows:

- *bla_{NDM}*: NDM.
- *bla_{VIM}*: VIM.
- *bla_{OXA-48 like}*: OXA.
- *bla_{KPC}*: KPC.
- *bla_{IMP}*: IMP (IMP-1 cluster + IMP-8 cluster)*.

*IMP-1 cluster includes: IMP-1, IMP-4, IMP-3, IMP-6, IMP-10, IMP-25, IMP-30, IMP-34, IMP-40, IMP-42, IMP-52, IMP-55.

IMP-8 cluster includes: IMP-2, IMP-8, IMP-16, IMP-19, IMP-20, IMP-22, IMP-24.

3. Principle of the procedure

VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit is designed for the qualitative detection and differentiation of carbapenemase-encoding genes (NDM, VIM, OXA, KPC and/or IMP) from bacterial isolates of clinical samples and rectal swabs. After DNA isolation, the identification of carbapenemases is performed by the amplification of a conserved region of the NDM gene, VIM gene, OXA-48 and OXA-48-like genes, KPC gene and IMP gene, using specific primers and a fluorescent-labelled probes.

VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound 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 could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Each kit includes two kinds of multiplex reaction mix, and each one corresponds to one different assay. The first reaction mix detects *NDM* and/or *VIM* carbapenemase-encoding genes (*Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 1) and contains the internal control (IC). The second reaction mix detects *OXA*, *KPC* and/or *IMP* carbapenemase-encoding genes (*Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 2).

4. Reagents provided

VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit includes the materials and reagents detailed in Annex 1 for open and rotor-gene format with internal control products, Annex 2 for tube format with internal control products, Annex 3 for open and rotor-gene format with extraction control products, and Annex 4 for tube format with extraction control 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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 Tubes format (Annex 2 and 4).
- DNA extraction kit.
- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit has been tested on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied BioSystem 7500 RT PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System.

Rotor-Gene® Q (Qiagen), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, Roche Molecular Diagnostics LightCycler 480 II and Mic Real Time PCR Cyclers.

When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommended to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506). 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 of exposure 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Reaction-Mix tube has been reconstituted, it may be kept 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 to 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-CPE136 and VS-CPE136E). Remove any air excess in the pouches prior to closing.
- 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-CPE136 and VS-CPE136E (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 color 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipments 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, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, 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, transport, storage, handling, 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 of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Make sure to use a well for determining *NDM* and *VIM* genes and another well for determining *OXA*, *KPC* and *IMP*. Be careful not to mix them throughout the process.
- 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 with internal control products Test Procedure, Annex 2 for Tube format with internal control products Test Procedure, Annex 3 for Open and rotor-gene format with

extraction control products Test Procedure and Annex 4 for Tube format with extraction control products Test Procedure.

8.1. Specimen collection, transport and storage

The VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit has been tested on bacterial isolates from different clinical samples and rectal swabs. 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, all specimens should be collected and labelled appropriately in clean containers. After collection, specimens should be placed in a biohazard bag and should be transported 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, or at 2 to 8°C for up to 24 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 24 hours), we recommend shipping at -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 24 hours or frozen at -20°C or ideally at -80°C 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 CDC guidelines (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>), 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 bacterial isolates from clinical samples and from rectal swabs, 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:

- GXT NA Extraction kit in GenoXtract® system (Hain), using QIASymphony RGQ® (QIAGEN).
- MagDEA Dx SV Kit, using the magLEAD® 6gC or 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

9. Result interpretation

9.1. References with internal control (references in Annex 1 and 2)

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. Check Internal Control (IC) signal to verify the correct functioning of the amplification mix. 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.

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 Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in the positive control well.

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

Controls	Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1			Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2			Interpretation of Controls
	NDM (FAM) ¹	VIM (ROX) ¹	Internal Control (HEX) ²	OXA (FAM) ¹	KPC (ROX) ¹	IMP (Cy5) ¹	
Positive Control (PC)	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	Valid

Table 1. Expected Performance of Controls

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.

2. The Internal Control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in PC and NC control wells.

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 analyze the results:

Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1			Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2			Result
NDM (FAM)	VIM (ROX)	Internal Control (HEX)	OXA (FAM)	KPC (ROX)	IMP (Cy5)	
≤40	≥40 or no signal	≤40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	NDM-expressing <i>Enterobacteriaceae</i>
≥40 or no signal	≤40	≤40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	VIM-expressing <i>Enterobacteriaceae</i>
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40 or no signal ¹	≤40	≥40 or no signal	≥40 or no signal	OXA-expressing <i>Enterobacteriaceae</i>
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≤40	≥40 or no signal	KPC-expressing <i>Enterobacteriaceae</i>
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40	IMP-expressing <i>Enterobacteriaceae</i>
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤35 ²	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> not detected²
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥ 35 or no signal ²	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	Invalid- Repeat Testing²

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

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

2 In the case of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* target genes negative, IC must show an amplification signal with C_t less than 35. If there is an absence of signal or C_t value ≥ 35 of the Internal Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

Note: One individual patient sample simultaneously can contain several carbapenemase-encoding genes. Table 2 shows only the most representative results that can be expected with the VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit.

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.

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

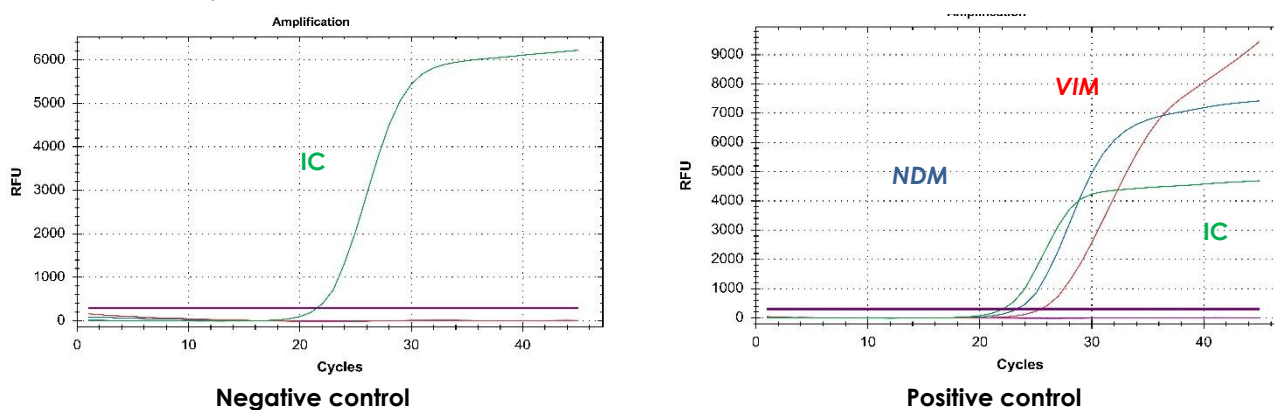
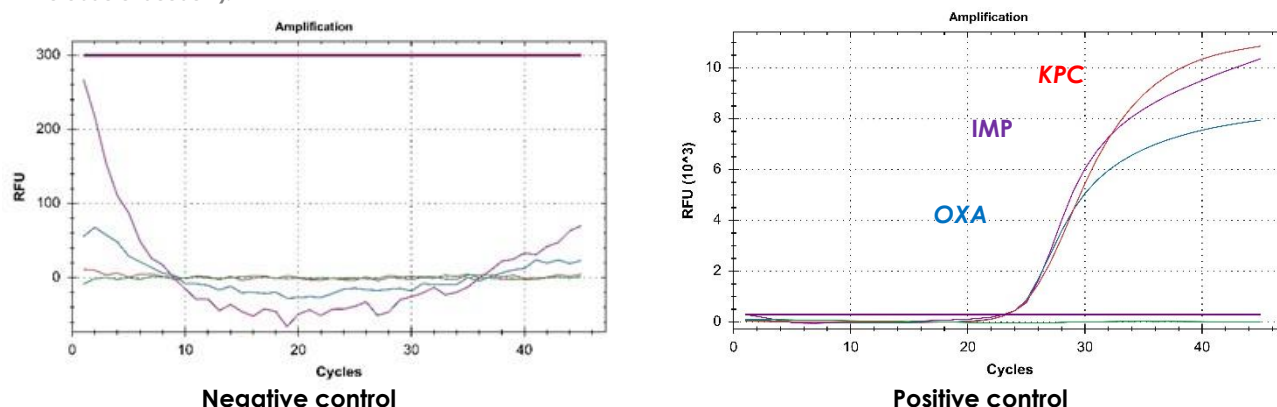


Figure 2. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 2).



9.2. References with extraction control (references in Annex 3 and 4)

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. Check Extraction Control (EC) signal to verify the correct functioning of the amplification mix. 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.

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 Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in the positive control well.

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

Controls	Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1			Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2			Interpretation of Controls
	NDM (FAM) ¹	VIM (ROX) ¹	Extraction Control (HEX) ²	OXA (FAM) ¹	KPC (ROX) ¹	IMP (Cy5) ¹	
Positive Control (PC)	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	Valid

Table 3. Expected Performance of Controls

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.

² The Extraction Control (EC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in PC and NC control wells.

