

Vitassay qPCR

Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de genes que codifican las carbapenemasas (*NDM*, *VIM*, *OXA*, *KPC* y/o *IMP*) en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of carbapenemase-encoding genes (*NDM*, *VIM*, *OXA*, *KPC* and/or *IMP*) in clinical samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae permite la detección cualitativa y diferenciación de los principales genes que codifican las carbapenemasas (*NDM*, *VIM*, *OXA*, *KPC* y/o *IMP*) mediante PCR en tiempo real directamente de hisopos rectales y a partir de aislados bacterianos de muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones producidas por Enterobacteriaceae resistentes a carbapenémicos.

Referencias

Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae 8x8-well strip, low profile	7041057
Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae 8x8-well strip, high profile	7042057
Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae 16x8-well strip, low profile	7081057
Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae 16x8-well strip, high profile	7082057

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S057A/ 7042S057A	Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae I strips low/high profile	-	4/8 tiras de 8 pocillos
7041S057B/ 7042S057B	Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae II strips low/high profile	-	4/8 tiras de 8 pocillos
7C057	Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	8/16 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación.

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.

- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Sistema de recolección y transporte.
- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR en tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o \leq -70°C).
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

La aparición y propagación de patógenos resistentes a los medicamentos que han adquirido nuevos mecanismos de resistencia, llevando a la resistencia a los antimicrobianos, continúa amenazando nuestra capacidad para tratar infecciones comunes. Los carbapenémicos son una clase potente de antibióticos β -lactámicos que a menudo se utilizan como "agentes de última línea" o "antibióticos de último recurso" cuando los pacientes infectados se enferman gravemente o se sospecha que albergan bacterias resistentes. Sin embargo, la aparición de Enterobacteriaceae resistentes a los carbapenémicos (CRE) se ha convertido en un importante problema de salud pública. Las CRE son una causa emergente de infecciones asociadas a la atención de la salud que tienen un impacto significativo en la morbilidad, la mortalidad y la calidad de vida y representan una carga económica a nivel social. Desde la identificación de Enterobacteriaceae resistentes a carbapenémicos en la década de 1990, CRE se ha extendido por todo el mundo.

La definición actual de CRE por el CDC es Enterobacteriaceae que presentan resistencia a al menos uno de los antibióticos carbapenémicos (ertapenem, meropenem, doripenem o imipenem) o produce una carbapenemasa (una enzima que puede hacerlos resistentes a los antibióticos carbapenémicos). Algunas cepas son innatamente resistentes a los carbapenémicos, mientras que otras contienen elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones) que dan como resultado la producción de enzimas carbapenemasas (carbapenemasas), que degradan la mayoría de los antibióticos betalactámicos, incluidos los carbapenémicos.

Enterobacteriaceae comprende una gran familia de bacterias gramnegativas que comúnmente colonizan a los seres humanos y en ocasiones causan enfermedades. Son anaerobios facultativos, que frecuentemente residen en el tracto intestinal, como parte de la microbiota intestinal normal. Enterobacteriaceae son una causa común de infecciones tanto en la comunidad como en el entorno sanitario. Muchos tipos diferentes

de Enterobacteriaceae pueden desarrollar resistencia, incluidas *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (*E. coli*). El uso generalizado de carbapenémicos para el tratamiento empírico y dirigido de infecciones graves ha provocado la aparición de β -lactamasas hidrolizantes de carbapenémicos, también conocidas como carbapenemasas, como el mecanismo de resistencia más reconocido a los carbapenémicos. Muchos de los genes que codifican las carbapenemasas se encuentran en plásmidos que pueden transferirse entre bacterias y, por lo tanto, es más probable que este tipo de resistencia se propague. Las carbapenemasas, según la clasificación de Ambler, pertenecen a diferentes clases de β -lactamasas: clase A, β -lactamasas de serina (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas (KPC)); clase B, también denominada metalo- β -lactamasa, (metalo- β -lactamasa codificada por el integrón Verona (VIM), metalo- β -lactamasa Nueva Delhi (NDM) y metalo- β -lactamasa activa sobre imipenem (IMP)); clase D, oxacilinasas (OXAs; que está representada en Enterobacteria por enzimas similares a OXA-48).

