



Real-Time PCR Kits

Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y la identificación de los principales genes de resistencia a β -lactamasas: clúster $bla_{CTX-M-A}$ ($bla_{CTX-M-1}$ y $bla_{CTX-M-9}$), clúster $bla_{CTX-M-B}$ ($bla_{CTX-M-2}$, $bla_{CTX-M-8}$ y $bla_{CTX-M-25}$), bla_{TEM} , bla_{SHV} y el gen codificante de resistencia a colistina, *mcr-1*, en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and identification of the main β -lactamase-resistance genes: $bla_{CTX-M-A}$ cluster ($bla_{CTX-M-1}$ and $bla_{CTX-M-9}$), $bla_{CTX-M-B}$ cluster ($bla_{CTX-M-2}$, $bla_{CTX-M-8}$ and $bla_{CTX-M-25}$), bla_{TEM} , bla_{SHV} and the colistin-resistance encoding gene *mcr-1*, in clinical samples.





Uso previsto

Vitassay qPCR β -lactamasas + Colistin resistance permite la detección cualitativa y la identificación de los principales genes de resistencia a β -lactamasas: clúster bla_{CTX-M-A} (bla_{CTX-M-1} y bla_{CTX-M-9}), clúster bla_{CTX-M-B} (bla_{CTX-M-2}, bla_{CTX-M-8} y bla_{CTX-M-25}), bla_{TEM}, bla_{SHV} y el gen codificante de resistencia a colistina, *mcr-1*, en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico y la vigilancia de infecciones causadas por resistencia a antibióticos y colonización, junto con los datos clínicos del paciente, factores de riesgo epidemiológico y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

Referencias

Vitassay qPCR β -lactamasas + Colistin resistance 4x8-well strip, low profile	7041069
Vitassay qPCR β -lactamasas + Colistin resistance 4x8-well strip, high profile	7042069

Reactivos suministrados

Para las referencias 7041069 y 7042069:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S069/ 7042S069	β -lactamasas + Colistin resistance strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C069	β -lactamasas + Colistin resistance Positive Control	rojo	1 vial
7002A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7007B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7008N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Material y equipamiento necesario, 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

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.

Resumen

Los β -lactámicos son la familia de fármacos antibióticos más utilizada. Desde el descubrimiento de la penicilina en 1929 y su posterior introducción en la práctica clínica en los años 40, los β -lactámicos se han ido desarrollando para ser más potentes, ampliando su espectro de actividad y mejorando el perfil farmacocinético y de seguridad. Esto ha dado lugar a miles de nuevos derivados de la penicilina, incluyendo cefalosporinas, cefamicinas, monobactámicos y carbapenémicos.

La resistencia a los β -lactámicos ha surgido debido al uso prolongado de estos compuestos, que puede ser causada por diferentes mecanismos, como la modificación de las PBP, las modificaciones celulares para la entrada de los β -lactámicos y la producción de enzimas degradativas, entre otros. La resistencia mediada por enzimas está causada por la expresión de β -lactamasas tanto en bacterias Grampositivas como Gramnegativas. Estas enzimas pueden contrarrestar la acción de estos antibióticos catalizando la hidrólisis del enlace amida del anillo β -lactámico, haciendo que el antibiótico sea ineficaz.

Se han descrito cuatro clases de β -lactamasas (A-D) y dos mecanismos de acción. Por un lado, las enzimas de clase A, C y D contienen un residuo reactivo de serina en su sitio activo (conocidas como β -lactamasas de serina; SBL). Por otro lado, las β -lactamasas de clase B contienen un átomo divalente de zinc con acción catalítica (metallobetá-lactamasas; MBLs). La presencia de estas enzimas viene conferida por la expresión de diferentes genes, que difieren entre las familias. Así, las de clase A están codificadas por los genes TEM, SHV, CTX-M y KPC; las de clase B por NDM y VIM; las de clase C por CMY y ADC; y las de clase D por OXA.

Es relevante la propagación de las familias TEM, SHV y CTX-M, también conocidas como ESBL, a través de elementos genéticos móviles entre bacterias Gram negativas, especialmente *Enterobacteriaceae*, siendo una amenaza en el contexto clínico. En Europa se ha observado una prevalencia de ESBL entre pacientes con infecciones por *E. coli* de entre el 1,3 y casi el 5%, y del 18% de las muestras positivas a *K. pneumoniae*. Es especialmente preocupante la prevalencia de ESBL encontrada en algunos hospitales, que se ha reportado hasta un 38% en *E. coli* o un 34% en *K. pneumoniae* de pacientes analizados en África.

La colistina es un antibiótico utilizado como última fuente de tratamiento para las bacterias multirresistentes. Sin embargo, en 2015 se describió un plásmido que codifica *Mcr-1* (gen de resistencia a la colistina) en *Enterobacteriaceae*. Esta fue la primera vez que se encontró esta resistencia en un elemento genético móvil, ya que hasta entonces solo se observaba debido a mutaciones cromosómicas. MCR-1 es una enzima compuesta por hélices transmembrana hidrofóbicas y una parte soluble en el periplasma, que modifica la estructura de los lipopolisacáridos de la membrana externa bacteriana y cambia la permeabilidad.

En los últimos años, se han descrito otros 8 genes *Mcr* (*Mcr2-Mcr9*) y se han localizado en diferentes regiones del mundo. Se ha observado que la mayoría de los aislados mcr-positivos están restringidos a varias especies de *Enterobacteriaceae*, particularmente *Escherichia coli*, *S. enterica*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.*

La detección de genes de resistencia a los medicamentos mediante pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) es una manera rápida de proporcionar información epidemiológica valiosa, orientar hacia un tratamiento antimicrobiano racional y ayudar en el control y la prevención de la enfermedad.