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 analyze the results:

Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1			Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2			Result
NDM (FAM)	VIM (ROX)	Extraction Control (HEX)	OXA (FAM)	KPC (ROX)	IMP (Cy5)	
≤40	≥40 or no signal	≤40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	NDM-expressing <i>Enterobacteriaceae</i>
≥40 or no signal	≤40	≤40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	VIM-expressing <i>Enterobacteriaceae</i>
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40 or no signal ¹	≤40	≥40 or no signal	≥40 or no signal	OXA-expressing <i>Enterobacteriaceae</i>
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≤40	≥40 or no signal	KPC-expressing <i>Enterobacteriaceae</i>
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40	IMP-expressing <i>Enterobacteriaceae</i>
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤35 ²	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> not detected²
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥ 35 or no signal ²	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	Invalid- Repeat Testing²

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

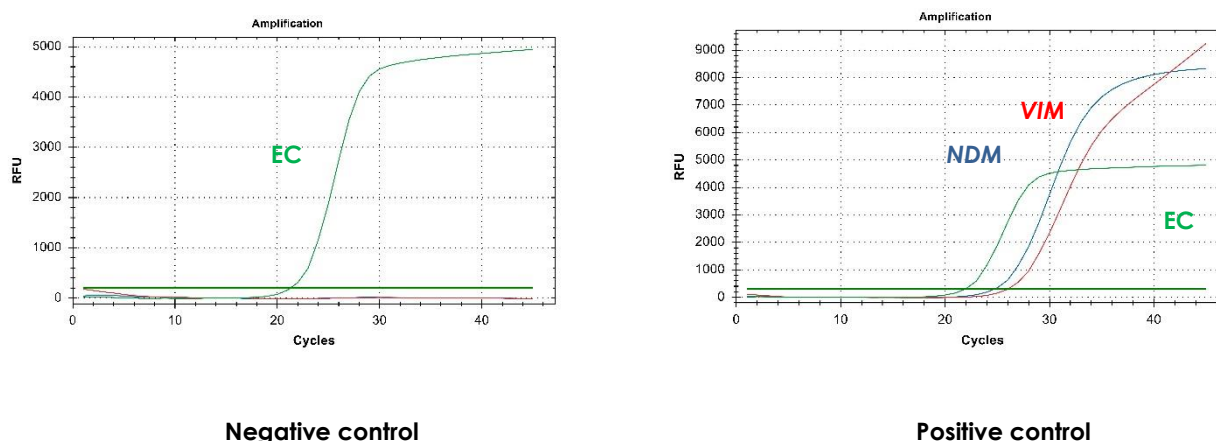
1 The Extraction Control (EC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

2 In the case of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* target genes negative, EC must show an amplification signal with Ct less than 35. If there is an absence of signal or Ct value ≥ 35 of the Extraction Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

Note: One individual patient sample simultaneously can contain several carbapenemase-encoding genes. Table 4 shows only the most representative results that can be expected with the VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit.

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.

Figure 3. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 1).



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 bacterial isolates from clinical samples and rectal swabs.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from samples must be done.
- 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control, either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination between Extraction Control and *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control, which contains high copies template, during their reconstitution by adding of Water RNase/DNase free (white vial). Each procedure must take place in established order and in a separate laboratory areas.
- 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 DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - 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 vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent drug-resistant infections 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 pathogens and does not imply that these pathogens are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive

result is indicative of the presence of targets Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* sequences (NDM, VIM, KPC, OXA and IMP genes).

- Negative results do not preclude Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak pathogen levels during infections caused by Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the pathogens.
- If diagnostic tests for other drug-resistant related illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 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.
- A bioinformatics tool (NCBI BLAST) analysis of the primer alignments showed that VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit detects the following family members for each family of the carbapenemase genes:

Family	Family members
OXA	48, 162, 163, 181, 199, 204, 232, 244, 245, 247, 252, 370, 405, 416, 438, 439, 484, 505, 514, 515, 517, 519, 538, 546, 547, 566, 567, 788, 793, 833, 894
KPC	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 54, 56
VIM	1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70
NDM	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29
IMP	1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 33, 34, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 45, 49, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85

Table 5. Family members of each carbapenemase gene family detected by VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit.

11. Quality control

VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) or the Extraction control (EC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit was tested using bacterial isolates from clinical samples and directly from clinical samples (rectal swabs). In

order to determine the clinical diagnostic accuracy, a multicenter evaluation has been conducted through collaboration with national entities. A summary of the sites, sample type and workflow is included in the following table:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1.A	'Departamento de Microbiología Clínica' and the 'Àrea de Biología Molecular' of 'Laboratori de Referència de Catalunya'	Bacterial isolates from clinical samples	GXT NA Extraction kit in GenoXtract® system (Hain), following manufacturer's instructions + Applied BioSystem 7500 RT PCR System	Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i>
1.B	'Departamento de Microbiología Clínica' and the 'Àrea de Biología Molecular' of 'Laboratori de Referència de Catalunya'	Rectal swabs	GXT NA Extraction kit in GenoXtract® system (Hain), following manufacturer's instructions + Applied BioSystem 7500 RT PCR System	Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i>

Table 6. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following tables:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
1.A	Phenotypical characterization + LightMix® modular carbapenemase assay	<u>Global:</u> Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	80	17	0	0	1 (0.95-1)	1 (0.80-1)	1 (0.95-1)	1 (0.80-1)
		OXA gene	33	64	0	0	1 (0.89-1)	1 (0.94-1)	1 (0.89-1)	1 (0.94-1)
		VIM gene	23	74	0	0	1 (0.85-1)	1 (0.95-1)	1 (0.85-1)	1 (0.95-1)
		NDM gene	19	78	0	0	1 (0.82-1)	1 (0.95-1)	1 (0.82-1)	1 (0.95-1)
		KPC gene	2	95	0	0	1 (0.16-1)	1 (0.96-1)	1 (0.16-1)	1 (0.96-1)
		IMP gene	7	90	0	0	1 (0.59-1)	1 (0.96-1)	1 (0.59-1)	1 (0.96-1)
1.B	Phenotypical characterization + LightMix® modular carbapenemase assay	<u>Global:</u> Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	34	16	0	0	1 (0.91-1)	1 (0.79-1)	1 (0.91-1)	1 (0.79-1)
		OXA gene	13	37	0	0	1 (0.75-1)	1 (0.90-1)	1 (0.75-1)	1 (0.90-1)
		VIM gene	11	39	0	0	1 (0.71-1)	1 (0.91-1)	1 (0.71-1)	1 (0.91-1)
		NDM gene	10	40	0	0	1 (0.69-1)	1 (0.91-1)	1 (0.69-1)	1 (0.91-1)
		KPC gene	5	45	0	0	1 (0.47-1)	1 (0.92-1)	1 (0.47-1)	1 (0.92-1)
		IMP gene	0	50	0	0	n.a*	1 (0.91-1)	n.a*	1 (0.91-1)

Table 7. True positive (TP) and true negative values (TN), false positive (FP) and false negative (FN) values, sensitivity, specificity, Predictive Positive Values (PPV) and Predictive Negative Values (NPV) for VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit.

* Due to all analyzed samples were negative for IMP gene, the analytical sensitivity of the test could not be performed.

Results show high agreement to detect Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* using VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of 10 DNA copies per reaction for carbapenemase-encoding genes *NDM*, *KPC* and *IMP*, 50 DNA copies per reaction for *OXA* and 100 DNA copies per reaction for *VIM* (Figure 4, 5, 6, 7 and 8).

Figure 4. Dilution series of *NDM* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 1, channel FAM).

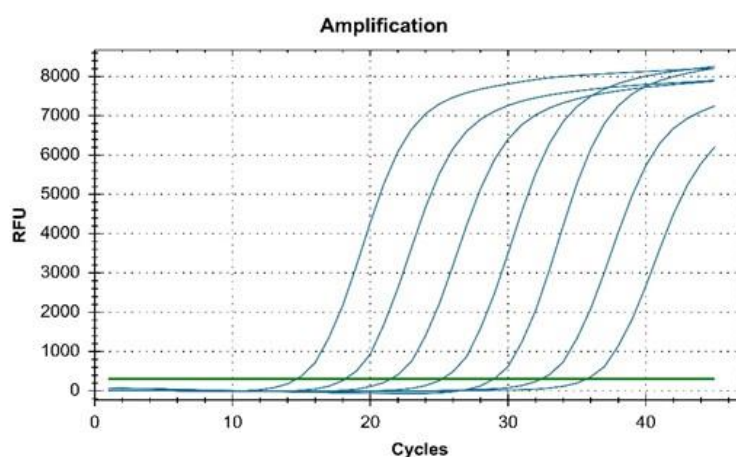


Figure 5. Dilution series of *VIM* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 1, channel ROX).

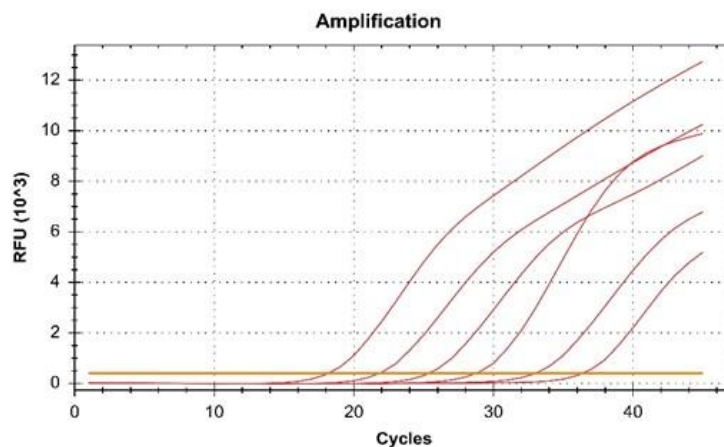


Figure 6. Dilution series of OXA (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96TM Real-Time PCR Detection System (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 2, channel FAM).