Aunque los patrones de resistencia pueden ser geográficamente distintos, existe la amenaza de que cualquier nuevo mecanismo de resistencia pueda extenderse rápidamente a otras áreas. Las carbapenemasas de serina KPC están presentes con mayor frecuencia en las Américas, los países mediterráneos y China, mientras que las metalo- β -lactamasas NDM son más prevalentes en el subcontinente indio y Europa del Este. OXA-48 se describió por primera vez entre los aislados clínicos de *K. pneumoniae* en Turquía y posteriormente se ha diseminado en Europa y la región del Mediterráneo, pero se encuentra con menos frecuencia en las Américas. La metalo- β -lactamasa IMP se identificó por primera vez en Japón y ha continuado contribuyendo a la resistencia a los carbapenémicos en otras regiones del sudeste asiático. Aunque no se han extendido ampliamente por el resto del mundo, las carbapenemasas IMP se notifican con mayor frecuencia en los países de Oriente Medio. Las metalo-carbapenemasas VIM se identificaron por primera vez en Italia y Francia e inicialmente se diseminaron rápidamente por el sur de Europa, pero hoy en día, las metalo- β -lactamasas VIM se encuentran en todo el mundo, principalmente en *K. pneumoniae* y el complejo *E. cloacae*.

Las CRE pueden causar infecciones en casi cualquier parte del cuerpo, incluidas infecciones del torrente sanguíneo, neumonía asociada al ventilador, abscesos intraabdominales e infecciones que afectan el tracto urinario. Los portadores de Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas a menudo son asintomáticos. Las CRE generalmente se transmiten de persona a persona a través del contacto con personas infectadas o colonizadas, particularmente el contacto con heridas o heces. En entornos sanitarios, este contacto puede producirse a través de las manos del personal sanitario o a través de equipos médicos contaminados. El tratamiento con antibióticos β -lactámicos a largo plazo, fluoroquinolonas, ventilación mecánica, nutrición parenteral, catéteres urinarios permanentes, trasplante de órganos e ingreso en UCI plantean factores de riesgo independientes. El riesgo también aumenta en aquellos pacientes con diabetes e inmunodeprimidos. Además, los desagües de los lavabos y los inodoros se

reconocen cada vez más como un reservorio ambiental y una fuente de transmisión de CRE.

Los laboratorios clínicos pueden realizar pruebas fenotípicas para la producción de carbapenemasas (Carba NP, Método de inactivación de carbapenémicos modificado (mCIM), prueba de Hodge modificada (MHT)) o ensayos moleculares para detectar la presencia de un gen de carbapenemasa como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

NOTA: Nos referiremos a los genes que codifican las carbapenemasas de la siguiente manera: bla_{NDM} = *NDM*, bla_{VIM} = *VIM*, bla_{KPC} = *KPC*, $bla_{OXA-48\ like}$ = *OXA* and bla_{IMP} = *IMP* (*IMP-1* clúster + *IMP-8* clúster)*

**IMP-1* clúster 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* clúster incluye: *IMP-2*, *IMP-8*, *IMP-16*, *IMP-19*, *IMP-20*, *IMP-22*, *IMP-24*.

Principio del test

Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de los genes *NDM*, *VIM*, *OXA-48* y *OXA-48-like*, *KPC* e *IMP*. Tras la extracción de DNA, la presencia de carbapenemasas se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

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

Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae se trata de un ensayo listo para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR en tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira (Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae I strips low/high profile) contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de los genes *NDM* y/o *VIM*, codificantes de carbapenemasas así como el Control Interno (CI). Tras la reacción de amplificación, *NDM* se detecta en el canal FAM, *VIM* se detecta en el canal ROX, y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado). La segunda tira (Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae II strips low/high profile) contiene la mezcla de reacción

multiplex para la detección de los genes *OXA*, *KPC* y/o *IMP*, codificantes de carbapenemasas. Tras la reacción de amplificación *OXA* se detecta en el canal FAM, *KPC* se detecta en el canal ROX e *IMP* se detecta en el canal Cy5.

