

Vitassay qPCR

Gram-negative Nosocomial Agents II

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y la identificación del ADN de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Proteus mirabilis* en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and identification of DNA of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and/or *Proteus mirabilis* in clinical samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II permite la detección cualitativa y la identificación del ADN de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Proteus mirabilis* mediante PCR en tiempo real en hemocultivo y muestras de hisopos como por ejemplo biopsia, hisopos de glúteos, hisopos de úlceras, hisopos de herids, hisopos de lengua, hisopos de líquido articular, hisopos orales, hisopos de cabello, hisopos perineales, hisopos uretrales, hisopos de abscesos e hisopos de ostomía de pacientes con sospecha de infección bacteriana y/o infección o colonización e hisopados para control epidemiológico como hisopos nasales, faríngeos, rectales, hisopos axilares, hisopos inguinales, hisopos epiteliales, hisopos de colostomía, hisopos de un estoma, BAS, BAL y esputos por su profesional de la salud. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Proteus mirabilis*, junto con los datos clínicos del paciente, los factores de riesgo epidemiológicos y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

Referencias

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II

4x8-well strip, low profile

7041074

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II

4x8-well strip, high profile

7042074

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S074/ 7042S074	Gram-negative II strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C074	Gram-negative II 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	-	4 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.
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o \leq -70°C).
- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Pseudomonas aeruginosa, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* son patógenos Gram-negativos nosocomiales multirresistentes. Sus infecciones afectan principalmente a los pacientes de las unidades de cuidados intensivos y a los pacientes inmunodeprimidos. La adaptación al entorno hospitalario junto con su capacidad para adquirir fácilmente múltiples elementos genéticos móviles que albergan genes de resistencia y virulencia están generando cepas multirresistentes (MDR) de estos patógenos, lo que está causando un importante problema sanitario en todo el mundo.

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa común que se encuentra en el medio ambiente. *P. aeruginosa* puede ser un importante factor patógeno de infecciones graves y oportunistas en los seres humanos. Debido a varios factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis y a genes de resistencia a antibióticos incluidos en el genoma de *P. aeruginosa*, la bacteria es capaz de causar infecciones tanto agudas como crónicas. Algunos de sus factores de virulencia son la membrana externa que tiene una bicapa asimétrica que limita la entrada de compuestos nocivos, las biopelículas formadas por la bacteria que son altamente resistentes a los antibióticos, a los desinfectantes y a las defensas del huésped, los pilis tipo IV que son estructuras esenciales para el inicio de la infección al mediar la motilidad y la adhesión, entre otros. Pero el factor de virulencia más tóxico de *P. aeruginosa* es la exotoxina A, que en su interior es responsable de la actividad necrosante en el sitio de colonización.

Se suele aislar de plantas, frutas, suelo y ambientes acuáticos, como ríos, lagos y piscinas. Infecta las vías respiratorias y el tracto urinario, causa infecciones en la sangre,

además es la causa más común de infecciones por quemaduras, dermatitis por bañera caliente e infecciones del oído externo. Debido a su resistencia natural y adquirida a los antibióticos, el tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa* puede ocasionar problemas.

Es una de las principales causas de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria, siendo especialmente problemática en las unidades de cuidados intensivos, siendo el colonizador más frecuente de dispositivos médicos. Sus infecciones se asocian a una alta morbilidad y mortalidad en muchos grupos, incluyendo individuos con neumonía asociada a la asistencia sanitaria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o fibrosis quística, en cuyo estadio el patógeno es prácticamente imposible de erradicar. Está incluido en la categoría "crítica" de la lista prioritaria de la OMS de patógenos bacterianos para los que se necesita urgentemente la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos.

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que también incluye los conocidos géneros *Salmonella* y *Escherichia*.

Esta bacteria puede localizarse en la superficie de las mucosas de los animales, pero en los seres humanos se encuentra sobre todo en el tracto gastrointestinal, y, en menor medida, en la nasofaringe, donde la bacteria puede entrar en el torrente sanguíneo u otros tejidos y causar infección. Los nichos en los que se encuentra son el suelo, el agua, algunas especies de plantas, insectos, aves, reptiles y diversos mamíferos de los cuales puede ser tanto un organismo comensal, como un patógeno potencial.

La mayoría de las infecciones por *K. pneumoniae* son infecciones oportunistas asociadas a la atención sanitaria, a veces denominadas infecciones "clásicas" por *K. pneumoniae*. Las manifestaciones más comunes son la neumonía, las infecciones del tracto urinario y de las heridas, cualquiera de las cuales puede evolucionar a una bacteriemia. Los grupos de pacientes vulnerables, como los neonatos, los ancianos, los que tienen dispositivos médicos insertados y los inmunodeprimidos, son los que corren más peligro. *K. pneumoniae* también puede causar endoftalmítis, neumonía, fascitis necrotizante, absceso no hepático, meningitis y absceso hepático piógeno en ausencia de enfermedad del tracto biliar, cuando está fuera del hospital. Algunos de sus factores de virulencia son los sideróforos adquiridos, moléculas que pueden barrer competitivamente el hierro de las proteínas del huésped o de otras fuentes, y los receptores de superficie para su internalización, así como el locus *ybt*, que se encuentra con una frecuencia del 6-80% y del 78-100% en los clones MDR e hipervirulentos de todo el mundo, respectivamente, un policétido genotóxico colibactina, que induce daños en el ADN de las células eucariotas, entre otros.