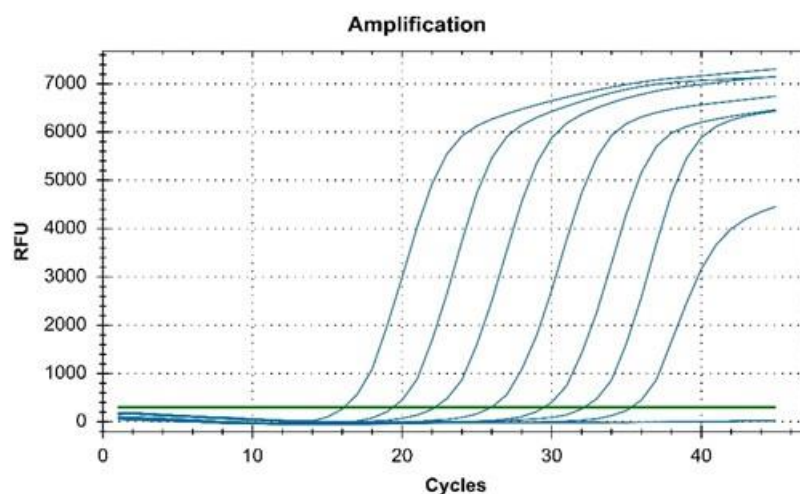


Figure 7. Dilution series of KPC (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96TM Real-Time PCR Detection System (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 2, channel ROX).

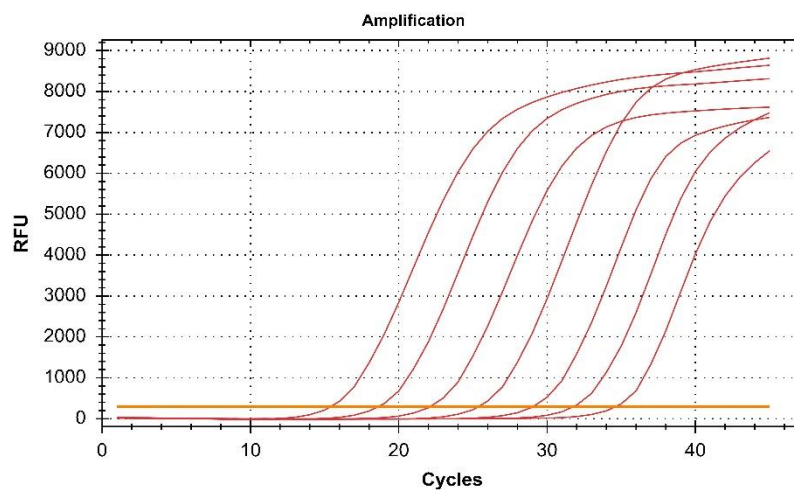
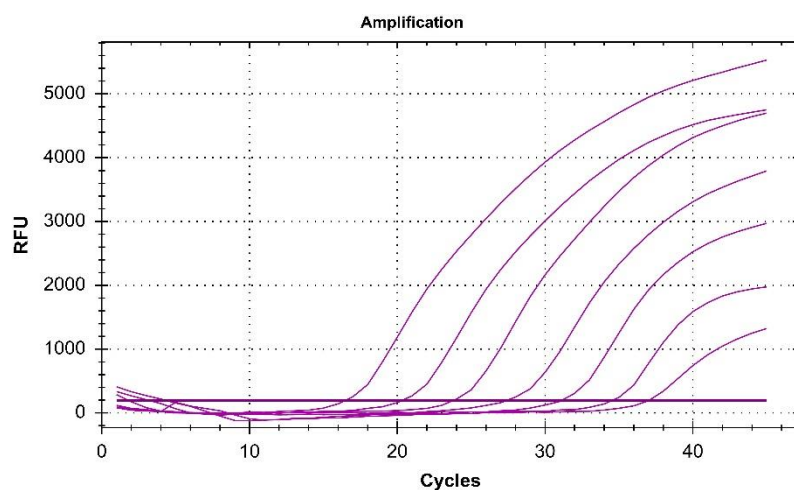


Figure 8. Dilution series of IMP cluster (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96TM Real-Time PCR Detection System (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 2, channel Cy5).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit assay was confirmed by testing a panel of different microorganisms which represents the most common drug resistant pathogens. No cross-reactivity of the VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit with genomic DNA of the selected pathogens was observed (Table 8), except for the targeted pathogens of each assay.

Cross-reactivity testing			
OXA-48 producing <i>Serratia marcescens</i> isolate	-/+	VanA-type <i>Enterococcus avium</i>	-
SHV-1 (non-ESBL), KPC-3, and OXA-48 producing <i>Klebsiella pneumonia</i> isolate	-/+	VanA- type <i>Enterococcus faecium</i> LMG16165 strain	-
TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL), and KPC-2 producing <i>Klebsiella pneumonia</i> isolate	-	VanA- type <i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1	-
OXA-244 producing <i>Escherichia coli</i> isolate	-/+	VanB- type <i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2	-
TEM-1 (non-ESBL) and IMP-1 producing <i>Escherichia coli</i> isolate	-/+	VanA-type <i>Enterococcus faecalis</i>	-
SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) and OXA-48 producing <i>Enterobacter cloacae</i> isolate	-/+	VanB-type <i>E. faecalis</i> (Andrewes and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz	-
TEM-1 (non-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) and NDM-1 producing <i>Enterobacter cloacae</i> isolate	+/-	VanC and VanB- types <i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142	-
NDM-7 producing <i>Enterobacter cloacae</i> -complex isolate	+/-	VanC type- <i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge and Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz and Schleifer 1984 VP	-
VIM-1 producing <i>Citrobacter braakii</i> isolate	+/-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315	-
KPC-3 and VIM-4 producing <i>Citrobacter freundii</i> -complex isolate	+/+	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ST398	-
<i>H. pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rRNA A2146G)	-	mecC Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>H. pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rRNA A2147G)	-	cMRSA isolate (oxa ^R , PVL-positive, spa:t 310)	-

Table 8. Reference pathogenic microorganisms used in this study performed at CerTest facility. ESBL = Extended Spectrum β -lactamases.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against TEM-1 (non-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) and NDM-1 producing *Enterobacter cloacae* isolate; NDM-7 producing *Enterobacter cloacae*-complex isolate; VIM-1 producing *Citrobacter braakii* isolate; KPC-3 and VIM-4 producing *Citrobacter freundii*-complex isolate; SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) and OXA-48 producing *Enterobacter cloacae* isolate; OXA-244 producing *Escherichia coli* isolate; SHV-1 (non-ESBL), KPC-3, and OXA-48 producing *Klebsiella pneumonia* isolate; OXA-48 producing *Serratia marcescens* isolate; TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL), and KPC-2 producing *Klebsiella pneumonia* isolate and TEM-1 (non-ESBL) and IMP-1 producing *Escherichia coli* isolate, showing positive results.

ANNEX 1

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCES
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CPE106L
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CPE106H
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CPE112L
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CPE112H
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CPE136
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-CPE101L
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-CPE101H
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CPE101

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 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, as well as an internal control to monitor PCR inhibition.

Target	Channel	Gene
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1	NDM-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	FAM
	VIM-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	ROX
	Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2	OXA-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	FAM
	KPC-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	ROX
	IMP-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	Cy5

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 Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A1.3 and A1.4. 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 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
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1/3/6 x 8-well strip
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	1/3/6 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 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	2/6/12 x 8-cap strip

Table A1 3. Reagents and materials provided in VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CPE101L, VS-CPE101H, VS-CPE106L, VS-CPE106H, VS-CPE112L and VS-CPE112H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	Transparent	2/9 x 4-well strip
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	Transparent	2/9 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 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	Caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	4/18 x 4-cap strip

Table A1 4. Reagents and materials provided in VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CEL101 and VS-CPE136. 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

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 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 Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Positive Control (red vial) by adding 200 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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 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	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table A1 5. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*NDM* and *OXA* genes), ROX (*VIM* and *KPC* genes) and HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANNEX 2

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CPE148T

Table A2. 1. References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 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, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity.

Target		Channel	Gene
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1	NDM-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	FAM	NDM
	VIM-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	ROX	VIM
	Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2	OXA-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	FAM	OXA
	KPC-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	ROX	KPC
	IMP-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	Cy5	IMP

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.cerest.es.

A2.2 Reagents provided

VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A2.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1 Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	White	2 vials
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2 Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	2 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 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 Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CPE148T.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilized positive control

Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control (red vial) by adding 200 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table A2. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (NDM and OXA genes), ROX (VIM and KPC genes) and HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANNEX 3

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CPE106LE
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS- CPE106HE
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS- CPE112LE
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS- CPE112HE
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CPE136E
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS- CPE101LE
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS- CPE101HE
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CPE101E

Table A3. 1. References.

A3.1 Principle of the procedure

VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 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. The assay can use an Extraction Control (EC) which can be introduced into each sample at the lysis buffer stage of the extraction process. This control can be used to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
Extraction control (EC)	HEX, VIC or JOE *	-
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1	NDM-producing <i>Enterobacteriaceae</i> FAM	NDM
	VIM-producing <i>Enterobacteriaceae</i> ROX	VIM
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2	OXA-producing <i>Enterobacteriaceae</i> FAM	OXA
	KPC-producing <i>Enterobacteriaceae</i> ROX	KPC
	IMP-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Cy5	IMP

Table A3. 2. Target, channel and genes.