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles (libres de RNase/DNase) desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

- Asegurarse de utilizar un pocillo para la detección de los genes *NDM* y *VIM* y otro para la detección de los genes *OXA*, *KPC* e *IMP*. Tener cuidado de no mezclarlos durante todo el proceso.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de DNA

Las muestras de pacientes deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Para hisopos rectales y aislados bacterianos procedentes de muestras clínicas, los siguientes kits de extracción han sido validados:

GXT NA Extraction kit in GenoXtract® system (Hain).

MagDEA Dx SV Kit, utilizando the magLEAD® 6gC or 12gC instrument (Precision System Science Co.).

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae Positive Control (tubo rojo) con 200 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo para cada ensayo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).

- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (genes *NDM* y *OXA*), ROX (genes *VIM* y *KPC*), Cy5 (gen *IMP*) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno (CI)). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, Applied Biosystems StepOne™, y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

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

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

Control positivo

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

Control negativo

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

El control interno (CI) debe mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos de los controles positivo y negativo.

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

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

Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae I			Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae II			Interpretación
NDM (FAM)	VIM (ROX)	Control Interno (HEX)	OXA (FAM)	KPC (ROX)	IMP (Cy5)	
+	-	+/-*	-	-	-	Enterobacteriaceae que expresa <i>NDM</i>
-	+	+/-*	-	-	-	Enterobacteriaceae que expresa <i>VIM</i>
-	-	+/-*	+	-	-	Enterobacteriaceae que expresa <i>OXA</i>
-	-	+/-*	-	+	-	Enterobacteriaceae que expresa <i>KPC</i>
-	-	+/-*	-	-	+	Enterobacteriaceae que expresa <i>IMP</i>
-	-	+#	-	-	-	Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas no detectadas [#]
-	-	- [#]	-	-	-	Inválido [#]

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40)

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct ≥40 o no señal)

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

[#] En el caso de que la detección de los genes diana de Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas resulte negativa, el CI 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 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 repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

La tabla muestra solo los resultados más representativos que se pueden esperar con el ensayo Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae. Una muestra de paciente puede contener simultáneamente varios genes que codifican carbapenemasas.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

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

Control de Calidad

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

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

La sensibilidad y la especificidad clínica de Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae se evaluó utilizando directamente hisopos rectales y a partir de aislados bacterianos de muestras clínicas.

En los dos estudios realizados en el Laboratorio de referencia de Cataluña la extracción se realizó con el kit de extracción GXT NA utilizando el GenoXtract® system (Hain), siguiendo las instrucciones de uso y el termociclador utilizado fue el Applied BioSystem 7500 RT PCR System.

En ambos estudios los resultados obtenidos con Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae se compararon con la caracterización fenotípica seguida del ensayo LightMix® modular carbapenemase. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Laboratorio Referencia Cataluña (Aislados bacterianos de muestras clínicas)

Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<u>Global:</u> Carbapenemase- generating <i>Enterobacteriaceae</i>	80	17	0	0	1 (0.95-1)	1 (0.80-1)	1 (0.95-1)	1 (0.80-1)
gen OXA	33	64	0	0	1 (0.89-1)	1 (0.94-1)	1 (0.89-1)	1 (0.94-1)
gen VIM	23	74	0	0	1 (0.85-1)	1 (0.95-1)	1 (0.85-1)	1 (0.95-1)
gen NDM	19	78	0	0	1 (0.82-1)	1 (0.95-1)	1 (0.82-1)	1 (0.95-1)
gen KPC	2	95	0	0	1 (0.16-1)	1 (0.96-1)	1 (0.16-1)	1 (0.96-1)
gen IMP	7	90	0	0	1 (0.59-1)	1 (0.96-1)	1 (0.59-1)	1 (0.96-1)

TP = Verdaderos Positivos, TN = Verdaderos Negativos, FP = Falsos Positivos, FN = Falsos Negativos, SE = Sensibilidad, SP = Especificidad, PPV = Valor Predictivo Positivo, NPV = Valor Predictivo Negativo.