Principio de la prueba

Vitassay qPCR β -lactamasas + Colistin resistance se basa en la amplificación a tiempo real de regiones conservadas de los genes de resistencia a β -lactamasas: clúster *bla*_{CTX-M-A} (*bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-9}), clúster *bla*_{CTX-M-B} (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8} y *bla*_{CTX-M-25}), *bla*_{TEM}, y *bla*_{SHV}, así como una región conservada del gen codificante de la resistencia a la colistina *mcr-1*. Tras la extracción de los ácidos nucleicos, la presencia de los patógenos 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 β -lactamasas + Colistin resistance, 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. Los pocillos contienen la mezcla de reacción multiplex para la detección de genes de resistencia a β -lactamasas CTX-M, β -lactamasas TEM, β -lactamasas SHV y el gen de resistencia a colicistina *mcr-1*. Los canales de detección de las secuencias diana se describen a continuación:

Diana	Canal detección
Gen <i>bla</i> _{CTX-M}	FAM
Gen <i>bla</i> _{SHV}	ROX
Gen <i>bla</i> _{TEM}	HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado)
Gen <i>mcr-1</i>	Cy5

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, transporte y conservación de muestras

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance ha sido testado en hemocultivos y muestras de hisopo como biopsia, hisopos de glúteos, hisopos de úlceras, hisopos de heridas, hisopos conjuntivos, hisopos de lengua, hisopos de líquido articular, hisopos orales, hisopos de cabello, hisopos perineales, hisopos uretrales, hisopos de abscesos, hisopos nasales, faríngeos, rectales, hisopos axiales, hisopos inguinales, hisopos epiteliales, hisopos de colostomía, hisopos de estoma, BAS, BAL y muestras de esputo. El medio de transporte utilizado para la recogida de las muestras de hisopos fue AMIES (DeltaLab). Otros tipos de muestras deben ser validados por el usuario.

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. Los especímenes pueden transportarse a temperatura ambiente durante un máximo de 2 horas. Para un transporte de mayor duración (más de 2 horas), se recomienda el envío a -20°C o menos. Las muestras pueden conservarse congeladas a -20°C o menos (a -80°C idealmente) para un almacenamiento de tiempo prolongado. 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:

- Miller JM, et al. (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. Clin Infect Dis. Aug 31;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).

Extracción de DNA

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 kits de extracción han sido validados:

- MagDEA Dx SV Kit, utilizando el instrumento magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del β -lactamases + Colistin resistance Positive Control (tubo rojo) con 100 μ L 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 μ L de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 μ L 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
Desnaturalización inicial	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 (el gen *bla_{CTX-M}*), ROX (el gen *bla_{SHV}*), HEX, JOE o VIC (gen *bla_{TEM}*) y Cy5 (el gen *mcr-1*). 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.

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 ($Ct \leq 40$) en los canales FAM, ROX, HEX 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, HEX 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.

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

β-lactamases + Colistin resistance				Interpretación
Gen de Resistencia CTX (<i>Bla_{CTX-M-A}</i> and <i>Bla_{CTX-M-B}</i>) (FAM)¹	Gen de Resistencia <i>mcr-1</i> (Cy5)²	Gen de Resistencia SHV (<i>Bla_{SHV}</i>) (ROX)³	Gen de Resistencia TEM (<i>Bla_{TEM}</i>) (HEX)⁴	
+	-	-	-	DNA del gen de resistencia CTX Detectado
+	+	-	-	DNA del gen de resistencia CTX y <i>mcr-1</i> Detectado
+	+	+	-	DNA del gen de resistencia CTX, <i>mcr-1</i> y SHV Detectado
+	+	+	+	DNA del gen de resistencia CTX, <i>mcr-1</i> , SHV y TEM Detectado
+	-	+	-	DNA del gen de resistencia CTX y SHV Detectado
+	-	-	+	DNA del gen de resistencia CTX y TEM Detectado
-	+	-	-	DNA del gen de resistencia <i>mcr-1</i> Detectado
-	+	+	-	DNA del gen de resistencia <i>mcr-1</i> y SHV Detectado
-	+	-	+	DNA del gen de resistencia <i>mcr-1</i> y TEM Detectado
-	+	+	+	DNA del gen de resistencia <i>mcr-1</i> , SHV y TEM Detectado
-	-	+	-	DNA del gen de resistencia SHV Detectado
-	-	+	+	DNA del gen de resistencia SHV y TEM Detectado
+	-	+	+	DNA del gen de resistencia CTX, SHV y TEM Detectado
-	-	-	+	DNA del gen de resistencia TEM Detectado
-	-	-	-	DNA molde diana no Detectado

¹ Para el gen de resistencia *CTX* se ha establecido un Ct de corte de 37. Así:

- (+) **Positivo:** Señal de amplificación (Ct ≤37)
- (-) **Negativo:** No hay señal de amplificación (Ct >37 o no hay señal)

² Para el gen de resistencia *mcr-1* se ha establecido un Ct de corte de 40. Así:

- (+) **Positivo:** Señal de amplificación (Ct ≤40)
- (-) **Negativo:** No hay señal de amplificación (Ct >40 o no hay señal)

³ Para el gen de resistencia *SHV* se ha establecido un Ct de corte de 35. Así:

- (+) **Positivo:** Señal de amplificación (Ct ≤35)
- (-) **Negativo:** No hay señal de amplificación (Ct >35 o no hay señal)

⁴ Para el gen de resistencia *TEM* se ha establecido un Ct de corte de 30. Así:

- (+) **Positivo:** Señal de amplificación (Ct ≤30)
- (-) **Negativo:** No hay señal de amplificación (Ct >30 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 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 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

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

Para evaluar la sensibilidad y especificidad clínica de Vitassay qPCR β-lactamases + Colistin resistance, se utilizaron restos de hemocultivos y muestras de hisopos de diferente origen. Estas muestras, fueron recogidas de pacientes con sospecha de proceso infeccioso y/o infección o colonización multirresistente, así como de pacientes de la UCI (control epidemiológico).