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

A3.2 Reagents provided

VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A3.3 y A3.4. 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 A3.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices.

Table A3.4 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
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	1/3/6 x 8-well strip
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	1/3/6 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	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	2/6/12 x 8-cap strip

Table A3. 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CPE101LE, VS-CPE101HE, VS-CPE106LE, VS-CPE106HE, VS-CPE112LE and VS-CPE112HE.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	Transparent	2/9 x 4-well strip
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	Transparent	2/9 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	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	Caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	4/18 x 4-cap strip

Table A3. 4. Reagents and materials provided in VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CPE101E and VS-CPE136TE. 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).

A3.3 Test procedure

A3.3.1 Lyophilized extraction control

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in pre-PCR laboratory area away from the lyophilized positive control. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) by adding 500 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The Water RNase/DNase free vial must be utilized first to reconstitute the lyophilized Extraction Control in pre-PCR laboratory area, and subsequently, it can be used to reconstitute the lyophilized *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control in an area away from the other components.

A3.3.2 Lyophilized positive control

Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control (red vial) by adding 200 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.

A3.3.3 PCR protocol

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

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

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

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of Negative Control (violet vial) in the reserved wells for negative control.

Add 5 µL of DNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

If the EC is only used as PCR inhibition control, add 1 µL of the EC (green vial) to the negative control/sample/positive control wells.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips, 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® kit).

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	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table A3. 5. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (NDM and OXA genes), ROX (VIM and KPC genes) and HEX, JOE or VIC (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANNEX 4

TUBE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CPE148TE

Table A4. 1. References.

A4.1 Principle of the procedure

VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 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. The assay can use an Extraction Control (EC) which can be introduced into each sample at the lysis buffer stage of the extraction process. This control can be used to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

Target		Channel	Gene
Extraction control (EC)		HEX, VIC or JOE *	-
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1	NDM-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	FAM	NDM
	VIM-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	ROX	VIM
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2	OXA-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	FAM	OXA
	KPC-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	ROX	KPC
	IMP-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	Cy5	IMP

Table A4. 2. Target, channel and genes.

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

A4.2 Reagents provided

VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A4.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1 Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	2 vials
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2 Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	2 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	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 A4. 3. Reagents and materials provided in VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CPE148TE.

A4.3 Test procedure

A4.3.1 Lyophilized extraction control

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in pre-PCR laboratory area away from the lyophilized positive control. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) adding 500 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The Water RNase/DNase free vial must be utilized first to reconstitute the lyophilized Extraction Control in pre-PCR laboratory area, and subsequently, it can be used for reconstitute the lyophilized *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control in an area away from the other components.

A4.3.2 Lyophilized positive control

Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control (red vial) by adding 200 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.

A4.3.3 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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).

A4.3.4 PCR protocol

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

Add 15 µL of rehydrated *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of Negative Control (violet vial) in the reserved wells for negative control.

Add 5 µL of DNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

If the EC is only used as PCR inhibition control, add 1 µL of the EC (green vial) to the negative control/sample/positive control wells.

Close the wells with the caps provided. 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	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table A4. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*NDM* and *OXA* genes), ROX (*VIM* and *KPC* genes) and HEX, JOE or VIC (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit es una prueba de PCR en tiempo real diseñada para la detección cualitativa y diferenciación simultánea de los principales genes que codifican las carbapenemasas (NDM, VIM, OXA, KPC y/o IMP) a partir de aislados bacterianos de muestras clínicas, y directamente de hisopos rectales procedentes de individuos con sospecha de infección por patógenos resistentes a los carbapenémicos, por parte de su profesional de la salud (PS). El uso previsto de este test es facilitar el diagnóstico de infección causada por enterobacterias resistentes a carbapenémicos en combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. El DNA se extrae de aislados bacterianos y muestras de hisopos rectales, se amplifica mediante PCR a tiempo real y se detecta utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para la identificación de genes codificantes para carbapenemasas.

2. Introducción y explicación

La resistencia a los antibióticos supone actualmente un importante problema de salud pública, destacando en particular la resistencia a los carbapenémicos. Este tipo de antibióticos son comúnmente considerados como el grupo de antibióticos más potente con eficacia probada en el tratamiento de pacientes con infecciones bacterianas graves, entre las que se incluyen las causadas por cepas resistentes a los antibióticos. Sin embargo, el aumento global de la detección de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos (CRE) representa una de las mayores amenazas acuciantes para la salud pública, debido principalmente a la implicación de las CRE en numerosos brotes y en Infecciones Relacionadas con la Atención Sanitaria (IRAS, HAI en inglés). Dichas infecciones implican mayor tiempo de ingreso y de costes sanitarios, así como un aumento de la mortalidad en comparación con las infecciones susceptibles a los carbapenémicos. Bajo recomendación de la CDC, las CRE se definen como un aislado de *Enterobacteriaceae* resistente a ertapenem, imipenem, meropenem, o doripenem, según establece el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI –), o que produzca carbapenemasas (*Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas – CPE –). Ambos términos CRE y CPE suelen usarse indistintamente, aunque el primero se refiere al fenotipo de resistencia, mientras que el segundo indica el mecanismo que subyace al fenotipo. CPE son principalmente CRE gracias a la producción de carbapenemasas, mecanismo predominante responsable de la resistencia a carbapenémicos por parte de los patógenos Gram-negativos.

Enterobacteriaceae es una familia de bacterias Gram-negativas de alta ubicuidad, de la que algunas especies forman parte de la flora bacteriana humana, aunque frecuentemente asociadas a enfermedad diarreica e infecciones extraintestinales. Responsables de diferentes infecciones comunitarias y relacionadas con la atención sanitaria, su principal mecanismo de resistencia es la producción de β -lactamasas (codificadas por el gen *bla*). Las CRE más frecuentes son la *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) y la *Escherichia coli* (*E. coli*). Dicha resistencia puede darse de manera innata en algunas cepas, o mediante la adquisición de elementos genéticos móviles (como por ejemplo plásmidos o transposones) que por transferencia horizontal transmiten los genes de resistencia a otras especies y géneros bacterianos. El aumento de las CRE se debe principalmente al surgimiento y diseminación de las carbapenemasas, un grupo específico de β -lactamasas capaces de hidrolizar carbapenémicos, además de otros β -lactámicos. Actualmente se distinguen cinco tipos de carbapenemasas

principales, todas codificadas por elementos genéticos móviles: carbapenemasa *Klebsiella pneumoniae* (KPC), metallo-β-lactamasa Nueva Deli (NDM), oxaciclínasas hidrolizantes de carbapenémicos (OXA-48 y tipo-OXA-48), metallo-β-lactamasa codificada por el integrón Verona (VIM), y metallo-β-lactamasa activa para imipenem (IMP). La prevalencia de las CRE y de los tipos de carbapenemasas depende en gran medida de la geografía, siendo la especie de *Enterobacteriaceae* *K. pneumoniae* la predominante en todo el mundo. KPC es la carbapenemasa más común, prevalente en países como Grecia, Italia, Brasil, China y otras naciones como EE. UU. y Colombia. Sin embargo, mientras que la NDM es la más común en el subcontinente indio (India, Pakistán, Bangladesh), en los países europeos y mediterráneos (incluyendo Norte de África), destaca la carbapenemasa OXA-48.

El origen principal de diseminación de las CRE son los portadores intestinales (personas infectadas o colonizadas), por lo que la detección precoz es crucial para reducir la transmisión cruzada vía contacto directo entre personas, tanto en la comunidad como en ambientes sanitarios. Las CRE afectan principalmente a: pacientes que permanecen ingresados en centros sanitarios tanto por un periodo corto como prolongado, pacientes que han sido tratados por otras causas, que tienen comprometido su sistema inmunitario, o que han requerido de procedimientos invasivos para su tratamiento, como intubaciones. Una vez que estas bacterias salen del intestino, pueden causar infecciones graves, tales como neumonía, bacteriemia, infecciones del tracto urinario, de heridas, infecciones locales post-quirúrgicas y meningitis.

Los métodos basados en la identificación fenotípica de las CPE, como el test modificado de Hodge, se han considerado métodos de "referencia", pero pueden ser complejos, requerir de mucho tiempo, y ocasionalmente resultar inconclusos debido al amplio rango de concentraciones mínimas inhibitorias a los carbapenémicos. Por ello, los métodos moleculares para la rápida detección de CPE representan una herramienta ventajosa para la mayor rapidez en la identificación de CRE, así como para una diferenciación precisa de los tipos de carbapenemasas.

NOTA: Para una mayor comprensión de la nomenclatura, los genes codificantes de carbapenemasas serán referidos de la siguiente manera en este documento:

bla_{NDM}: NDM.

- *bla_{VIM}*: VIM.
- *bla_{OXA-48 like}*: OXA.
- *bla_{KPC}*: KPC.
- *bla_{IMP}*: IMP (IMP-1 cluster + IMP-8 cluster)*.

*IMP-1 cluster incluye: IMP-1, IMP-4, IMP-3, IMP-6, IMP-10, IMP-25, IMP-30, IMP-34, IMP-40, IMP-42, IMP-52, IMP-55.
IMP-8 cluster incluye: IMP-2, IMP-8, IMP-16, IMP-19, IMP-20, IMP-22, IMP-24.