Laboratorio Referencia Cataluña (Hisopos rectales)

Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<u>Global:</u> Carbapenemase- generating <i>Enterobacteriaceae</i>	34	16	0	0	1 (0.91-1)	1 (0.79-1)	1 (0.91-1)	1 (0.79-1)
gen OXA	13	37	0	0	1 (0.75-1)	1 (0.90-1)	1 (0.75-1)	1 (0.90-1)
gen VIM	11	39	0	0	1 (0.71-1)	1 (0.91-1)	1 (0.71-1)	1 (0.91-1)
gen NDM	10	40	0	0	1 (0.69-1)	1 (0.91-1)	1 (0.69-1)	1 (0.91-1)
gen KPC	5	45	0	0	1 (0.47-1)	1 (0.92-1)	1 (0.47-1)	1 (0.92-1)
gen IMP	0	50	0	0	n.a*	1 (0.91-1)	n.a*	1 (0.91-1)

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

Estos resultados muestran una alta concordancia para detectar *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de los genes *NDM*, *VIM*, *OXA*, *KPC* e *IMP* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene 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*.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada		
Aislado de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productor de TEM-1 (no-ESBL), SHV-1 (no-ESBL), CTX-M-2 (ESBL), y KPC-2	<i>H. pylori</i> resistente a claritromicina (23S rRNA A2146G)	<i>H. pylori</i> resistente a claritromicina (23S rRNA A2147G)
<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	<i>Enterococcus faecium</i> tipo VanA cepa LMG16165	<i>Enterococcus faecium</i> tipo VanA IOWA 1
<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	<i>E. faecalis</i> tipo VanB (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz	<i>Enterococcus faecium</i> tipo VanB IOWA 2
<i>Enterococcus gallinarum</i> tipos VanC y VanB ENT20120142	<i>Enterococcus gallinarum</i> tipo VanC (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (MRSA) N315
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina ST398	<i>Staphylococcus aureus</i> mecC resistente a la meticilina	Aislado cMRSA (oxa _R , PVL-positivo, spa:t 310)

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae 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 braaki* 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 pneumoniae* 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.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- 7500 RT PCR System (Applied Biosystems)
- CFX96 TM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^I
- LightCycler 480 II (Roche)

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de los equipos.

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

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por Enterobacteriaceae resistentes a carbapenémicos. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en hisopos rectales y aislados bacterianos procedentes de muestras clínicas. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae Positive Control, muestras que

contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

- La detección puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido el aislamiento de DNA); c) Degradación del DNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) la carga de los patógenos en la muestra esté por debajo del límite de detección del ensayo; e) presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir infecciones por resistencias a antibióticos o durante el tratamiento de la infección); f) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante.
- La detección del DNA puede no indicar la presencia de patógenos viables y/o infecciosos o que dichos patógenos sean los agentes causantes de los síntomas clínicos.
- Los resultados negativos no impiden la infección por Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimos para la identificación de Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar los patógenos.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas, y se han descartado otras enfermedades de resistencia a antibióticos, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR, el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.
- El análisis de la hibridación de los primers con herramientas bioinformáticas (NCBI BLAST) mostró que este kit detecta los siguientes miembros de cada familia de genes de carbapenemasas diana:

Familia	Miembros de la familia
NDM	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29
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
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
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

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

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

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cyclor
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System
7500 Real-Time PCR System
7900 HT Real-Time PCR System
ABI PRISM 7000
ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
MyiQ™ 2 Real-Time PCR Detection System
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cyclor
Cepheid
SmartCycler®
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor*
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Stratagene / Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

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

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene® Q Qiagen	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTiite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