La OMS reconoce que la *K. pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido y resistente a los carbapenemes es una amenaza crítica para la salud pública. Este patógeno, así como *Pseudomonas aeruginosa*, son miembros de los patógenos ESKAPE, que se describen como la principal causa de infecciones nosocomiales resistentes. Ambos tienen resistencia inherente a uno o más antibióticos, y las cepas individuales han acumulado resistencia a una amplia gama de medicamentos.

Proteus mirabilis

Proteus mirabilis, una bacteria Gram-negativa, que pertenece a la clase *Gammaproteobacteria*. Durante mucho tiempo ha sido reconocida como un miembro de las *Enterobacteriales* más antiguas, familia *Eterobacteriaceae*, sin embargo, en los últimos años se ha sugerido que el género *Proteus* va a ser colocado dentro de una nueva familia *Morganellaceae*.

La bacteria se puede encontrar en una amplia variedad de ambientes, incluyendo el suelo, las fuentes de agua y las aguas residuales, pero es predominantemente un comensal del tracto gastrointestinal de los seres humanos (junto con las especies de *Klebsiella*, y *Escherichia coli*) y los animales.

Proteus mirabilis es capaz de causar una serie de infecciones humanas, incluyendo heridas, el ojo, el tracto gastrointestinal y el tracto urinario. Las infecciones del tracto urinario y las asociadas a catéteres a veces se ven agravadas por la producción de cálculos en la vejiga y en el riñón (urolitiasis), así como por el daño renal persistente, pudiendo provocar bacteriemia y sepsis.

Las infecciones del tracto urinario son más frecuentes en personas de entre 20 y 50 años y más comunes en mujeres. Es una causa común de infección en bebés varones de todas las edades, así como en hombres y mujeres de edad avanzada, y puede provocar problemas graves como infecciones recurrentes, pielonefritis con sepsis, lesión renal infantil, parto prematuro y complicaciones relacionadas con los antibióticos.

La movilidad de *P. mirabilis* se debe a sus flagelos, que no sólo ayudan a la colonización, sino que también se han relacionado con su capacidad para crear biopelículas y se cree que contribuyen a la resistencia a las defensas del huésped y a ciertos antibióticos. Además, *P. mirabilis* produce dos toxinas, la hemolisina (HpmA) y la toxigenina de *Proteus* (Pta), que se han relacionado con la destrucción de los tejidos y la transmisión renal, lo que provoca una pielonefritis aguda.

Principio del test

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del gen *oprL* para *Pseudomonas aeruginosa*, del gen *Hemolysin* para *Klebsiella pneumoniae* y del gen *hns* para *Proteus mirabilis*. Tras la

extracción de DNA, la presencia de los virus se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

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

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II, se trata de una prueba lista para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. Los pocillos contienen la mezcla de reacción multiplex para la detección de genes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, así como el Control Interno (CI). Tras la reacción de amplificación, el gen *hns* se detecta en el canal Cy5, el gen *oprL* en el canal FAM, el gen *Hemolysin* se detecta en el canal ROX y el control interno en el canal HEX, VIC o JOE (dependiendo del equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de

pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa.

- 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.
- 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.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de DNA

Para la recogida, la conservación y el transporte de las muestras deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II ha sido probado en muestras de hemocultivos y muestras de pacientes con sospecha de infección bacteriana y/o infección multirresistente o colonización e hisopados para control epidemiológico como hisopado de biopsia, glúteo, úlcera, herida, lengua, líquido articular, oral, capilar, perineal, uretral, absceso, ostomía, nasal, faríngea, rectal, axilar, epitelial inguinal, colotomía y estoma; BAS, BAL y esputo. Las muestras de hisopos han sido recolectadas en el medio de transporte AMIES (DeltaLab). El usuario debe validar otros tipos de muestras.

En general, las muestras clínicas deben recogerse adecuadamente en recipientes limpios con o sin medios de transporte (según el tipo de muestra), etiquetarse correctamente y procesarse con prontitud para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. El transporte de las muestras debe realizarse a temperatura ambiente durante un máximo de 2 horas. Para un transporte de mayor duración (más de 2 horas), se aconseja el envío a una temperatura igual o inferior a -80°C. Las muestras pueden almacenarse congeladas a una temperatura igual o inferior a -20°C (idealmente -80°C) para su conservación. Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Para más información puede consultar las siguientes guías:

- IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94)
- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

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

MagDEA Dx SV kit, utilizando el instrumento magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.).

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Gram-negative II Positive Control (tubo rojo) con 100 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 uno de los ensayos).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.

- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia se deben recoger durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (gen *oprL*), Cy5 (gen *hns*), ROX (gen *Hemolysin*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

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

Utilice la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la reacción (antes de la interpretación de los resultados de las muestras), para garantizar que el threshold se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de threshold puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal. Se recomienda establecer los valores de threshold para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final.

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 ($C_t \leq 40$) en los canales FAM, ROX y Cy5.