3. Procedimiento

VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación cualitativa y diferenciación de genes codificantes de carbapenemasas (NDM, VIM, OXA, KPC y/o IMP) de aislados bacterianos procedentes de muestras clínicas y frotis rectales. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de carbapenemasas se realiza mediante la amplificación de una región conservada de los genes NDM, VIM, OXA-48 y OXA-48-like, KPC e IMP, usando cebadores específicos y sondas marcadas con fluorescencia.

VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit se basa en la actividad exonucleasa 5' 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. Dicha fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para el ensayo de PCR en tiempo real (cebadores / sondas específicas, dNTPs, tampón, polimerasa) en un formato estabilizado, así como un control interno para monitorizar la inhibición de la PCR. Cada kit incluye dos tipos de mezclas de reacción y cada una corresponde a un ensayo diferente. La primera mezcla de reacción multiplex detecta los genes *NDM* y/o *VIM*, codificantes de carbapenemasas (*Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 1), así como el Control Interno (CI). La segunda mezcla de reacción multiplex detecta los genes *OXA*, *KPC* y / o *IMP*, codificantes de carbapenemasas (*Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit incluye los materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para "open format" y "rotor-gene format" con control interno, el Anexo 2 para formato de tubo con de control interno, el Anexo 3 para "open format" y "rotor-gene format" con control de extracción, y el Anexo 5 para formato de tubo con de control de extracción.

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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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 ≤ -70°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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied BioSystem 7500 RT PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-

Gene® Q (Qiagen), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, Roche Molecular Diagnostics LightCycler 480 II and Mic Real Time PCR Cyclers.

Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506). 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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 las referencias VS-CPE136 y VS-CPE136E). 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-CPE136 y VS-CPE136E (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 dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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.
- Asegúrese de utilizar un pocillo para la detección de los genes *NDM* y *VIM* y otro pocillo para la detección de los genes *OXA*, *KPC* e *IMP*. Tenga cuidado de no mezclarlos durante todo el proceso.

- 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 peligrosos 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 el "open format" y "rotor-gene format" con productos con control interno, el Anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno, el Anexo 3 para el formato open format" y "rotor-gene format" con productos con control de extracción, y el Anexo 4 para formato de tubo con productos con control de extracción.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit ha sido testado en aislados bacterianos procedentes de diferentes muestras clínicas e hisopos rectales. Otros tipos de muestras deben ser validados por el usuario.

La recolección, el almacenamiento y el transporte de las muestras deben mantenerse según las condiciones validadas por el usuario.

En general, todas las muestras deben recolectarse y etiquetarse adecuadamente en recipientes limpios. Después de la recolección, las muestras deben colocarse en una bolsa de riesgo biológico y deben transportarse y procesarse lo antes posible para garantizar la calidad de la prueba. Las muestras deben transportarse a temperatura ambiente (TA) durante un máximo de 2 horas, o entre 2 y 8 ° C durante un máximo de 24 horas, siguiendo las normativas locales y nacionales para el transporte de material patógeno. Para el transporte a largo plazo (más de 24 horas), recomendamos el envío a -20 ° C o menos. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse entre 2 y 8 ° C hasta 24 horas o pueden congelarse a -20°C o idealmente a -80°C 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 recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con las pautas de laboratorio apropiadas. Para obtener más información, consulte la guía CDC (Specimen collection guidelines. Sitio web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>), la guía IDSA (Miller, JM, Binnicker, MJ, Campbell, S., ... y Pritt, BS (2018). Una guía para la utilización del laboratorio de microbiología para el diagnóstico de enfermedades infecciosas: actualización de 2018 del Sociedad Estadounidense de Enfermedades Infecciosas y Sociedad Estadounidense de Microbiología. *Enfermedades Infecciosas Clínicas*, 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 aislados bacterianos procedentes de muestras clínicas, así como de hisopos rectales, 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:

- GXT NA Extraction kit in GenoXtract® system (Hain), using QIASymphony RGQ® (QIAGEN).
- MagDEA Dx SV Kit, using the magLEAD® 6gC or 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

9. Interpretación de resultados

9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)

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. Compruebe la señal de control interno (CI) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. 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.

El uso de controles positivos y negativos en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo de control negativo y la presencia de señal en el pocillo de control positivo para Enterobacterias productoras de carbapenemasas.

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

Controles	Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1			Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2			Interpretación de los controles
	NDM (FAM) ¹	VIM (ROX) ¹	Control Interno (HEX) ²	OXA (FAM) ¹	KPC (ROX) ¹	IMP (Cy5) ¹	
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤40	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Válido

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles. Ct no 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 "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación ($C_t \leq 40$) en los pocillos del CP y CN.

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:

Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1			Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2			Resultado
NDM (FAM)	VIM (ROX)	Control Interno (HEX)	OXA (FAM)	KPC (ROX)	IMP (Cy5)	
≤ 40	≥ 40 o no señal	≤ 40 o no señal ¹	≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	<i>Enterobacteriaceae</i> que expresa NDM
≥ 40 o no señal	≤ 40	≤ 40 o no señal ¹	≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	<i>Enterobacteriaceae</i> que expresa VIM
≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	≤ 40 o no señal ¹	≤ 40	≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	<i>Enterobacteriaceae</i> que expresa OXA
≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	≤ 40 o no señal ¹	≥ 40 o no señal	≤ 40	≥ 40 o no señal	<i>Enterobacteriaceae</i> que expresa KPC
≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	≤ 40 o no señal ¹	≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	≤ 40	<i>Enterobacteriaceae</i> que expresa IMP
≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	≤ 35 ²	≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	<i>Enterobacteriaceae</i> productoras de carbapenemasas no detectadas²
≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	≥ 35 o no señal ¹	≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	≥ 40 o no señal	Inválido- Repita el test²

Tabla 2. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct no señal = sin curva de amplificación.

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

2 En el caso de que los genes diana de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas resulten negativos, el CI debe mostrar una señal de amplificación con C_t menor de 35. En el caso de ausencia de señal o valor de $C_t \geq 35$ del control interno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Nota: Una muestra individual de paciente puede simultáneamente contener varios genes que codifican carbapenemasas. La Tabla 2 muestra solo los resultados más representativos que se pueden esperar con el ensayo VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit.

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; verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

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

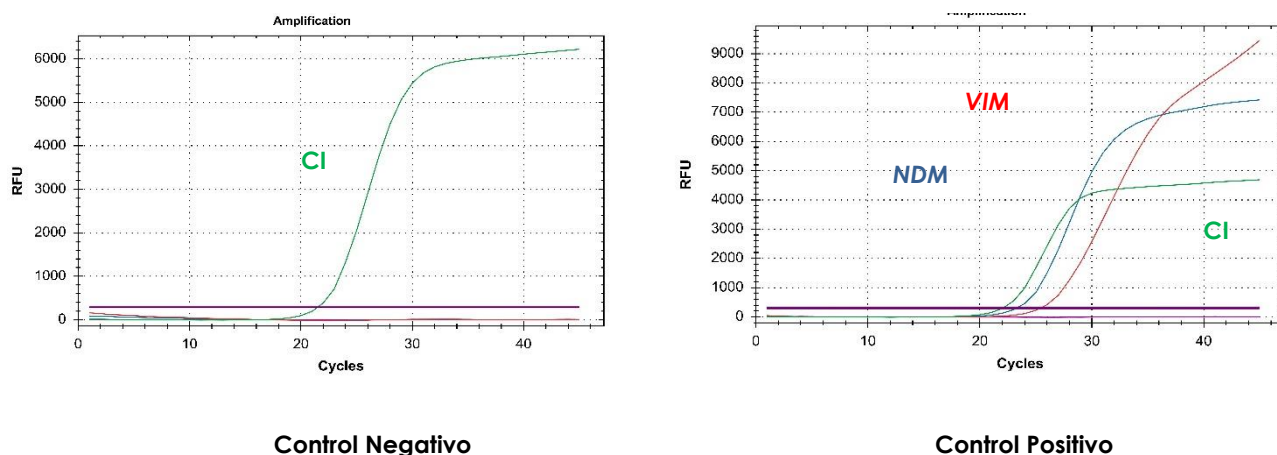
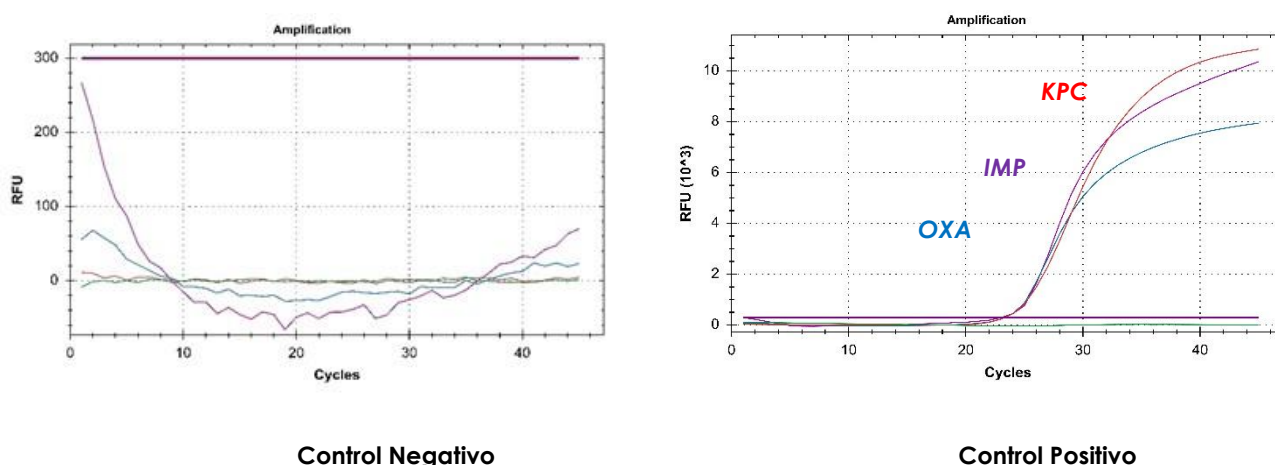


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 2)



9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)

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. Compruebe la señal del control de extracción (CE) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. 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.