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

Intended use

Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae allows the qualitative detection and differentiation of the main carbapenemase-encoding genes (*NDM*, *VIM*, *OXA*, *KPC* and/or *IMP*) by real-time PCR directly from rectal swabs and from bacterial isolates of clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections alongside the patient's clinical data and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae 8x8-well strip, low profile	7041057
Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae 8x8-well strip, high profile	7042057
Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae 16x8-well strip, low profile	7081057
Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae 16x8-well strip, high profile	7082057

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S057A/ 7042S057A	Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae I strips low/high profile	-	4/8 x 8-well strip
7041S057B/ 7042S057B	Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae II strips low/high profile	-	4/8 x 8-well strip
7C057	Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	8/16 x 8-cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. To avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- Collection and transport system.
- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

The emergence and spread of drug-resistant pathogens that have acquired new resistance mechanisms, leading to antimicrobial resistance, continues to threaten our ability to treat common infections. Carbapenems are a potent class of β -lactam antibiotics that are often used as “last-line agents” or “antibiotics of last resort” when infected patients become severely ill or are suspected of harboring resistant bacteria. However, the emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) has become a major public health concern. CRE are an emerging cause of Health care-associated infections which have a significant impact on morbidity, mortality and quality of life and represent an economic burden at the societal level. Since the identification of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the 1990s, CRE has spread worldwide.

The current CRE definition by CDC is Enterobacteriaceae that test resistant to at least one of the carbapenem antibiotics (ertapenem, meropenem, doripenem, or imipenem) or produce a carbapenemase (an enzyme that can make them resistant to carbapenem antibiotics). Some strains are innately resistant to carbapenems, while others contain mobile genetic elements (plasmids, transposons) that result in the production of carbapenemase enzymes (carbapenemases), which break down most beta-lactam antibiotics, including carbapenems.

Enterobacteriaceae comprise a large family of gram-negative bacteria that commonly colonize humans and sometimes cause disease. They are facultative anaerobes, frequently residing in the intestinal tract, as part of the normal gut microbiota. Enterobacteriaceae are a common cause of infections in both community and healthcare settings. Many different types of Enterobacteriaceae can develop resistance, including *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* (*E. coli*). The widespread use of carbapenems for empiric and directed treatment of severe infections has resulted in the emergence of carbapenem-hydrolyzing β -lactamases, also known as carbapenemases, as the most well-recognized mechanism of resistance to carbapenems. Many of the genes coding for carbapenemases are located in plasmids which can be transferred between bacteria and hence this type of resistance is more likely to spread. The

carbapenemases, according to Ambler's classification, belong to different classes of β -lactamases: class A, serine β -lactamases (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC)); class B, also named metallo- β -lactamase, (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase (VIM), New Delhi metallo- β -lactamase (NDM), and metallo- β -lactamase active on imipenem (IMP)); class D, oxacillinases (OXAs; which is represented in Enterobacteria by OXA-48-like enzymes).

Although resistance patterns may be geographically distinct, the threat remains that any new resistance mechanism may spread rapidly to other areas. KPC serine carbapenemases are present more frequently in the Americas, the Mediterranean countries, and China, whereas NDM metallo- β -lactamases are more prevalent in the Indian subcontinent and Eastern Europe. OXA-48 was first described among clinical isolates of *K. pneumoniae* from Turkey and has subsequently disseminated in Europe and the Mediterranean region, but it is found less frequently in the Americas. IMP metallo- β -lactamase was first identified in Japan and have remained continuing contributors to carbapenem resistance in other regions of Southeast Asia. Although they have not spread extensively throughout the rest of the world, IMP carbapenemases are being reported more frequently in Middle Eastern countries. VIM metallo-carbapenemases were first identified in Italy and France and initially spread rapidly throughout southern Europe, but today, VIM metallo- β -lactamases are found globally, mainly in *K. pneumoniae* and *E. cloacae* complex.