Control negativo

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

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

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

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

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II					
<i>P. aeruginosa</i> (FAM) ³	<i>K. pneumoniae</i> (ROX) ⁴	<i>P. mirabilis</i> (Cy5) ⁴	Control Interno (HEX)	Interpretación	
+	+	-	+/- ¹	Válido	DNA de <i>P. aeruginosa</i> y <i>K. pneumoniae</i> detectado
+	-	-	+/- ¹	Válido	DNA de <i>P. aeruginosa</i> detectado
-	+	-	+/- ¹	Válido	DNA de <i>K. pneumoniae</i> detectado
-	-	+	+/- ¹	Válido	DNA de <i>P. mirabilis</i> detectado
+	-	+	+/- ¹	Válido	DNA de <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. mirabilis</i> detectado
+	+	+	+/- ¹	Válido	DNA de los tres patógenos detectado
-	+	+	+/- ¹	Válido	DNA de <i>K. pneumoniae</i> y <i>P. mirabilis</i> detectado
-	-	-	+ ²	Válido	Dianas no detectadas
-	-	-	-. ²	Inválido	Test fallido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

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

² En el caso de que la detección de las regiones diana de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación

con Ct \leq 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 RT-qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

³ Para el gen *oprL* de *P. aureoginosa* se ha establecido un Ct de corte de 37. Así:

(+) Positivo: Señal de amplificación (Ct \leq 37)

(-) Negativo: No hay señal de amplificación (Ct >37 o no hay señal)

⁴ Para los genes *Hemolysin* de *K. pneumoniae* y *hns* de *P. mirabilis* se ha establecido un Ct de corte de 35. Así:

(+) Positivo: Señal de amplificación (Ct \leq 35)

(-) Negativo: No hay señal de amplificación (Ct >35 o no hay señal)

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 RT-qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de fluorescencia. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado, en función del material disponible (obtener un nuevo espécimen y volver a testar, volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, repetir RT-qPCR con la misma muestra de DNA aislada).

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 evolución del funcionamiento clínico de Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II se evaluó en dos estudios comparativos-retrospectivos, en los cuales fueron analizadas un total de 417 muestras de hemocultivo en el primer estudio y 620 muestras de hisopos en el segundo; obtenidos cada 15 días entre marzo de 2021 y marzo de 2022 y de marzo a mayo de 2021, respectivamente. La extracción de las muestras en ambos estudios se realizó con MagDEA Dx SV kit usando el sistema automático MagLEAD® 12 gC instrument (Precision System Science Co.) y para el análisis se utilizó el equipo DTprime Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology).

En el primer estudio, los resultados obtenidos con Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II fueron comparados con los resultados obtenidos en cultivo. Los resultados incongruentes fueron analizados con Magicplex™ Sepsis ID6 Kit (Seegene), Magicplex™ Sepsis ID4 Kit (Seegene) y por secuenciación, confirmando como verdaderos positivos y verdaderos negativos los resultados obtenidos con Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II. Además, se analizaron varias muestras negativas al azar de cada patógeno con Magicplex™ Sepsis ID6 Kit y Magicplex™ Sepsis ID4 Kit. En el segundo estudio, los resultados obtenidos por el kit de Vitassay fueron comparados con los obtenidos en cultivo y los resultados discordantes fueron confirmados por secuenciación.

Tras el análisis con Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II, se puede concluir que representa una herramienta de diagnóstico eficiente para la detección de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Proteus mirabilis*, debido a que los resultados muestran una alta concordancia con los otros ensayos comparadores. Los resultados se muestran en la tabla inferior, y los valores de sensibilidad y especificidad global y para cada patógeno, se calcularon con los datos del estudio (IC=95%).

	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
1	Cultivo	<i>P. aeruginosa</i>	5	412	0	0	1(0.47-1)	1(0.99-1)	1(0.56-1)	1(0.99-1)
		<i>K. pneumoniae</i>	22	395	0	0	1(0.84-1)	1(0.99-1)	1(0.84-1)	1(0.99-1)
		<i>P. mirabilis</i>	20	397	0	0	1(0.83-1)	1(0.99-1)	1(0.83-1)	1(0.99-1)
	MagicPlex™ Sepsis ID4/ID6 Real-Time Detection (Seegene)	<i>P. aeruginosa</i>	5	18	0	0	1(0.47-1)	1(0.81-1)	1(0.47-1)	1(0.81-1)
		<i>K. pneumoniae</i>	22	21	0	0	1(0.84-1)	1(0.83-1)	1(0.84-1)	1(0.83-1)
		<i>P. mirabilis</i>	20	22	0	0	1(0.83-1)	1(0.84-1)	1(0.83-1)	1(0.84-1)
2	Cultivo	<i>P. aeruginosa</i>	132	486	0	2	0.98(0.94-0.99)	1(0.99-1)	1(0.96-1)	0.99(0.98-0.99)
		<i>K. pneumoniae</i>	122	498	0	0	1(0.97-1)	1(0.99-1)	1(0.97-1)	1(0.99-1)
		<i>P. mirabilis</i>	35	585	0	0	1(0.90-1)	1(0.99-1)	1(0.90-1)	1(0.99-1)

TP: Verdadero positivo; TN: Verdadero Negativo; FP: Falso Positivo; FN: Falso Negativo; SE: Sensibilidad; SP: Especificidad; PPV: Valores Predictivos Positivos; NPV: Valores Predictivos Negativos.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de los diferentes patógenos (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de 0.8 CFU por reacción para *P. aeruginosa*, 0.01 CFU para *K. pneumoniae* y de 0.04 CFU para *P. mirabilis* (tasa positividad 95%).