El uso de controles positivos y negativos en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para Enterobacterias productoras de carbapenemasas en el pocillo de control positivo.

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

Controles	Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1			Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2			Interpretación de los controles
	NDM (FAM) ¹	VIM (ROX) ¹	Control de Extracción (HEX) ²	OXA (FAM) ¹	KPC (ROX) ¹	IMP (Cy5) ¹	
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤40	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Válido

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles. Ct no 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 "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control de Extracción (CE) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos del CP y CN.

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:

Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 1			Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> 2			Resultado
NDM (FAM)	VIM (ROX)	Control de Extracción (HEX)	OXA (FAM)	KPC (ROX)	IMP (Cy5)	
≤40	≥40 o no señal	≤40 o no señal ¹	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	<i>Enterobacteriaceae</i> que expresa NDM
≥40 o no señal	≤40	≤40 o no señal ¹	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	<i>Enterobacteriaceae</i> que expresa VIM
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤40 o no señal ¹	≤40	≥40 o no señal	≥40 o no señal	<i>Enterobacteriaceae</i> que expresa OXA
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤40 o no señal ¹	≥40 o no señal	≤40	≥40 o no señal	<i>Enterobacteriaceae</i> que expresa KPC
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤40 o no señal ¹	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤40	<i>Enterobacteriaceae</i> que expresa IMP
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤35 ²	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	<i>Enterobacteriaceae</i> productoras de carbapenemasas no detectadas²
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥ 35 o no señal ¹	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Inválido- Repita el test²

Tabla 4. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct no señal = sin curva de amplificación.

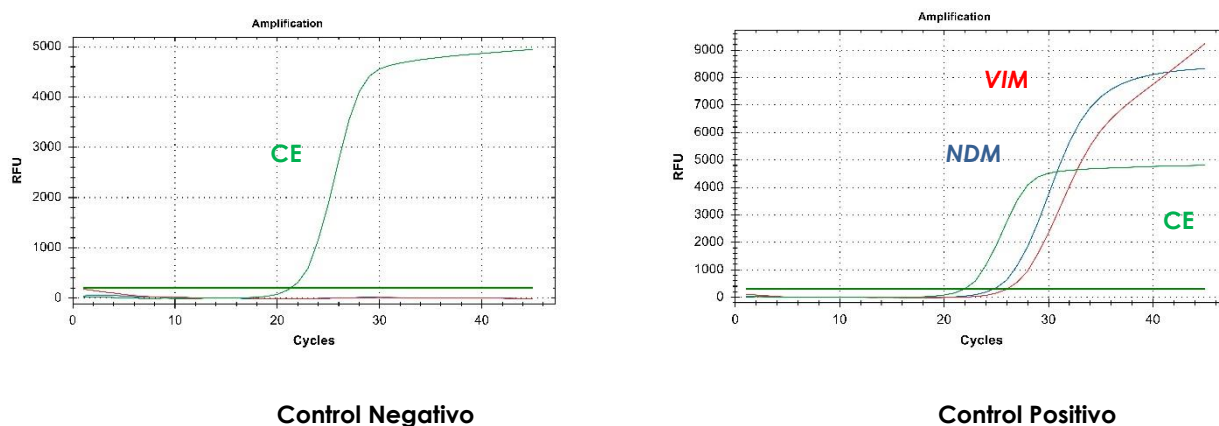
1 El Control de Extracción (CE) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal). En ocasiones, la detección del control de extracción no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

2 En el caso de que los genes diana de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas resulten negativos, el CE debe mostrar una señal de amplificación con Ct menor de 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct ≥ 35 del control de extracción, el resultado se considera "invalido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Nota: Una muestra individual de paciente puede simultáneamente contener varios genes que codifican carbapenemasas. La Tabla 2 muestra solo los resultados más representativos que se pueden esperar con el ensayo VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit.

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; verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

Figura 3. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1).



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 aislados bacterianos procedentes de muestras clínicas e hisopos rectales.
- 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 una prueba cualitativa 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 resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada por *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA diana o contaminación debido a productos de PCR de reacciones previas.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.
- 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 durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - 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 las vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir infecciones por resistencias a antibióticos o durante el tratamiento de la infección.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de patógenos viables y no implica que dichos patógenos sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias diana de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas (genes *NDM*, *VIM*, *KPC*, *OXA* e *IMP*).
- Resultados negativos no excluyen padecer infección por de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas, 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 por *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas. 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 patógenos.
- Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades de resistencia a antibióticos son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas, 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.
- El análisis de la hibridación de nuestros primers con herramientas bioinformáticas (NCBI BLAST) mostró que nuestro kit detecta los siguientes miembros de cada familia de genes de carbapenemasas diana:

Familia	Miembros de la familia
OXA	48, 162, 163, 181, 199, 204, 232, 244, 245, 247, 252, 370, 405, 416, 438, 439, 484, 505, 514, 515, 517, 519, 538, 546, 547, 566, 567, 788, 793, 833, 894
KPC	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 54, 56
VIM	1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70
NDM	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29
IMP	1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 33, 34, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 45, 49, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85

Tabla5. Miembros de cada familia de genes de carbapenemasa detectados por VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit.

11. Control de calidad

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el Control Interno (CI) o el Control de Extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

El rendimiento clínico de VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit se probó utilizando aislados bacterianos de muestras clínicas, y directamente muestras clínicas (hisopos rectales) mediante la realización de una evaluación multicéntrica en colaboración con entidades nacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de las localizaciones, tipos de muestra y flujo de trabajo aplicado. Los resultados fueron los siguientes:

	Lugar	Tipo de muestra	Flujo de trabajo	Diana
1.A	Departamento de Microbiología Clínica' y el 'Área de Biología Molecular' of Laboratori de Referència de Catalunya'	Aislados bacterianos de muestras clínicas	GXT NA Extraction kit in GenoXtract® system (Hain), siguiendo las instrucciones del fabricante + Applied BioSystem 7500 RT PCR System	Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas
1.B	Departamento de Microbiología Clínica' y el 'Área de Biología Molecular' of Laboratori de Referència de Catalunya'	Hisopos rectales	GXT NA Extraction kit in GenoXtract® system (Hain), siguiendo las instrucciones del fabricante + Applied BioSystem 7500 RT PCR System	Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas

Tabla 3. Lugar, tipo de muestra, flujo de trabajo y diana.

Los valores positivos y negativos verdaderos, los falsos negativos y falsos positivos, la sensibilidad, la especificidad, el VPP, los valores de VPN para VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit se calcularon en relación con cada ensayo comparador, como se muestra en la siguiente tabla:

Lugar	Kit comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
1.A	Caracterización fenotípica + LightMix® modular carbapenemase assay	<u>Global:</u> <i>Enterobacteriaceae</i> productoras de carbapenemasas	80	17	0	0	1 (0.95-1)	1 (0.80-1)	1 (0.95-1)	1 (0.80-1)
		OXA gene	33	64	0	0	1 (0.89-1)	1 (0.94-1)	1 (0.89-1)	1 (0.94-1)
		VIM gene	23	74	0	0	1 (0.85-1)	1 (0.95-1)	1 (0.85-1)	1 (0.95-1)
		NDM gene	19	78	0	0	1 (0.82-1)	1 (0.95-1)	1 (0.82-1)	1 (0.95-1)
		KPC gene	2	95	0	0	1 (0.16-1)	1 (0.96-1)	1 (0.16-1)	1 (0.96-1)
		IMP gene	7	90	0	0	1 (0.59-1)	1 (0.96-1)	1 (0.59-1)	1 (0.96-1)
1.B	Caracterización fenotípica + LightMix® modular carbapenemase assay	<u>Global:</u> <i>Enterobacteriaceae</i> productoras de carbapenemasas	34	16	0	0	1 (0.91-1)	1 (0.79-1)	1 (0.91-1)	1 (0.79-1)
		OXA gene	13	37	0	0	1 (0.75-1)	1 (0.90-1)	1 (0.75-1)	1 (0.90-1)
		VIM gene	11	39	0	0	1 (0.71-1)	1 (0.91-1)	1 (0.71-1)	1 (0.91-1)
		NDM gene	10	40	0	0	1 (0.69-1)	1 (0.91-1)	1 (0.69-1)	1 (0.91-1)
		KPC gene	5	45	0	0	1 (0.47-1)	1 (0.92-1)	1 (0.47-1)	1 (0.92-1)
		IMP gene	0	50	0	0	n.a*	1 (0.91-1)	n.a*	1 (0.91-1)

Tabla 7. Valores verdaderos positivos (TP) y valores verdaderos negativos (TN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN), sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (PPV) y valor predictivo negativo (NPV) para VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit.

* Debido a que todas las muestras analizadas fueron negativas para el gen IMP, no pudo calcularse la sensibilidad analítica del test.