CRE can cause infections in almost any body part, including bloodstream infections, ventilator-associated pneumonia, intra-abdominal abscesses, and infections that involve the urinary tract. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae carriers are often asymptomatic. CRE are usually spread person to person through contact with infected or colonized people, particularly contact with wounds or stool. In healthcare settings, this contact can occur via the hands of healthcare personnel, or through contaminated medical equipment. Treatment with long-term β -lactam antibiotics, fluoroquinolones, mechanical ventilation, parenteral nutrition, permanent urinary catheters, organ transplantation and ICU admission pose independent risk factors. The risk is also increased in those patients with diabetes and immunocompromised. Additionally, sink drains and toilets are increasingly recognized as an environmental reservoir and CRE transmission source.

Clinical laboratories can perform phenotypic tests for carbapenemase production (Carba NP, Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM), Modified Hodge Test (MHT)) or molecular assays for the presence of a carbapenemase gene such as polymerase chain reaction (PCR).

NOTE: We will refer to carbapenemase-encoding genes as follows: $bla_{NDM} = NDM$, $bla_{VIM} = VIM$, $bla_{KPC} = KPC$, $bla_{OXA-48 \text{ like}} = OXA$ and $bla_{IMP} = IMP$ (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.

Principle of the test

Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae is based on the real-time amplification of a conserved region of the *NDM* gene, *VIM* gene, *OXA-48* and *OXA-48-like* genes, *KPC* gene and *IMP* gene. After DNA extraction, the presence of carbapenemases is detected by an increase in the fluorescence observed during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

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

Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. Each kit includes two kind of strips and each one corresponds to one different assay. The first strip (Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae I strips low/high profile) contains the multiplex reaction mix for the detection of *NDM* and/or *VIM* carbapenemase-encoding genes and contains the internal control (IC). The second strip (Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae II strips low/high profile) contains the multiplex reaction mix for the detection of *OXA*, *KPC* and/or *IMP* carbapenemase-encoding genes. *NDM* and *OXA* are amplified and detected in FAM channel, *VIM* and *KPC* are amplified and detected in ROX channel, the internal control (IC) is amplified and detected in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used) and *IMP* is amplified and detected in Cy5 channel.

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.

- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the tube bottom, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Make sure to use a well for determining *NDM* and *VIM* genes and another well for determining *OXA*, *KPC* and *IMP* genes. Be careful not to mix them throughout the process.

Procedures

Specimen collection, processing, and DNA extraction

Patient samples must be collected, transport and storage according to appropriate laboratory guidelines. For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. Follow the manufacturer's instructions for use. For rectal swabs and bacterial isolates from clinical samples, the assay has been validated with the following extraction kits:

GXT NA Extraction kit in GenoXtract® system (Hain).

MagDEA Dx SV Kit, using the magLEAD® 6gC or 12gC instrument (Precision System Science Co.).

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae Positive Control (red tube) with 200 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run for each assay.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative (yellow tube) or positive (red tube) controls and add them to the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (*NDM* and *OXA* genes), ROX (*VIM* and *KPC* genes), Cy5 (*IMP* gene) and HEX, JOE, or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast, the Applied

Biosystems StepOne™ or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none (attached II).

Analysis and interpretation of results

The results' analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control (IC) signal emission.

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

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve ($Ct \leq 40$) in FAM, ROX, Cy5 and HEX, VIC, or JOE channels, which validates the reaction.

Negative control

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

The Internal Control (IC) should show an amplification signal ($Ct \leq 40$) in Positive and Negative Controls wells.

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

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

Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae I			Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae II			Interpretation
NDM (FAM)	VIM (ROX)	Internal Control (HEX)	OXA (FAM)	KPC (ROX)	IMP (Cy5)	
+	-	+/-*	-	-	-	NDM-expressing Enterobacteriaceae
-	+	+/-*	-	-	-	VIM-expressing Enterobacteriaceae
-	-	+/-*	+	-	-	OXA-expressing Enterobacteriaceae
-	-	+/-*	-	+	-	KPC-expressing Enterobacteriaceae
-	-	+/-*	-	-	+	IMP-expressing Enterobacteriaceae
-	-	+#	-	-	-	Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae not detected [#]
-	-	- [#]	-	-	-	Invalid [#]

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

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

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

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

Table shows only the most representative results that can be expected with the Vitassay qPCR Carbapenemase- generating Enterobacteriaceae kit. One patient sample can simultaneously contain several carbapenemase-encoding genes.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each qPCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity.