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas con ninguna de las especies:

Pruebas de reactividad cruzada				
<i>Human Adenovirus type 1,2, 3, 4, 5, 8, 15, 31, 40 and 41</i>	-	Dengue virus type 1 strain Hawaii A	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®10145™ +/-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	Dengue virus type 2 strain New Guinea C	-	<i>Rickettsia conorii</i> strain Moroccan -
<i>Aeromonas hydrophila subsp. Hydrophila</i>	-	Dengue virus type 3 strain H87	-	Rift Valley Fever Virus AR21229 -
<i>Anaplasma marginale</i>	-	Dengue virus type 4 strain H241	-	Rift Valley Fever Virus MP12 -
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Dientamoeba fragilis</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Salmonella bongori</i> serovar 66:z41 -
Astrovirus genotype I-VIII	-	<i>Entamoeba dispar</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Salmonella enterica subsp. Enterica</i> serovar <i>enteritidis</i> -
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar <i>gallinarum</i> -
<i>Bartonella henselae</i> strain Houston-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar <i>paratyphi A</i> -
<i>Borrelia azfeli</i> strain P-Ko/1984	-	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> serotype O157:H7	-	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar <i>paratyphi B</i> -
<i>Borrelia bavariensis</i>	-	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar <i>pullorum</i> -
<i>Borrelia bisetti</i>	-	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar <i>typhi</i> -
<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	-	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> serotype O25:H42	-	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> . Serotype 4,5,12:i:1,2 -
<i>Borrelia burgdorferi</i> strain IRS	-	Enterovirus 68 and 71	-	Sapovirus -

<i>Borrelia garinii</i>	-	Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	Enterovirus Echovirus 30	-	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 1	-
<i>Borrelia hermsii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> strain WB clone C6	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Borrelia japonica</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	St Louis Encephalitis Virus	-
<i>Borrelia lusitanae</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i>	-
<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i> J99	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Borrelia spielmanii</i>	-	Human Rotavirus A	-	<i>Theileria annulata</i>	-
<i>Borrelia valaisiana</i>	-	Japanese encephalitis	-	Tick-Borne encephalitis virus strain Neudorfl	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	Japanese encephalitis virus strain Nakayama	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Pneumoniae</i> serotype capsular 2 (CECT141)	- / +	Usutu Virus	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Pneumoniae</i>	- / +	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O1:K1	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NDM-1 resistant) ATCC®BAA-2146™	+ / -	West Nile virus strain Heja	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (OXA-48 resistant) (ATCC® BAA-2524™)	+ / -	West Nile virus strain NY99	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC®10031™	+ / -	West Nile virus strain Ug 37	-
Chikungunya Virus F24	-	<i>Leptospira</i>	-	Yellow Fever Virus strain 17D	-
Chikungunya Virus Martinique	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar ½c	-	Yellow Fever Virus strain French Neurotropic	-
Chikungunya virus S27 Petersfield	-	Norovirus GI	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Chikungunya Virus WHO IS (R91064)	-	Norovirus GII. 4RNA	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> strain 3D7	-	Zika Virus African strain	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC®25933™	+ / -	Zika Virus Asian strain PF13/251013-18	-
<i>Clostridium difficile</i> O:27	-	<i>Proteus mirabilis</i> (CECT 170)	+ / -	Zika Virus French Polynesian strain 11468/16	-

<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	Zika Virus French Polynesian strain 11474/16	-
<i>Coxiella burnetii</i> strain Nine Mile Q	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CECT 108)	+ / -	Zika virus strain FB-GWUH-2016	-

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II para *Pseudomonas aeruginosa* se evaluó frente a DNA extraído de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 10145™) y *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 108) (como modelo), mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II para *Klebsiella pneumoniae* se evaluó frente a DNA extraído de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (ATCC® 10031™), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* Serotype capsular 2 (CECT 141), *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 cepa de referencia (ATCC® BAA-2146™) y *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* productora de carbapenemasa (OXA-48) (ATCC® BAA-2524™) (como modelo), mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II para *Proteus mirabilis* se evaluó frente a DNA extraído de *Proteus mirabilis* (ATCC® 25933™) y *Proteus mirabilis* (CECT 170) (como modelo), mostrando resultados positivos.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II ha sido validado en los siguientes equipos:

- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- DTlite Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Cobas LightCycler 480 System (Roche)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)
- CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR System (Bio-Rad)
- NEOS-96 Real-Time PCR System (Linear)

Limitaciones

- Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.

- Este ensayo ha sido validado con DNA extraído de hemocultivo y muestras de hisopos de pacientes con sospecha de infección bacteriana y/o infección multirresistente o colonización e hisopos para control epidemiológico como hisopado de biopsia, glúteo, úlcera, herida, lengua, líquido articular, oral, capilar, perineal, uretral, absceso, ostomía, nasal, faríngea, rectal, axilar, epitelial inguinal, colostomía y estoma; BAS, BAL y esputo. El uso de otras muestras no se ha establecido y han de ser validadas por el usuario.
- 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.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por el Gram-negative II positive control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre 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 la extracción de DNA); c) Degradación del DNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; e) presencia de inhibidores de la retrotranscripción o de la amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de antibióticos utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); f) mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y/o *P. mirabilis*; g) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante.
- La detección del DNA viral puede no indicar la presencia de virus viables y/o infecciosos o que estos virus sean los agentes causantes de los síntomas clínicos.
- Los resultados negativos no descartan la infección por *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y/o *P. mirabilis*, 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 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 el virus.

- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y/o *P. mirabilis*, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.
- Los valores de fluorescencia pueden variar por múltiples factores como: equipo de PCR, sistema de extracción, tipo de muestra, y su tratamiento previo, entre otros.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Adjunto III. Configuración valores de exposición

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

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
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 Gram-negative Nosocomial Agents II allows the qualitative detection and identification of DNA from *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and/or *Proteus mirabilis* by Real-Time PCR in blood culture and swab samples from patients with suspect of bacterial infection and/or multi-resistant infection or colonization and swabs specimens for epidemiological control by their healthcare professional. This product is intended to aid in the *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and/or *Proteus mirabilis* infections diagnosis, alongside the patient's clinical data, epidemiological risk factors, and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II

4x8-well strip, low profile

7041074

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II

4x8-well strip, high profile

7042074

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S074/ 7042S074	Gram-negative II strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C074	Gram-negative II 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	-	4 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 on 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.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Pseudomonas aeruginosa, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* are gram-negative nosocomial multidrug-resistant pathogens. Their infections mainly affect patients in intensive care units and immunocompromised patients. The adaptation to the hospital environment together with their ability to easily acquire multiple genetic mobile elements harboring resistance and virulence genes are generating multidrug-resistant (MDR) strains of these pathogens, which is causing a major health problem worldwide.

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa is a common, gram-negative bacterium found in the environment. *P. aeruginosa* may be a significant pathogenic factor of severe and often opportunistic infections in humans. Due to a huge arsenal of virulence factors that contribute to pathogenesis and antibiotic resistance determinants included in *P. aeruginosa*'s genome, these bacteria are capable of causing both acute and chronic infections. Some of its virulence factors are the outer membrane which has an asymmetric bilayer that limits the entry of harmful compounds, the biofilms formed by the bacterium which are highly resistant to antibiotics, disinfectants, and host defenses, the type IV pili which are essential structures for the initiation of the infection by mediating motility and adhesion, among others. But the most toxic *P. aeruginosa* virulence factor is the exotoxin A, which one inside is responsible for necrotizing activity at the site of colonization.

It is often isolated from plants, fruits, soil, and water environments, such as rivers, lakes, and swimming pools. It infects airways and urinary tracts, causes blood infections, and is the most common cause of burn injury infections, hot-tub dermatitis, and outer ear infections. Because of its natural and acquired antibiotic resistance, treating *P. aeruginosa* infections can be problematic.

It is a major cause of healthcare-associated infections, being particularly problematic in intensive care units, being the most frequent colonizer of medical devices. Its infections are associated with high morbidity and mortality in many groups, including individuals with

healthcare-associated pneumonia, chronic obstructive pulmonary disease, or cystic fibrosis, in which stage the pathogen is practically impossible to eradicate. It is included in the “critical” category of the WHO priority list of bacterial pathogens for which research and development of new antibiotics are urgently needed.

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae is a gram-negative bacterium which belongs to the family *Enterobacteriaceae*, which includes the well-known genre *Salmonella* and *Escherichia*.

This bacterium can be located on the surface of mucosa in animals, but in humans is mostly found in the gastrointestinal tract, and a few in the nasopharynx, where the bacteria can enter the bloodstream or other tissues, and cause infection. Environmental niches include soil, water, a range of plant species, insects, birds, reptiles, and many different mammals in which this bacterium can be either a commensal organism or a potential pathogen.

Most of *K. pneumoniae* infections are opportunistic health-care-associated infections, sometimes referred to as “classical” *K. pneumoniae* infections. The most common manifestations are pneumonia, urinary tract and wound infections, any of which can progress to bacteraemia. Vulnerable patient groups such as neonates, the elderly, those with inserted medical devices and the immunocompromised, are the most at danger. *K. pneumoniae* can also cause endophthalmitis, pneumonia, necrotizing fasciitis, non-hepatic abscess, meningitis and pyogenic liver abscess in the absence of biliary tract disease, when it is outside the hospital. Some of its virulence factors are acquired siderophores, molecules that can competitively scavenge iron from host proteins or other sources, and surface receptors for internalization, as well as the *ybt* locus, which is found at 6-80% and 78-100% frequency in the worldwide MDR and hypervirulent clones, respectively, a genotoxic polyketide colibactin, which induces DNA damage in eukaryotic cells, among others.

The WHO recognizes extended-spectrum β -lactam producing and carbapenem-resistant *K. pneumoniae* as a critical public health threat. This pathogen, as well as *Pseudomonas aeruginosa*, are members of ESKAPE pathogens, which are described as the leading cause of resistant nosocomial infections. Both have inherent resistance to one or more antibiotics, and individual strains have accumulated resistance to a wide range of drugs.

Proteus mirabilis

Proteus mirabilis, a gram-negative bacterium, which belongs to the class *Gammaproteobacteria*. It has long been recognized as a member of the older *Enterobacteriales*, family *Eterobacteriaceae*, however in recent years it has been suggested that the genre *Proteus* is going to be placed within a new *Morganellaceae* family.

The bacterium can be found in a wide variety of environments, including soil, water sources, and sewage, but it is predominantly a commensal of the gastrointestinal tracts of humans (along with *Klebsiella species*, and *Escherichia coli*) and animals.

Proteus mirabilis is capable of causing a range of human infections, including wounds, and infection in eyes, gastrointestinal and urinary tracts. Urinary tract infections and catheter-associated urinary tract infections are sometimes aggravated by the production of bladder and kidney stones (urolithiasis), as well as persistent renal damage and can lead to bacteremia and sepsis.

The urinary tract infections are more common in people between the ages of 20 and 50 and most common in women. It is a common cause of infection in male infants of all ages, as well as elderly men and women and can lead to serious problems such as recurrent infection, pyelonephritis with sepsis, infant kidney injury, premature delivery, and antibiotic-related complications.