Los resultados muestran una alta concordancia para detectar *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas utilizando VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit presenta un límite de detección de 10 copias DNA por reacción para los genes *NDM*, *KPC* e *IMP*, 50 copias DNA por reacción para *OXA* y 100 copias DNA por reacción para *VIM* (Figura 4, 5, 6, 7 y 8).

Figure 4. Diluciones seriadas de un estándar del gen NDM (10^7 - 10^1 copies/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (*Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1*, canal FAM).

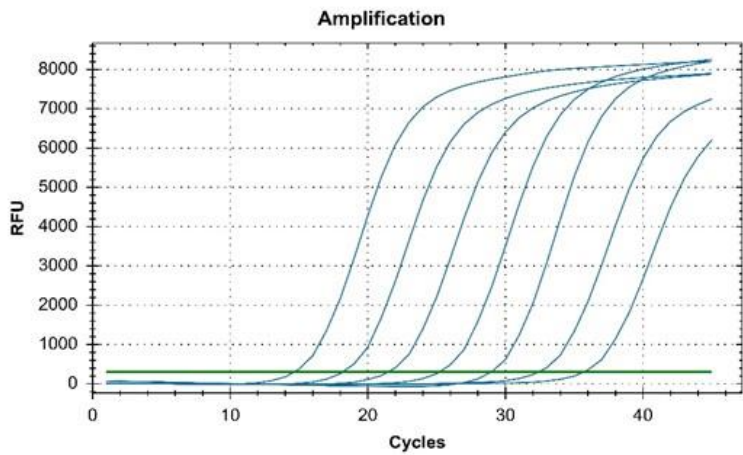


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar del gen VIM (10^7 - 10^1 copies/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (*Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1*, canal ROX).

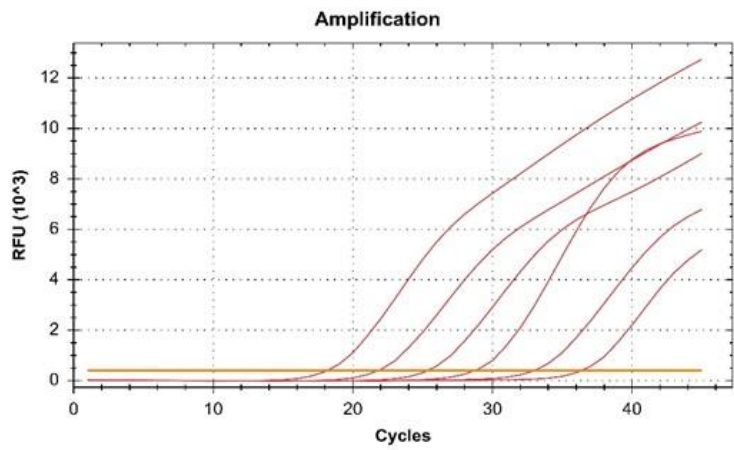


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar del gen OXA (10^7 - 10^1 copies/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (*Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2*, canal FAM).

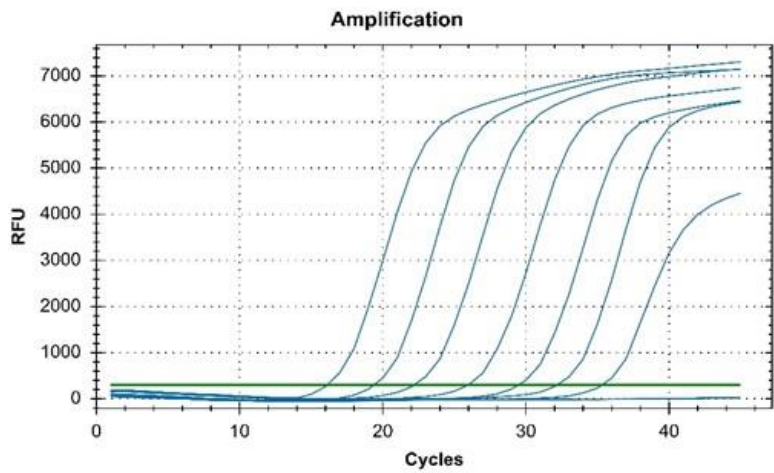


Figura 7. Diluciones seriadas de un estándar del gen *KPC* (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 2, canal ROX).

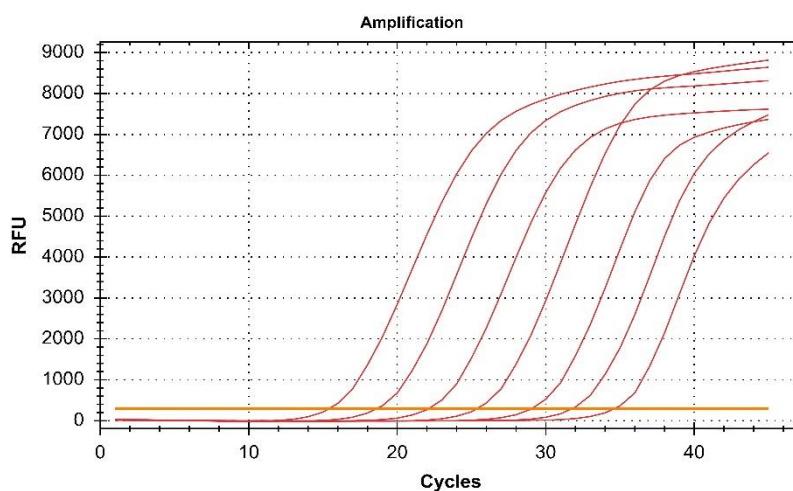
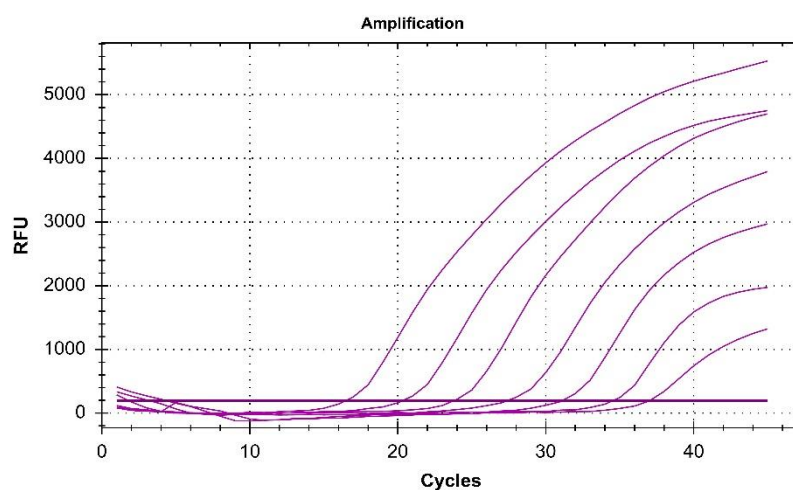


Figura 8. Diluciones seriadas de un estándar del gen *IMP* (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 2, canal Cy5).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad de VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos resistentes a medicamentos más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas de VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Prueba de reactividad cruzada			
Aislado de <i>Serratia marcescens</i> productor de OXA-48	-/+	<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	-
Aislado de <i>Klebsiella pneumonia</i> productor de SHV-1 (no-ESBL), KPC-3, y OXA-48	-/+	<i>Enterococcus faecium</i> tipo VanA cepa LMG16165	-
Aislado de <i>Klebsiella pneumonia</i> productor de TEM-1 (no-ESBL), SHV-1 (no-ESBL), CTX-M-2 (ESBL), y KPC-2	-	<i>Enterococcus faecium</i> tipo VanA IOWA 1	-
Aislado de <i>Escherichia coli</i> productor de OXA-244	-/+	<i>Enterococcus faecium</i> tipo VanB IOWA 2	-
Aislado de <i>Escherichia coli</i> productor de TEM-1 (no-ESBL) e IMP-1	-/+	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	-
Aislado de <i>Enterobacter cloacae</i> productor de SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-/+	<i>E. faecalis</i> tipo VanB (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz	-
Aislado de <i>Enterobacter cloacae</i> productor de TEM-1 (no-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	+/-	<i>Enterococcus gallinarum</i> tipos VanC y VanB ENT20120142	-
Aislado complejo de <i>Enterobacter cloacae</i> productor de NDM-7	+/-	<i>Enterococcus gallinarum</i> tipo VanC (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP	-
Aislado de <i>Citrobacter braakii</i> productor de VIM-1	+/-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (MRSA) N315	-
Aislado complejo de <i>Citrobacter freundii</i> productor de KPC-3 y VIM-4	+/+	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina ST398	-
<i>H. pylori</i> resistente a claritromicina (23S rRNA A2146G)	-	<i>Staphylococcus aureus</i> mecC resistente a la meticilina	-
<i>H. pylori</i> resistente a claritromicina (23S rRNA A2147G)	-	Aislado cMRSA (oxa ^R , PVL-positivo, spa:t 310)	-

Tabla 4. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio realizado en Certest. ESBL = Extended Spectrum β -lactamases.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a *Enterobacter cloacae* productor de TEM-1 (no-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1; aislado complejo de *Enterobacter cloacae* productor de NDM-7; aislado de *Citrobacter braakii* productor de VIM-1; aislado complejo de *Citrobacter freundii* productor de KPC-3 y VIM-4; aislado de *Enterobacter cloacae* productor de SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48; aislado de *Escherichia coli* productor de OXA-244; aislado de *Klebsiella pneumonia* productor de SHV-1 (non-ESBL), KPC-3, y OXA-48; aislado de *Serratia marcescens* productor de OXA-48; TEM-1 (on-ESBL), aislado de *Klebsiella pneumonia* productor de SHV-1 (on-ESBL), CTX-M-2 (ESBL), y KPC-2; y aislado de *Escherichia coli* productor de TEM-1 (on-ESBL) e IMP-1, mostrando resultados positivos.