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

Quality Control

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

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

The clinical sensitivity and specificity of Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae was evaluated using directly rectal swabs and from bacterial isolates from clinical samples.

In the two studies carried out in the Reference Laboratory of Catalonia, the extraction was carried out with the GXT NA extraction kit using the GenoXtract® system (Hain), following the instructions for use and the thermal cycler used was the Applied BioSystem 7500 RT PCR System.

In both studies the results obtained with Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae were compared with phenotypic characterization followed by the LightMix® modular carbapenemase assay. The results obtained were the following:

Reference Laboratory of Catalonia (bacterial isolates from clinical samples)								
Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<u>Global:</u> Carbapenemase-generating <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)

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

Reference Laboratory of Catalonia (rectal swabs)								
Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<u>Global:</u> Carbapenemase- generating <i>Enterobacteriaceae</i>	34	16	0	0	1 (0.91-1)	1 (0.79-1)	1 (0.91-1)	1 (0.79-1)
<i>OXA</i> gene	13	37	0	0	1 (0.75-1)	1 (0.90-1)	1 (0.75-1)	1 (0.90-1)
<i>VIM</i> gene	11	39	0	0	1 (0.71-1)	1 (0.91-1)	1 (0.71-1)	1 (0.91-1)
<i>NDM</i> gene	10	40	0	0	1 (0.69-1)	1 (0.91-1)	1 (0.69-1)	1 (0.91-1)
<i>KPC</i> gene	5	45	0	0	1 (0.47-1)	1 (0.92-1)	1 (0.47-1)	1 (0.92-1)
<i>IMP</i> gene	0	50	0	0	n.a*	1 (0.91-1)	n.a*	1 (0.91-1)

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

These results show high agreement to detect Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR Carbapenemase-generating *Enterobacteriaceae*.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined from serial dilutions (1:10) of standards of the *NDM*, *VIM*, *OXA*, *KPC* and *IMP* genes (10^7 - 10^1 copies/reaction). This assay has a detection limit of 10 DNA copies per reaction for the *NDM*, *KPC* and *IMP* genes, 50 DNA copies per reaction for *OXA* and 100 DNA copies per reaction for *VIM*.

Analytical specificity

The analytical specificity for the Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* detection was confirmed by testing a panel composed of the following microorganisms, where no cross-reactivity was seen between any of the species except with the target pathogens detected by each assay:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada

TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL), and KPC-2 producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolate	<i>H. pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rRNA A2146G)	<i>H. pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rRNA A2147G)
VanA-type <i>Enterococcus avium</i>	VanA- type <i>Enterococcus faecium</i> LMG16165 strain	VanA- type <i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1
VanA-type <i>Enterococcus faecalis</i>	VanB-type <i>E. faecalis</i> (Andrewes and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz	VanB- type <i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2
VanC and VanB- types <i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142	VanC type- <i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge and Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz and Schleifer 1984 VP	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ST398	mecC Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	cMRSA isolate (oxa _R , PVL-positive, spa:t 310)

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae 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 pneumoniae* isolate; OXA-48 producing *Serratia marcescens* isolate; TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL), and KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* isolate and TEM-1 (non-ESBL) and IMP-1 producing *Escherichia coli* isolate, showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- 7500 RT PCR System (Applied Biosystems)
- CFX96 TM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^I
- LightCycler 480 II (Roche)

I: For Rotor-Gene® Q thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q tubes.