Estas muestras se analizaron primero con el método rutinario (cultivo y espectrometría de masas). Además, se caracterizaron con otros dos kits moleculares comerciales. Se evaluaron un total de 1063 especímenes clínicos, 645 hisopos y 418 muestras de hemocultivo. Tras la comparación y el análisis de las discrepancias, 114 muestras se consideraron positivas para *bla_{CTX}*, 235 fueron positivas para *bla_{TEM}* y 152 fueron positivas para *bla_{SHV}*. Todas las muestras se consideraron verdaderos positivos y no se encontraron discrepancias.

En general, la sensibilidad y la especificidad clínica de *bla_{CTX}* fueron 1 (0,97-1) y 1 (0,99-1), de *bla_{TEM}* fueron 1 (0,99-1) y 1 (0,99-1), y de *bla_{SHV}* fueron 1 (0,99-1). 1) y 1 (0,99-1), respectivamente.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de los diferentes patógenos (10⁷-10¹ copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de 0.02 UFC por reacción para el gen de resistencia a β-lactamasas *CTX* (*Bla_{CTX-M1}*, *Bla_{CTX-M9}*, (*Bla_{CTX-M-A}*) y *Bla_{CTX-M2}*, *Bla_{CTX-M8}*, *Bla_{CTX-M25}* (*Bla_{CTX-M-B}*)), 0.08 UFC por reacción para el gen de resistencia a β-lactamasa tipo *TEM* (*Bla_{TEM}* gen), 8.75 copias por reacción para el gen de resistencia a β-lactamasas tipo *SHV* (*Bla_{SHV}* gen) y 0.02 UFC por reacción para el gen de resistencia a colistina *mcr-1* (tasa de positividad 95%).

Especificidad analítica

La especificidad analítica de Vitassay qPCR β-lactamases + Colistin resistance fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas con ninguna de las especies, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo:

Pruebas de reactividad cruzada					
<i>Usutu Virus</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>enteritidis</i>	-	Japanese encephalitis	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> . Serotipo 4,5,12:i:1,2	-	Japanese encephalitis virus cepa Nakayama	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>gallinarum</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> cepa 3D7	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>pullorum</i>	-	Dengue virus tipo 3 cepa H87	-
Astrovirus genotipo I-VIII	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>paratyphi A</i>	-	Dengue virus tipo 4 cepa H241	-
Sapovirus	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>paratyphi B</i>	-	St Louis Encephalitis Virus	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhi</i>	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Adenovirus humano tipo 1, 3, 4, 5, 8, 13, 31, 40 y 41	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	West Nile virus cepa NY99	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Shigella dysenteriae</i> serotipo 1	-	West Nile virus cepa Heja	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-	West Nile virus cepa Ug 37	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Yellow Fever Virus cepa 17D	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotipo O1:K1	-	Yellow Fever Virus cepa French Neurotropic	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-	Zika virus cepa FB-GWUH-2016	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-	Zika Virus cepa africana	-
<i>Clostridium difficile</i> O:27	-	<i>Anaplasma marginale</i>	-	Zika Virus cepa asiática PF13/251013-18	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Bartonella henselae</i> cepa Houston-1	-	Zika Virus cepa French Polynesian 11474/16	-
Coxsackievirus A24, A9 y B3	-	<i>Borrelia hermsii</i>	-	Zika Virus cepa French Polynesian 11468/16	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Borrelia lusitanae</i>	-	<i>Citrobacter brakii</i> carbapenemasa positivo (VIM-1)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Borrelia valaisiana</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i> ESBL/Carbapenemasa positivo (TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL), NDM-1)	+/-
Echovirus 30	-	<i>Borrelia azfeli</i> cepa P-Ko/1984	-	<i>Enterococcus avium</i> resistente a vancomicina A	-
<i>Entamoeba dispar</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Borrelia bavariensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> resistente a vancomicina A	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Borrelia bisetti</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> resistente a vancomicina B (equivalente a ATCC51299)	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Borrelia burgdorferi</i> cepa IRS	-	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina A LMG16165	-
Enterovirus 68 y 71	-	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto cepa B31	-	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina A IOWA1	-
<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica serotipo O157:H7	-	<i>Borrelia garinii</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> S + <i>Enterococcus gallinarum</i> resistente a vancomicina C (MI12043391 + LMG16289)	-

<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva	-	<i>Borrelia japonica</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> resistente a vancomicina B y C ENT20120142	-
<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena	-	<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	<i>Escherichia coli</i> carbapenemasa positivo (OXA-244)	-
<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica serotipo O25:H42	-	<i>Borrelia spielmanii</i>	-	<i>Escherichia coli</i> carbapenemasa positivo (TEM-1 (non ESBL), IMP-1)	+/-
<i>Giardia intestinalis</i> cepa WB clon C6	-	<i>Coxiella burnetii</i> cepa Nine Mile Q	-	<i>Helicobacter pylori</i> resistente a claritromicina A2146G	-
<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Leptospira</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i> resistente a claritromicina A2147G	-
<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	<i>Rickettsia conorii</i> cepa Moroccan	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasa positivo (SHV-1 (non ESBL), KPC-3, OXA-48)	+/-
<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Theileria annulata</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL/carbapenemasa positivo (TEM-1 (non ESBL), SHV-1 (non ESBL), CTX-M-2 (ESBL), KPC-2)	+/-
<i>Helicobacter pylori</i> J99	-	Tick-Borne encephalitis virus cepa Neudorfl	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (TEM, SHV, CTX-M-1, NDM)	+/-
<i>Rotavirus A</i> humano	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina N315	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Chikungunya virus S27 Petersfield	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina ST398	-
<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2c	-	Chikungunya Virus Martinique	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina mecC	-
Norovirus GII (II.4 RNA)	-	Chikungunya Virus F24	-	<i>Escherichia coli</i> (Codifica CTX-M-15 ESBL. Plásmido Pek499)	+/-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	Chikungunya Virus WHO IS (R91064)	-	<i>Escherichia coli</i> (resistente a colistina. MCR-1 positivo)	+/-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Dengue virus tipo 1 cepa Hawaii A	-	Rift Valley Fever Virus AR21229	-
<i>Salmonella bongori</i> serovar 66:z41	-	Dengue virus tipo 2 cepa New Guinea C	-	Rift Valley Fever Virus MP12	-