ANEXO 1

FORMATO OPEN Y ROTOR-GENE CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CPE106L
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CPE106H
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CPE112L
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CPE112H
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CPE136
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-CPE101L
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-CPE101H
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- CEL101

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana		Canal	Gen
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1	Enterobacteriaceae productor de NDM	FAM	NDM
	Enterobacteriaceae productor de VIM	ROX	VIM
	Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2	Enterobacteriaceae productor de OXA	FAM	OXA
	Enterobacteriaceae productor de KPC	ROX	KPC
	Enterobacteriaceae productor de IMP	Cy5	IMP

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 Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3 y A1.4. 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

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
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> 1 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control Interno en formato estabilizado	Blanco	1/3/6 tiras de 8 pocillos
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> 2 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1/3/6 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> 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	2/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A1.3. Reactivos y materiales proporcionados VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CPE101L, VS-CPE101H, VS-CPE106L, VS-CPE106H, VS-CPE112L y VS-CPE112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> 1 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control Interno en formato estabilizado	Transparente	2/9 tiras de 4 pocillos
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> 2 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	2/9 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> 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 para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	4/18 tiras de 4 tapones

Tabla A1.4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CEL101 y VS-CPE136. Para uso en Qiagen/Corbett Rotor-Gene® y compatible con accesorios con tiras de 4 tubos 0,1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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 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	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A1. 5. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (genes *NDM* y *OXA*), ROX (genes *VIM* y *KPC*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno (CI)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™

Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CEP148T

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 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, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana		Canal	Gen
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1	Enterobacteriaceae productor de NDM	FAM	NDM
	Enterobacteriaceae productor de VIM	ROX	VIM
	Control Interno (CI)	HEX, VIC or JOE *	-
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2	Enterobacteriaceae productor de OXA	FAM	OXA
	Enterobacteriaceae productor de KPC	ROX	KPC
	Enterobacteriaceae productor de IMP	Cy5	IMP

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.certest.es.

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1 Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control Interno en formato estabilizado	Blanco	2 vials
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2 Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	2 vials
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 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 Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit con Ref. Ref. VS-CPE148T.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 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 abrirlo y manipularlo 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	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 (genes *NDM* y *OXA*), ROX (genes *VIM* y *KPC*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno (CI)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANEXO 3

FORMATO OPEN Y ROTOR-GENE CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CPE106LE
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS- CPE106HE
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS- CPE112LE
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS- CPE112HE
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CPE136E
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS- CPE101LE
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS- CPE101HE
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CPE101E

Tabla A3. 1. Referencias.

A3.1 Procedimiento

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede añadirse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Diana		Canal	Gen
Control de Extracción (CE)		HEX, VIC or JOE *	-
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1	Enterobacteriaceae productor de NDM	FAM	NDM
	Enterobacteriaceae productor de VIM	ROX	VIM
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2	Enterobacteriaceae productor de OXA	FAM	OXA
	Enterobacteriaceae productor de KPC	ROX	KPC
	Enterobacteriaceae productor de IMP	Cy5	IMP

Tabla A3. 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.

A3.2 Reactivos suministrados

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A3.3 y A3.4. 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 A3.3 incluye materiales y reactivos para usar

con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A3.4 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
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> 1 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1/3/6 tiras de 8 pocillos
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> 2 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1/3/6 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	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	2/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A3.3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CPE101LE, VS-CPE101HE, VS-CPE106LE, VS-CPE106HE, VS-CPE112LE y VS-CPE112HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> 1 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	2/9 tiras de 4 pocillos
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> 2 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	2/9 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	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 para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	4/18 tiras de 4 tapones

Tabla A3.4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CPE101E y VS-CPE136TE. 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).

A3.3 Procedimiento del test

A3.3.1 Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el control de extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL del Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio, y después se debe usar para reconstituir el *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A3.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 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.

A3.3.3 Protocolo PCR

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

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

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

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de DNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a los pocillos en los que se encuentre la muestra/control positivo/control negativo.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 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	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A3. 5. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (genes *NDM* y *OXA*), ROX (genes *VIM* y *KPC*) y HEX, JOE o VIC (Control de Extracción (CE)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANEXO 4

FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CPE148TE

Tabla A4. 1. Referencias.

A4.1 Procedimiento

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 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, polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede añadirse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Diana		Canal	Gen
Control de Extracción (CE)		HEX, VIC or JOE *	-
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1	Enterobacteriaceae productor de NDM	FAM	NDM
	Enterobacteriaceae productor de VIM	ROX	VIM
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2	Enterobacteriaceae productor de OXA	FAM	OXA
	Enterobacteriaceae productor de KPC	ROX	KPC
	Enterobacteriaceae productor de IMP	Cy5	IMP

Tabla A4. 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.

A4.2 Reactivos suministrados

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A4.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> 1 Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	2 vials
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> 2 Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	2 vials
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	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 A4. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CEP148TE.

A4.3 Procedimiento del test

A4.3.1 Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el Control de Extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL del Agua libre de RNasa/DNasa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNasa/DNasa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio, y después se debe usar para reconstituir el *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A4.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* 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 *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 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.

A4.3.3 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 abrirlo y manipularlo 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).

A4.3.4 Protocolo PCR

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

Añadir 15 µL de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de DNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a los pocillos en los que se encuentre la muestra.

Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. 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	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A4. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (genes *NDM* y *OXA*), ROX (genes *VIM* y *KPC*) y HEX, JOE o VIC (Control de Extracción (CE)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005PTM Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

Bibliography/Bibliografía

- Ambretti, S., Bassetti, M., Clerici, P., Petrosillo, N., Tumietto, F., Viale, P., & Rossolini, G. M. (2019). Screening for carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in settings of high endemicity. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(136), 1–11.
- Antonelli, A., Arena, F., Giani, T., Colavecchio, O. L., Valeva, S. V., Paule, S., Boleij, P., & Rossolini, G. M. (2016). Performance of the BD MAX™ instrument with Check-Direct CPE real-time PCR for the detection of carbapenemase genes from rectal swabs, in a setting with endemic dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(1), 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.06.002>
- Ellington, M. J., Findlay, J., Hopkins, K. L., Meunier, D., Alvarez-Buylla, A., Horner, C., McEwan, A., Guiver, M., McCrae, L. X., Woodford, N., & Hawkey, P. (2016). Multicentre evaluation of a real-time PCR assay to detect genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 47(2), 151–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.11.013>
- Favaro, M., Sarti, M., & Fontana, C. (2014). Multiplex real-time PCR probe-based for identification of strains producing: OXA48, VIM, KPC and NDM. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(11), 2995–3001. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1727-8>
- 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. www.seimc.org
- Iovleva, A., & Doi, Y. (2017). Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinics in Laboratory Medicine*, 37(2), 303–315. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.005>
- Jenkins, C., Rentenaar, R. J., & Landraud, L. (2017). Enterobacteriaceae. In *Infectious Diseases (Fourth Edition)* (pp. 1565-1578.e2). <http://rdp.cme.msu.edu>.
- Logan, L. K., & Weinstein, R. A. (2017). The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *Journal of Infectious Diseases*, 215(1), S28–S36. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw282>
- Lutgring, J. D. (2019). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: An emerging bacterial threat. In *Seminars in Diagnostic Pathology* (Vol. 36, Issue 3, pp. 182–186). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2019.04.011>

- Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., Carroll, K. C., Chapin, K. C., Gilligan, P. H., Gonzalez, M. D., Jerris, R. C., Kehl, S. C., Patel, R., Pritt, B. S., Richter, S. S., Robinson-Dunn, B., Schwartzman, J. D., Snyder, J. W., Telford, S., Theel, E. S., Thomson, R. B., Weinstein, M. P., & Yao, J. D. (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. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>
- Monteiro, J., Widen, R. H., Pignatari, A. C. C., Kubasek, C., & Silbert, S. (2012). Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4), 906–909. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr563>
- Pollett, S., Miller, S., Hindler, J., Uslan, D., Carvalho, M., & Humphries, R. M. (2014). Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a health care system in Los Angeles, California, from 2011 to 2013. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(11), 4003–4009. <https://doi.org/10.1128/JCM.01397-14>
- Singh-Moodley, A., & Perovic, O. (2016). Antimicrobial susceptibility testing in predicting the presence of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae in South Africa. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1858-7>
- Teo, J. W. P., La, M. Van, & Lin, R. T. P. (2016). Development and evaluation of a multiplex real-time PCR for the detection of IMP, VIM, and OXA-23 carbapenemase gene families on the BD MAX open system. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(4), 358–361. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.019>
- Van der Zee, A., Roorda, L., Bosman, G., Fluit, A. C., Hermans, M., Smits, P. H. M., van der Zanden, A. G. M., te Witt, R., Bruijnesteijn van Coppenraet, L. E. S., Cohen Stuart, J., & Ossewaarde, J. M. (2014). Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-27>
- World Health Organization. (2017). Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in health care facilities. In WHO. <http://apps.who.int/bookorders>.

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.

Control de Cambios / Change Control		
Versión / Version nº	Cambios / Changes	Fecha / Date
00	Versión Original / Original Version	30/04/2021

Table A 5. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

Revision: 30th April 2021

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



F-566 rev01