The mobility of *P. mirabilis* is due to its flagella, which not only aids colonization but it has also been linked to its ability to build biofilms and is thought to contribute to resistance to host defenses and certain antibiotics. Also, *P. mirabilis* produces two toxins, hemolysin (HpmA) and *Proteus* toxigenin (Pta), both of which have been linked to tissue destruction and renal transmission, leading to acute pyelonephritis.

Principle of the test

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II is based on real-time amplification of a conserved region of the *oprL* gene for *Pseudomonas aeruginosa*, *Hemolysin* gene for *Klebsiella pneumoniae* and *hns* gene for *Proteus mirabilis*. After DNA extraction, the presence of the viruses is detected by an increase in fluorescence observed during the reaction, following hydrolysis of the fluorescent probe.

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

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II is a ready-to-use test that contains in each well all the necessary reagents in a stabilised format to perform real-time PCR. In addition, an internal control allows the detection of a possible inhibition reaction. The wells contain the multiplex reaction mixture for the detection of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* genes as well as the Internal Control (IC). Following the amplification reaction, *hns* gene is detected in the Cy5 channel, *oprL* gene

in the FAM channel, *Hemolysin* gene is detected in the ROX and the internal control in the HEX, VIC, or JOE channel (depending on the equipment used).

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended.
- 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 color different from whitish) does not alter the test functionality.
- 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.

Procedures

Sample collection, preparation, and DNA extraction

For specimen collection, conservation, and transport, user-validated conditions must be followed. Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II has been tested on blood culture and swab samples such as biopsy, gluteal swabs, ulcer swabs, wound swabs, tongue swab, joint fluid swab, oral swabs, hair swabs, perineal swab, urethral swab, abscess swabs and ostomy swab from patients with suspect of bacterial infection and/or multi-resistant infection or colonization and swabs specimens for epidemiological control such as nasal, pharyngeal, rectal swabs, axillary swabs, inguinal swabs, epithelial swabs, colostomy swabs, one stoma swab, BAS, BAL and sputum specimens. Other sample types should be validated by the user.

Overall, clinical samples should be collected appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type), correctly labelled and promptly processed to ensure the test's quality. Use of fresh samples for the test is also recommended. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. Specimens' transportation should be done either at room temperature for up to 2 hours. For long term transport (more than 2 hours), shipment at -80°C (or lower) is advisable. The samples can be stored frozen at -20°C or bellow (ideally -80°C) for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For more information, refer to the following guidelines:

- IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94)
- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

For nucleic acid isolation from clinical specimens, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The following extraction kits have been validated:

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

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Gram-negative NA II Positive Control (red tube) with 100 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 into the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Polymerase activation	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 (*oprL* gene), Cy5 (*hns* gene), ROX (*Hemolysin* gene) and HEX, JOE, or VIC (Internal Control). Depending on the equipment used select the proper detection channel (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.

Use the positive control amplification curve as a starting point during reaction validation (prior to interpretation of sample results), to ensure that the threshold falls within the exponential phase of the amplification curves and above any background noise signals. The threshold value may vary between different instruments due to different signal intensities. It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end user.

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, and Cy5 channels, which validates the reaction.

Negative control

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

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

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

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

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II

<i>P. aeruginosa</i> (FAM) ³	<i>K. pneumoniae</i> (ROX) ⁴	<i>P. mirabilis</i> (Cy5) ⁴	Internal Control (HEX)	Interpretation	
+	+	-	+/- ¹	Valid	DNA of <i>P. aeruginosa</i> y <i>K. pneumoniae</i> detected
+	-	-	+/- ¹	Valid	DNA of <i>P. aeruginosa</i> detected
-	+	-	+/- ¹	Valid	DNA of <i>K. pneumoniae</i> detected
-	-	+	+/- ¹	Valid	DNA of <i>P. mirabilis</i> detected
+	-	+	+/- ¹	Valid	DNA of <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. mirabilis</i> detected
+	+	+	+/- ¹	Valid	DNA of three pathogens detected
-	+	+	+/- ¹	Valid	DNA of <i>K. pneumoniae</i> y <i>P. mirabilis</i> detected
-	-	-	+ ²	Valid	Targets not detected
-	-	-	- ²	Invalid	Test failure

(+) Positive: Amplification signal

(-) Negative: No amplification signal

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

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

³ For *oprL* gene from *P. aureoginosa* a cut-off of Ct 37 has been set. Therefore:

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤37)

(-) Negative: No amplification signal (Ct >37 or no signal)

⁴ For *Hemolysin* gene from *K. pneumoniae* y *hns* gene from *P. mirabilis* a cut-off of Ct 35 has been set. Therefore:

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤35)

(-) Negative: No amplification signal (Ct >35 or no signal)

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 RT-qPCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate, depending on the available material (repeat RT-qPCR with the same isolated DNA sample, or re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, obtain a new specimen and retest).

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

Quality Control

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

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II was evaluated in two comparative-retrospective studies, in which a total of 417 blood culture samples and 620 swab samples were used in first and second study, respectively. The samples were obtained every 15 days between March 2021 and March 2022 and from March to May 2021, respectively. Sample extraction in both studies was performed with the MagDea DX SV kit using the automatic MagLEAD® 12 gC instrument (Precision System Science Co.) and run on DTprime Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology).