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance para el gen de resistencia a β -lactamasa CTX-M se evaluó frente a *Enterobacter cloacae* ESBL/Carbapenemasa positiva (SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL), OXA-48), *Enterobacter cloacae* ESBL/ Carbapenemasa positiva (TEM-1 (no ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL), NDM-1), *Klebsiella pneumoniae* ESBL/ Carbapenemasa positiva (TEM-1 (no ESBL), SHV-1 (no ESBL), CTX-M-2 (ESBL), KPC-2) *Escherichia coli* (codifica CTX-M-15 ESBL. Plásmido pEK499) (NCTC 13400) y *Klebsiella pneumoniae* (TEM, SHV, CTX-M-1, NDM), mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance para el gen de resistencia a β -lactamasa TEM se evaluó frente a: *Enterobacter cloacae* ESBL/ Carbapenemasa positiva (TEM-1 (no ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL), NDM-1), *Escherichia coli* carbapenemase positiva (TEM-1 (no ESBL), IMP-1), *Klebsiella pneumoniae* ESBL/ Carbapenemasa positiva (TEM-1 (no ESBL), SHV-1 (no ESBL), CTX-M-2 (ESBL), KPC-2), *Escherichia coli* (codifica CTX-M-15 ESBL. Plásmido pEK499) (NCTC 13400), mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance para la detección del gen de resistencia a β -lactamasa SHV se evaluó frente a *Enterobacter cloacae* ESBL/ Carbapenemasa positiva (SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL), OXA-48), *Enterobacter cloacae* ESBL/ Carbapenemasa positiva (TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL), NDM-1), *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasa positiva (SHV-1 (no ESBL), KPC-3, OXA-48), *Klebsiella pneumoniae* ESBL/ Carbapenemasa positiva (TEM-1 (no ESBL), SHV-1 (no ESBL), CTX-M-2 (ESBL), KPC-2), mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance para el gen de resistencia a colistina se evaluó frente a *Escherichia coli* colistina resistente (MCR-1 positivo) (NCTC 13846), mostrando un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)^I
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^{II}
- NEOS-96 Real-Time PCR System (Linear)

^I: 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).

^{II} : Para el equipo Rotor-Gene® Q el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos del equipo.

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 hemocultivos y muestras de hisopos como biopsia, hisopos de glúteos, hisopos de úlceras, hisopos de heridas, hisopos conjuntivos, hisopos de lengua, hisopos de líquido articular, hisopos orales, hisopos de cabello, hisopos perineales, hisopos uretrales, hisopos de abscesos, hisopos nasales, faríngeos, rectales, hisopos axilares, hisopos inguinales, hisopos epiteliales, hisopos de colostomía, hisopos de estoma, BAS, BAL y muestras de esputo. El 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.
- 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 β -lactamases + Colistin resistance positive control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por 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) mutaciones potenciales de las secuencias diana identificadas por este test que pueden provocar que el DNA sea indetectable; e) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; f) 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 antibióticos utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); g) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con genes de resistencias a β -lactamasas (*CTX-M*, *TEM*, *SHV*) y colistina (*mcr-1*), y se han descartado otras resistencias a antibióticos, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.
- La detección del DNA bacteriano puede no indicar la presencia de bacterias viables y/o infecciosas o que estas bacterias sean los agentes causantes de los síntomas clínicos.
- Resultados negativos no impiden la infección bacteriana por genes de resistencia a β -lactamasas (*CTX-M*, *TEM*, *SHV*) y colistina (*mcr-1*) 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 las bacterias.

- 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.

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

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla orientativa separados por tipo de tubo. Consulte la tabla y verifique el equipo y sus especificaciones antes de ejecutar el ensayo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil	Termocicladores con bloque de alto perfil
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Agilent Technologies
Applied Biosystems	Mx3000P™ Real Time PCR System
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	Mx3005P™ Real Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	Applied Biosystems
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7300 Real-Time PCR System ^{(1) (4)}
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System ^{(3) (4)}	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
Azure Cielo 6	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96 Fast	qTOWER ⁽⁶⁾
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System	BIOER
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	QuantGene 9600
CFX Opus 96	Bio-Rad
Roche	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR System
LightCycler®480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	CFX96™ Deep Well IDV Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Formatos especiales ⁽⁷⁾	DNA-Technology
Bio Molecular Systems	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Mic Real Time PCR Cyclor	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep realplex
Qiagen	Qiagen
Rotor-Gene® Q	QIAquant 96 ⁽⁶⁾

(1) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos de PCR a tiempo real.

(2) Seleccionar Ramp Speed "Standard" en el menu Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

(3) No lectura en canal Cy5.

(4) No lectura en canal ROX.

(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®, o Rotor-Gene® Q.

(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	Durante los primeros ciclos de un análisis algunos pocillos pueden presentar valores de RFU anormales y mostrar una línea ascendente no sigmoidea. Para corregir este efecto, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction en el menú Configuración para la configuración de la línea base.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Durante los primeros ciclos de un análisis algunos pocillos pueden presentar valores de RFU anormales y mostrar una línea ascendente no sigmoidea. Para corregir este efecto, seleccione los valores de ciclo Inicio y ciclo Final para que la línea de base finalice antes de la detección de una fluorescencia significativa.
	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	
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™ Mx3005P™	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)), Volumen (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". El rango de muestra objetivo de fluorescencia 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 de los 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
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

* 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 β -lactamases + Colistin resistance allows the qualitative detection and identification of the main β -lactamases-resistant genes: clúster bla_{CTX-M-A} (bla_{CTX-M-1} y bla_{CTX-M-9}), clúster bla_{CTX-M-B} (bla_{CTX-M-2}, bla_{CTX-M-8} y bla_{CTX-M-25}), bla_{TEM}, bla_{SHV} and the colistin resistance coding gene, *mcr-1*, in clinical samples. This product is intended to facilitate the diagnosis and surveillance of infections caused by antibiotic-resistance and colonization, together with the patient's clinical data, epidemiological risk factors, and the results of other laboratory tests.