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

Limitations

- This test provides a preliminary diagnosis of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infection. All results must be interpreted by a specialist together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with rectal swabs and bacterial isolates of clinical samples. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; DNA from clinical specimens must be extracted properly.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This is a qualitative test.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by Carbapenemase-generating Enterobacteriaceae Positive Control, samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- Detection may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage, handling; b) procedural errors (including DNA isolation); c) DNA degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) pathogen load in the specimen below the limit of detection for the assay; e) the presence of Real Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent drug-resistant infections or used during the treatment of the infection was not performed); f) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures.
- DNA detection may not indicate the presence of viable and/or infectious pathogens or that those pathogens are the causative agents for clinical symptoms.
- Negative results do not preclude Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Optimum specimen types for the Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae identification and/or stage of infection most suitable for its collection have not been established yet. Consider the collection of multiple

specimens from the same patient at different time points, which may increase the probability of detecting the pathogens.

- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae infection, and other drug-resistant related illnesses have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type and its previous treatment, among others.
- A bioinformatics tool (NCBI BLAST) analysis of the primer alignments showed that this kit detects the following members for each family of the target carbapenemase genes:

Family	Family Members
NDM	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29
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
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
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

Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Bio Molecular Systems	Exicycler™ 96
Mic Real Time PCR Cyclor	Bio-Rad
Cepheid	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
SmartCycler®	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Precision System Science Co., Ltd.	iCycler iQ™5 Real-Time PCR
geneLEAD VIII System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
Qiagen	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Rotor-Gene® Q	Bio Molecular Systems
Roche	Mic Real Time PCR Cyclor
LightCycler @480 Real-Time PCR System	Cepheid
LightCycler @96 Real-Time PCR System	SmartCycler®
Cobas z480 Analyzer	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System*
	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor*
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Precision System Science Co., Ltd.
	geneLEAD VIII System
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* See Attached III to configure exposure settings.

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

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

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

Attached III: Optical measurement exposure setting

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

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

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

Bibliography/Bibliografía










1. World Health Organization. Antimicrobial resistance. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> Accessed May 2021.
2. Chen HY, Jean SS, Lee YL, Lu MC, Ko WC, Liu PY, Hsueh PR. (2021) Carbapenem-Resistant Enterobacterales in Long-Term Care Facilities: A Global and Narrative Review. *Front Cell Infect Microbiol.* Apr 23;11:601968.
3. Hughes LD, Aljawadi A, Pillai A. (2019) An overview of carbapenemase producing enterobacteriaceae (CPE) in trauma and orthopaedics. *J Orthop.* Jul 2;16(6):455-458.
4. Ramsamy Y, Misana KP, Allam M, Amoako DG, Abia ALK, Ismail A, Singh R, Kisten T, Han KS, Muckart DJJ, Hardcastle T, Suleman M, Essack SY. (2020) Genomic Analysis of Carbapenemase-Producing Extensively Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates Reveals the Horizontal Spread of p18-43_01 Plasmid Encoding *bla*_{NDM-1} in South Africa. *Microorganisms.* Jan 17;8(1):137.
5. World Health Organization. Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities. Available from: <https://www.who.int/infection-prevention/publications/guidelines-cre/en/> Accessed May21.
6. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). CRE Technical Information. Available from: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/technical-info.html> Accessed May21
7. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Clinicians: Information about CRE. Available from: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/cre-clinicians.html> Accessed May21
8. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Patients: Information about CRE. Available from: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/cre-patients.html> Accessed May21
9. Fontana C, Angeletti S, Mirandola W, Cella E, Alessia L, Zehender G, Favaro M, Leoni D, Rose DD, Gherardi G, Florio L, Salemi M, Andreoni M, Sarmati L, Ciccozzi M. (2020) Whole genome sequencing of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: evolutionary analysis for outbreak investigation. *Future Microbiol.* Feb;15:203-212.
10. Logan LK, Weinstein RA. (2017) The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis.* Feb 15;215(suppl_1):S28-S36.
11. Bush K, Bradford PA. (2020) Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* Feb 26;33(2):e00047-19.

12. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Carbapenemase Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CP-CRE) 2018 Case Definition. Available from: <https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/carbapenemase-producing-carbapenem-resistant-enterobacteriaceae/case-definition/2018/>
Accessed May21

Trademarks

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

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
DIL	Diluyente de muestra Buffer (sample diluent)		Número de referencia Catalogue number



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

www.vitassay.com