In the first study, the results obtained with Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II were compared with the results obtained in culture. Discordant results were analysed with Magicplex™ Sepsis ID6 Kit (Seegene), Magicplex™ Sepsis ID4 Kit (Seegene) and by sequencing, confirming as true positive and true negative the results obtained with Vitassay assay. In addition, several random negative samples of each pathogen were also tested with Magicplex™ Sepsis ID6 Kit (Seegene) and Magicplex™ Sepsis ID4 Kit (Seegene). In the second study, the results obtained with Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II were compared with those obtained in culture, and discordant results were confirmed by sequencing.

After Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II analysis, it can be concluded that it represents an efficient diagnostic tool for the detection of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and/or *Proteus mirabilis*, as the results show high agreement with comparator assays. The results are shown in the table below, and the

global sensitivity and specificity values, and the values for each pathogen, were calculated from the study data (CI=95%).

Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV	
1	Culture	<i>P. aeruginosa</i>	5	412	0	0	1(0.47-1)	1(0.99-1)	1(0.56-1)	1(0.99-1)
		<i>K. pneumoniae</i>	22	395	0	0	1(0.84-1)	1(0.99-1)	1(0.84-1)	1(0.99-1)
		<i>P. mirabilis</i>	20	397	0	0	1(0.83-1)	1(0.99-1)	1(0.83-1)	1(0.99-1)
	MagicPlex™ Sepsis ID4/ID6 Real-Time Detection (Seegene)	<i>P. aeruginosa</i>	5	18	0	0	1(0.47-1)	1(0.81-1)	1(0.47-1)	1(0.81-1)
		<i>K. pneumoniae</i>	22	21	0	0	1(0.84-1)	1(0.83-1)	1(0.84-1)	1(0.83-1)
		<i>P. mirabilis</i>	20	22	0	0	1(0.83-1)	1(0.84-1)	1(0.83-1)	1(0.84-1)
2	Culture	<i>P. aeruginosa</i>	132	486	0	2	0.98(0.94-0.99)	1(0.99-1)	1(0.96-1)	0.99(0.98-0.99)
		<i>K. pneumoniae</i>	122	498	0	0	1(0.97-1)	1(0.99-1)	1(0.97-1)	1(0.99-1)
		<i>P. mirabilis</i>	35	585	0	0	1(0.90-1)	1(0.99-1)	1(0.90-1)	1(0.99-1)

TP: True Positive; TN: True Negative; FP: False Positive; FN: False Negative; SE: Sensitivity; SP: Specificity; PPV: Positive Predictive Values; NPV: Negative Predictive Values.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by the analysis of 10-fold dilution series of standards from the pathogens ranging from 10^7 to 10^1 copies/reaction. This assay has a detection limit of 0.8 CFU per reaction for *P. aeruginosa*, 0.01 CFU for *K. pneumoniae* and 0.04 CFU for *P. mirabilis* (positive rate of 95%).

Analytical specificity

The analytical specificity for *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* detection was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed between any of the species.

Cross-reactivity testing

<i>Human Adenovirus type 1,2, 3, 4, 5, 8, 15, 31, 40 and 41</i>	-	Dengue virus type 1 strain Hawaii A	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®10145™	+ / -
<i>Aeromonas caviae</i>	-	Dengue virus type 2 strain New Guinea C	-	<i>Rickettsia conorii</i> strain Moroccan	-
<i>Aeromonas hydrophila subsp. Hydrophila</i>	-	Dengue virus type 3 strain H87	-	Rift Valley Fever Virus AR21229	-
<i>Anaplasma marginale</i>	-	Dengue virus type 4 strain H241	-	Rift Valley Fever Virus MP12	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Dientamoeba fragilis</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Salmonella bongori</i> serovar 66:z41	-
Astrovirus genotype I-VIII	-	<i>Entamoeba dispar</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Salmonella enterica subsp. Enterica</i> serovar enteritidis	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar gallinarum	-
<i>Bartonella henselae</i> strain Houston-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar paratyphi A	-
<i>Borrelia azfeli</i> strain P-Ko/1984	-	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> serotype O157:H7	-	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar paratyphi B	-
<i>Borrelia bavariensis</i>	-	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar pullorum	-
<i>Borrelia bisetti</i>	-	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar typhi	-
<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	-	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> serotype O25:H42	-	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar typhimurium. Serotype 4,5,12:i:1,2	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> strain IRS	-	Enterovirus 68 and 71	-	Sapovirus	-
<i>Borrelia garinii</i>	-	Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	Enterovirus Echovirus 30	-	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 1	-
<i>Borrelia hermsii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> strain WB clone C6	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Borrelia japonica</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	St Louis Encephalitis Virus	-
<i>Borrelia lusitanae</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus</i>	-
<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i> J99	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Borrelia spielmanii</i>	-	Human Rotavirus A	-	<i>Theileria annulata</i>	-
<i>Borrelia valaisiana</i>	-	Japanese encephalitis	-	Tick-Borne encephalitis virus strain Neudorfl	-