References

Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance 4x8-well strip, low profile	7041069
Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance 4x8-well strip, high profile	7042069

Reagents provided

In references 7041069 and 7042069:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S069/ 7042S069	β -lactamases + Colistin resistance strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C069	β -lactamases + Colistin resistance Positive Control	red	1 vial
7002A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7007B	Resuspension buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7008N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4 x 8-cap strip

Material and equipment required, not provided

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

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.

Summary

The β -lactams are the most used antibiotic drug family. Since the discovery of Penicillin in 1929 and its posterior introduction in the clinical practice in the 40s, β -lactams have been developing to become more potent, broadening their activity spectrum and improve the pharmacokinetic and safety profile. This has led to thousands of new penicillin derivatives, including cephalosporins, cephamycins, monobactams, and carbapenems.

The mechanism of action of β -lactams is focused on the inhibition of the synthesis of the peptidoglycans which are part of the cell membrane configuration. They contain a β -lactam amide and adjoining carboxylate or sulfonic acid groups, which mimic the d-Ala-

d-Ala moiety of the peptidoglycan stem pentapeptide. The β -lactam ring reacts with the nucleophilic serine of target penicillin-binding proteins (PBPs). Consequently, the ring opens and the PBP is irreversibly acylated, avoiding the formation of peptidoglycan transpeptide cross-links.

Resistance to β -lactams has arisen due to the extended use of these compounds, which can be caused by different mechanisms, such as modification of PBPs, cell modifications for the β -lactams entry and production of degradative enzymes, among others. Enzyme-mediated resistance is caused by β -lactamases expression in both Gram-positive and negative bacteria. These enzymes can counteract β -lactams action by catalysing the hydrolysis of the amid bond of the β -lactam ring, rendering the antibiotic ineffective.

Four classes of β -lactamases (A-D) and two mechanisms of action have been described. On one hand, class A, C and D enzymes contain a reactive serine residue in their active site (known as serine β -lactamases; SBLs). On the other hand, class B β -lactamases contain a zinc divalent atom with a catalytic action (metallo- β -lactamases; MBLs). The presence of these enzymes is conferred by the expression of different genes, which differ among the families. Hence, class A are encoded by TEM, SHV, CTX-M and KPC genes; Class B by NDM and VIM; Class C by CMY and ADC; and Class D by OXA.

It is of relevance the spread of TEM, SHV and CTX-M families, also known as ESBL, through mobile genetic elements across Gram-negative bacteria, specially *Enterobacteriaceae*, being a threat in the clinical context. In Europe, the prevalence of ESBL among patients with infections of *E. coli* has been seen of around between 1.3 and almost 5%, and 18% of the *K. pneumoniae* positive samples. It is of special concern the prevalence of ESBL found on some hospitals, which has been reported up to a 38% in *E. coli* or a 34% in *K. pneumoniae* of patients analysed in Africa.

Colistin is an antibiotic used as the last source of treatment for multi-drug resistant bacteria. However, in 2015 a plasmid encoding *Mcr-1* (colistin resistance gene) was described in *Enterobacteriaceae*. This was the first time this resistance was found in a mobile gene element, as until then, it was only observed due to chromosomal mutations. MCR-1 is an enzyme consisting of hydrophobic transmembrane helices and a soluble part in the periplasm, which modifies the structure of the lipopolysaccharides of the bacterial outer membrane and changes the permeability.

In the last years, other 8 *Mcr* genes have been described (*Mcr2-Mcr9*) and located in different regions around the world. It has been observed most *mcr*-positive isolates are restricted to various *Enterobacteriaceae* species, particularly *Escherichia coli*, *S. enterica*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp.

Detection of drug-resistance genes using nucleic acid amplification testing (NAAT) is a fast method that can provide valuable epidemiological information, guide towards a rational antimicrobial treatment, and help with disease control and prevention.

Test principle

Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance is based on real-time amplification of conserved regions of the main β -lactamases resistant genes: cluster *bla*_{CTX-M-A} (*bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-9}), cluster *bla*_{CTX-M-B} (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8} y *bla*_{CTX-M-25}), *bla*_{TEM}, and *bla*_{SHV}, and the colistin resistance coding gene, *mcr-1*. After extraction of the nucleic acids, the presence of the pathogens 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 β -lactamases + Colistin resistance is a ready-to-use test that contains in each well all the necessary reagents in a stabilised format to perform real-time PCR. The detection channels of the target sequences are described below:

Target	Detection Channel
<i>bla</i> _{CTX-M} gene	FAM
<i>bla</i> _{SHV} gene	ROX
<i>bla</i> _{TEM} gene	HEX, VIC, or JOE (depending on the equipment used)
<i>mcr-1</i> gene	Cy5

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

Specimen collection, transport, and conservation

For specimen collection, conservation, and transport, user-validated conditions must be followed. The Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance has been tested in blood culture and swab samples as gluteal, ulcer, wound, conjunctiva, tongue, joint fluid, oral, hair, perineal, urethral, abscess, axillary, inguinal, epithelial and colostomy, nasal, pharyngeal, rectal, stoma swabs, biopsy, BAS, BAL, and sputum. The transport medium used for the collection of swab samples was AMIES (DeltaLab). Other sample types must 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. It is recommended to use fresh specimens for the test. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. The specimens should be transported at room temperature for up to 2 hours. For long term transport (more than 2 hours), we recommend shipping at -20°C or lower. The samples can be stored frozen at -20°C or lower (at -80°C ideally) 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:

- Miller JM, et al. (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. Clin Infect Dis. Aug 31;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).

DNA extraction

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 assay has been validated with the following extraction kits:

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

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized β -lactamases + Colistin resistance Positive Control (red tube) with 100 μ L 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 μ L of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 μ L 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
Initial denaturation	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 (*bla_{CTX-M}* gene), ROX (*bla_{SHV}* gene), HEX, JOE, or VIC (*bla_{TEM}* gene) and Cy5 (*mcr-1* gene). 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.

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

β -lactamases + Colistin resistance				Interpretation
<i>CTX</i> resistance gene (<i>Bla_{CTX-M-A}</i> and <i>Bla_{CTX-M-B}</i>) (FAM) ¹	<i>mcr-1</i> resistance gene (Cy5) ²	<i>SHV</i> resistance gene (<i>Bla_{SHV}</i>) (ROX) ³	<i>TEM</i> resistance gene (<i>Bla_{TEM}</i>) (HEX) ⁴	
+	-	-	-	<i>CTX</i> resistance gene DNA Detected
+	+	-	-	<i>CTX</i> and <i>mcr-1</i> resistance genes DNA Detected
+	+	+	-	<i>CTX</i> , <i>mcr-1</i> and <i>SHV</i> resistance genes DNA Detected
+	+	+	+	<i>CTX</i> , <i>mcr-1</i> , <i>SHV</i> and <i>TEM</i> resistance genes DNA Detected
+	-	+	-	<i>CTX</i> and <i>SHV</i> resistance genes DNA Detected
+	-	-	+	<i>CTX</i> and <i>TEM</i> resistance genes DNA Detected
-	+	-	-	<i>mcr-1</i> resistance gene DNA Detected
-	+	+	-	<i>mcr-1</i> and <i>SHV</i> resistance genes DNA Detected
-	+	-	+	<i>mcr-1</i> and <i>TEM</i> resistance genes DNA Detected
-	+	+	+	<i>mcr-1</i> , <i>SHV</i> and <i>TEM</i> resistance genes DNA Detected
-	-	+	-	<i>SHV</i> resistance gene DNA Detected
-	-	+	+	<i>SHV</i> and <i>TEM</i> resistance genes DNA Detected
+	-	+	+	<i>CTX</i> , <i>SHV</i> and <i>TEM</i> resistance genes DNA Detected
-	-	-	+	<i>TEM</i> resistance gene DNA Detected
-	-	-	-	Targets not Detected

¹ For *CTX* resistance gene a cut-off of Ct 37 has been set. Therefore:

(+) Positive: Amplification signal (Ct \leq 37)

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

² For *mcr-1* resistance gene a cut-off of Ct 40 has been set. Therefore:

(+) Positive: Amplification signal (Ct \leq 40)

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

³ For *SHV* resistance gene a cut-off of Ct 35 has been set. Therefore:

(+) Positive: Amplification signal (Ct \leq 35)

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

⁴ For *TEM* resistance gene a cut-off of Ct 30 has been set. Therefore:

(+) Positive: Amplification signal (Ct \leq 30)

(-) Negative: No amplification signal (Ct >30 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 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 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

A positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

To assess the Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance kit's clinical sensitivity and specificity, leftovers blood culture and swab specimens of different origin were used. These samples were collected from patients with suspicion of an infectious process and/or multi-resistant infection or colonization, as well as from patients in the ICU (epidemiological control).

These samples were first analysed using the routine method (culture and mass spectrometry). Additionally, they were also characterised with two other molecular commercial kits. A total of 1063 clinical specimens, 645 swabs and 418 blood culture samples were evaluated. After the comparison and the analysis of discrepancies, 114 samples were reported as positive for *bla*_{CTX}, 235 were positive for *bla*_{TEM} and 152 were positive for *bla*_{SHV}. All samples were considered as true positive, and no discrepancies were found.

Overall, the clinical sensitivity and specificity of the *bla*_{CTX} were 1 (0.97-1) and 1 (0.99-1), of *bla*_{TEM} were 1 (0.99-1) and 1 (0.99-1), and of *bla*_{SHV} were 1 (0.99-1) and 1 (0.99-1), respectively.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of standards from the pathogens ranging from 10⁷ to 10¹ copies/reaction. This assay has a detection limit of 0.02 CFU per reaction for β -lactamase resistance gene CTX (*Bla*_{CTX-M1}, *Bla*_{CTX-M9}, (*Bla*_{CTX-M-A}) and *Bla*_{CTX-M2}, *Bla*_{CTX-M8}, *Bla*_{CTX-M25} (*Bla*_{CTX-M-B})), 0.08 CFU per reaction for β -lactamase resistance gene type TEM (*Bla*_{TEM} gene), 8.75 copies per reaction for β -lactamase resistance gene type SHV (*Bla*_{SHV} gene), and 0.02 CFU per reaction for colistin resistance gene *mcr-1* (positive rate 95%).

Analytical specificity

The Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance kit's analytical specificity was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed with any of the species, except for the targeted pathogens of each assay:

Cross-reactivity testing					
<i>Usutu Virus</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>enteritidis</i>	-	Japanese encephalitis	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> . Serotype 4,5,12:i:1,2	-	Japanese encephalitis virus strain Nakayama	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>gallinarum</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> strain 3D7	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>pullorum</i>	-	Dengue virus type 3 strain H87	-
Astrovirus genotype I-VIII	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>paratyphi A</i>	-	Dengue virus type 4 strain H241	-
Sapovirus	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>paratyphi B</i>	-	St Louis Encephalitis Virus	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhi</i>	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Human Adenovirus type 1, 3, 4, 5, 8, 13, 31, 40 and 41	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	West Nile virus strain NY99	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 1	-	West Nile virus strain Heja	-