<i>Campylobacter coli</i>	-	Japanese encephalitis virus strain Nakayama	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Pneumoniae</i> serotype capsular 2 (CECT141)	- / +	Usutu Virus	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Pneumoniae</i>	- / +	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O1:K1	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NDM-1 resistant) ATCC®BAA-2146™	+ / -	West Nile virus strain Heja	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (OXA-48 resistant) (ATCC® BAA-2524™)	+ / -	West Nile virus strain NY99	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC®10031™	+ / -	West Nile virus strain Ug 37	-
Chikungunya Virus F24	-	<i>Leptospira</i>	-	Yellow Fever Virus strain 17D	-
Chikungunya Virus Martinique	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2c	-	Yellow Fever Virus strain French Neurotropic	-
Chikungunya virus S27 Petersfield	-	Norovirus GI	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Chikungunya Virus WHO IS (R91064)	-	Norovirus GII. 4RNA	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> strain 3D7	-	Zika Virus African strain	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC®25933™	+ / -	Zika Virus Asian strain PF13/251013-18	-
<i>Clostridium difficile</i> O:27	-	<i>Proteus mirabilis</i> (CECT 170)	+ / -	Zika Virus French Polynesian strain 11468/16	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	Zika Virus French Polynesian strain 11474/16	-
<i>Coxiella burnetii</i> strain Nine Mile Q	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CECT 108)	+ / -	Zika virus strain FB-GWUH-2016	-

Analytical reactivity

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II reactivity for *Pseudomonas aeruginosa* was tested against DNA extracted from *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 10145™) and *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 108) (as templates), showing positive results.

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II reactivity for *Klebsiella pneumoniae* was assessed against DNA extracted from *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (ATCC® 10031™), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* Serotype capsular 2 (CECT 141), *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 reference strain (ATCC® BAA-2146™) and *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* carbapenemase producer (OXA-48) (ATCC® BAA-2524™) (as templates), showing positive results.

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II reactivity for *Proteus mirabilis* was assessed against DNA extracted from *Proteus mirabilis* (ATCC® 25933™) and *Proteus mirabilis* (CECT 170) (as templates), showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents II has been validated on the following equipment:

- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- DTlite Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)
- Cobas LightCycler 480 System (Roche)
- CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR System (Bio-Rad)
- NEOS-96 Real-Time PCR System (Linear)

Limitations

- All obtained results should be interpreted by a specialist in conjunction with available clinical information and laboratory findings.
- This assay has been validated with DNA extracted from blood culture and samples from patients with suspect of bacterial infection and/or multi-resistant infection or colonization and swabs for epidemiological control such as biopsy, gluteal, ulcer, wound, tongue, joint fluid, oral, hair, perineal, urethral, abscess, ostomy, nasal, pharyngeal, rectal, axillary, inguinal epithelial, colostomy and stoma swabs; BAS, BAL and sputum. The use of other samples has not been established and must be validated by the user.
- The correct test performance depends on the sample's quality; DNA should be properly extracted from clinical samples.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This test is a qualitative assay.
- Low copy numbers of the target DNA template may be detected below the detection limit, but results may not be reproducible.

- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination, either by Gram-negative II positive control during reconstitution, by samples containing high concentrations of target DNA template or by PCR products from previous reactions.
- Detection can be affected by several factors and their combinations that can lead to false negative results, including: (a) inadequate specimen sampling, shipping, storage and handling; (b) procedural errors (including DNA extraction); (c) DNA degradation during specimen shipping, storage and/or preparation; (d) pathogen load is below the detection limit for the assay; (e) presence of retrotranscription and/or real-time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of antibiotics used to prevent infection or during treatment of infection was not performed); (f) mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect the detection of novel or unknown variants of *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and/or *P. mirabilis*; (g) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures.
- Detection of viral DNA may not indicate the presence of viable and/or infectious virus or that these viruses are the causative agents for clinical symptoms.
- Negative results do not preclude *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and/or *P. mirabilis* infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Optimal specimen types 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 virus.
- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and/or *P. mirabilis* infection, and other gastrointestinal 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.

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 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7900 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 ⁽⁴⁾
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 ⁽⁴⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System ^{(3) (4)}	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Azure Biosystems	Agilent Technologies
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96	qTOWER ⁽⁶⁾
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	BIOER
Roche	QuantGene 9600
LightCycler®480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	Bio-Rad
LightCycler®96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™ Real-Time PCR
	iCycler iQ™5 Real-Time PCR
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Special Formats ⁽⁷⁾	DNA-Technology
Bio Molecular Systems	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Mic Real Time PCR Cyclers	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen	Qiagen
Rotor-Gene® Q	QIAquant 96

- (1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.
- (2) Select Ramp Speed "Standard".
- (3) No ROX caption.
- (4) No Cy5 caption.
- (5) Only FAM and HEX caption.
- (6) Specific compensation color is required.
- (7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.
- (8) See Attached III to configure exposure settings.

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

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

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

Attached III. Optical measurement exposure setting

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

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
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

*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

- Armbruster, C. E., Mobley, H., & Pearson, M. M. (2018). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus*, 8(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017.
- Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019). *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clinical microbiology reviews*, 32(4), e00002-19.
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3128.
- Mielko, K. A., Jabłoński, S. J., Milczewska, J., Sands, D., Łukaszewicz, M., & Młynarz, P. (2019). Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World journal of microbiology & biotechnology*, 35(11), 178.
- Jamil, R. T., Foris, L. A., & Snowden, J. (2022). *Proteus Mirabilis* Infections. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Wyres, K. L., Lam, M., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature reviews. Microbiology*, 18(6), 344–359
- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of environmental research and public health*, 17(17), 6278.
- Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2018). *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current opinion in microbiology*, 45, 131–139.
- Yuan, F., Huang, Z., Yang, T., Wang, G., Li, P., Yang, B., & Li, J. (2021). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* in Catheter-Associated Urinary Tract Infections. *Urologia internationalis*, 105(5-6), 354–361.

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
			Número de referencia Catalogue number



VA Vitassay

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

www.vitassay.com