<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-	West Nile virus strain Ug 37	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Yellow Fever Virus strain 17D	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O1:K1	-	Yellow Fever Virus strain French Neurotropic	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-	Zika virus strain FB-GWUH-2016	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-	Zika Virus African strain	-
<i>Clostridium difficile</i> O:27	-	<i>Anaplasma marginale</i>	-	Zika Virus Asian strain PF13/251013-18	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Bartonella henselae</i> strain Houston-1	-	Zika Virus French Polynesian strain 11474/16	-
Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Borrelia hermsii</i>	-	Zika Virus French Polynesian strain 11468/16	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Borrelia lusitanae</i>	-	<i>Citrobacter braakii</i> carbapenemase positive (VIM-1)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Borrelia valaisiana</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i> ESBL/Carbapenemase positive (TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL), NDM-1)	+/-
Echovirus 30	-	<i>Borrelia azfeli</i> strain P-Ko/1984	-	<i>Enterococcus avium</i> vancomycin A resistant	-
<i>Entamoeba dispar</i> / <i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Borrelia bavariensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> vancomycin A resistant	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Borrelia bisetti</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> vancomycin B resistant (equivalent to ATCC51299)	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Borrelia burgdorferi</i> strain IRS	-	<i>Enterococcus faecium</i> vancomycin A resistant LMG16165	-
Enterovirus 68 and 71	-	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> strain B31	-	<i>Enterococcus faecium</i> vancomycin A resistant IOWA1	-
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> serotype O157:H7	-	<i>Borrelia garinii</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> S + <i>Enterococcus gallinarum</i> vancomycin C resistant (MI12043391 + LMG16289)	-
Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Borrelia japonica</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> vancomycin B and C resistant ENT20120142	-
Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	<i>Escherichia coli</i> carbapenemase positive (OXA-244)	-
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> serotype O25:H42	-	<i>Borrelia spielmanii</i>	-	<i>Escherichia coli</i> carbapenemase positive (TEM-1 (non ESBL), IMP-1)	+/-
<i>Giardia intestinalis</i> strain WB clone C6	-	<i>Coxiella burnetii</i> strain Nine Mile Q	-	<i>Helicobacter pylori</i> clarithromycin resistant A2146G	-
<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Leptospira</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i> clarithromycin resistant A2147G	-
<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	<i>Rickettsia conorii</i> strain Moroccan	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase positive (SHV-1 (non ESBL), KPC-3, OXA-48)	+/-
<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Theileria annulata</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL/carbapenemase positive (TEM-1 (non ESBL), SHV-1 (non ESBL), CTX-M-2 (ESBL), KPC-2)	+/-
<i>Helicobacter pylori</i> J99	-	Tick-Borne encephalitis virus strain Neudorfl	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (TEM, SHV, CTX-M-1, NDM)	+/-
Human Rotavirus A	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> methicillin resistant N315	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Chikungunya virus S27 Petersfield	-	<i>Staphylococcus aureus</i> methicillin resistant ST398	-

<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2c	-	Chikungunya Virus Martinique	-	<i>Staphylococcus aureus</i> methicillin resistant <i>mecC</i>	-
Norovirus GII (II.4 RNA)	-	Chikungunya Virus F24	-	<i>Escherichia coli</i> (Encodes CTX-M-15 ESBL. Plasmid <i>Pek499</i>)	+/-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	Chikungunya Virus WHO IS (R91064)	-	<i>Escherichia coli</i> (colistin resistant. <i>MCR-1</i> positive)	+/-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Dengue virus type 1 strain Hawaii A	-	Rift Valley Fever Virus AR21229	-
<i>Salmonella bongori</i> serovar 66:z41	-	Dengue virus type 2 strain New Guinea C	-	Rift Valley Fever Virus MP12	-

Analytical reactivity

The Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance kit's reactivity for CTX-M β -lactamase resistance gene was evaluated against *Enterobacter cloacae* ESBL/Carbapenemase positive (*SHV-12* (ESBL), *CTX-M-9* (ESBL), *OXA-48*), *Enterobacter cloacae* ESBL/Carbapenemase positive (*TEM-1* (no ESBL), *SHV-12* (ESBL), *CTX-M-15* (ESBL), *NDM-1*), *Klebsiella pneumoniae* ESBL/Carbapenemase positive (*TEM-1* (no ESBL), *SHV-1* (no ESBL), *CTX-M-2* (ESBL), *KPC-2*) *Escherichia coli* (encodes CTX-M-15 ESBL. Plasmid pEK499) (NCTC 13400) and *Klebsiella pneumoniae* (*TEM*, *SHV*, *CTX-M-1*, *NDM*), showing positive results.

The Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance kit's reactivity for TEM β -lactamase resistance gene was evaluated against *Enterobacter cloacae* ESBL/Carbapenemase positive (*TEM-1* (no ESBL), *SHV-12* (ESBL), *CTX-M-15* (ESBL), *NDM-1*), *Escherichia coli* carbapenemase positive (*TEM-1* (no ESBL), *IMP-1*), *Klebsiella pneumoniae* ESBL/Carbapenemase positive (*TEM-1* (no ESBL), *SHV-1* (no ESBL), *CTX-M-2* (ESBL), *KPC-2*), *Escherichia coli* (encodes CTX-M-15 ESBL. Plasmid pEK499) (NCTC 13400), showing positive results.

The Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance kit's reactivity for SHV β -lactamase resistance gene was evaluated against *Enterobacter cloacae* ESBL/Carbapenemase positive (*SHV-12* (ESBL), *CTX-M-9* (ESBL), *OXA-48*), *Enterobacter cloacae* ESBL/Carbapenemase positive (*TEM-1* (non ESBL), *SHV-12* (ESBL), *CTX-M-15* (ESBL), *NDM-1*), *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase positive (*SHV-1* (no ESBL), *KPC-3*, *OXA-48*), *Klebsiella pneumoniae* ESBL/Carbapenemase positive (*TEM-1* (no ESBL), *SHV-1* (no ESBL), *CTX-M-2* (ESBL), *KPC-2*), showing positive results.

The Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance kit's reactivity for colistin resistance gene was evaluated against *Escherichia coli* colistin resistant (*MCR-1* positive) (NCTC 13846), showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR β -lactamases + Colistin resistance has been validated on the following equipment:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^I
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^{II}
- NEOS-96 Real-Time PCR System (Linear)

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

II: For Rotor-Gene® Q, the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific tubes of the equipment.

Limitations

- All obtained results must be interpreted by a specialist in conjunction with available clinical information and laboratory findings.
- This assay has been validated with DNA extracted from in blood culture and swab samples as gluteal, ulcer, wound, conjunctiva, tongue, joint fluid, oral, hair, perineal, urethral, abscess, axillary, inguinal, epithelial and colostomy, nasal, pharyngeal, rectal, stoma swabs, biopsy, BAS, BAL, and sputum. The use of other samples has not been established.
- The test quality depends on the sample's quality; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This is a qualitative test.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.

-
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination either by β -lactamases + Colistin resistance Positive Control during its reconstitution, by 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 extraction); c) DNA degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect the detection of new or unknown β -lactamases (CTX-M, TEM, SHV) and colistin (*mcr-1*) resistance genes mutations; e) pathogen load below the limit of detection for the assay; f) the presence of Real-Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of antibiotics used to prevent the infection or used during the treatment of the infection was not performed); g) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures.
 - If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible infection with β -lactamases (CTX-M, TEM, SHV) and colistin (*mcr-1*) resistance genes and other antibiotic resistance have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.
 - Detection of bacterial DNA may not indicate the presence of viable and/or infectious bacteria or that these bacteria are the causative agents for clinical symptoms.
 - Negative results do not preclude β -lactamases (CTX-M, TEM, SHV) and colistin (*mcr-1*) resistance genes bacterial 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 bacteria.
 - 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 guidance table separated by tube type. Please refer to the table and check the equipment and its specifications before running the assay. 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	Agilent Technologies
Applied Biosystems	Mx3000P™ Real Time PCR System
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	Mx3005P™ Real Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	Applied Biosystems
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7300 Real-Time PCR System ^{(1) (4)}
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System ^{(3) (4)}	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
Azure Cielo 6	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96 Fast	qTOWER ⁽⁶⁾
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System	BIOER
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	QuantGene 9600
CFX Opus 96	Bio-Rad
Roche	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR System
LightCycler®480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	CFX96™ Deep Well IDV Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
	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 Cyclor	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen	Qiagen
Rotor-Gene® Q	QIAquant 96 ⁽⁶⁾

(1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.

(2) Select Ramp Speed "Standard" in New Experiment/Advanced Set-up/Experiment Properties.

(3) No Cy5 caption.

(4) No ROX 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®, or Rotor-Gene® Q.

(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	During the first few cycles of an analysis, some wells may exhibit abnormal RFU values and show a non-sigmoid rising line. To correct this effect, select the Apply Fluorescence Drift Correction option in the Settings menu for the baseline configuration.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none. During the first few cycles of an assay, some wells may exhibit abnormal RFU values and show a non-sigmoidal rising line. To correct for this effect, select the Start cycle and End cycle values so that the baseline ends before the detection of significant fluorescence.
	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	
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™ Mx3005P™	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
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

- Souverein D, Euser SM, van der Reijden WA, Herpers BL, Kluytmans J, Rossen JWA, Den Boer JW. (2017). Clinical sensitivity and specificity of the Check-Points Check-Direct ESBL Screen for BD MAX, a real-time PCR for direct ESBL detection from rectal swabs, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72 (9):2512–251.
- Bajpai T, Pandey M, Varma M, Bhatambare GS. (2017). Prevalence of *TEM*, *SHV*, and *CTX-M* Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna Journal of Medicine*. 7(1):12-16.
- Bush K, Bradford PA. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview.. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 6(8):a025247.
- Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 14(Suppl 1):144-53.
- Dirar MH, Bilal NE, Ibrahim ME, Hamid ME. (2020). Prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and molecular detection of *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*CTX-M genotypes among *Enterobacteriaceae* isolates from patients in Khartoum, Sudan. *The Pan African Medical Journal*. 37:213.
- Fleming, A. Penicillin; Nobel Lecture; The Nobel Foundation: Stockholm, Sweden, 11 December 1945; Available online: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/fleming/lecture/> Accessed May 2022
- Kim J, Jeon S, Rhie H, Lee B, Park M, Lee H, Lee J, Kim S. (2009). Rapid Detection of Extended Spectrum beta-Lactamase (ESBL) for Enterobacteriaceae by use of a Multiplex PCR-based Method. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 41(3):181-184.
- Li B, Yin F, Zhao X, Guo Y, Wang W, Wang P, Zhu H, Yin Y, Wang X. (2020). Colistin Resistance Gene *mcr-1* Mediates Cell Permeability and Resistance to Hydrophobic Antibiotics. *Frontiers in Microbiol*. 10:3015.
- Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. (2020). Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *J Antimicrob Chemother*. Nov 1;75(11):3087-3095.
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases* 16:161–168.
- Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, Spencer J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century *Journal of Molecular Biology*. 431(18):3472-3500.
- Sauvage, E; Kerff, F; Terrak, M; Ayala, JA; Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 32:234–258.
- Tipper DJ, Strominger JL. (1965). Mechanism of action of penicillins: A proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl- D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 54:1133– 1141

Trademarks

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

Symbols for components and reagents / Símbolos para reactivos y productos

	<i>In vitro</i> diagnostic device <i>Producto para diagnóstico in vitro</i>		Contains sufficient for <n> test <i>Contiene <n> test</i>		Catalogue number <i>Número de referencia</i>		Keep dry <i>Almacenar en lugar seco</i>		Manufacturer <i>Fabricante</i>
	Consult instructions for use <i>Consultar las instrucciones de uso</i>		Batch code (yyyy-xxx) <i>Número de lote (yyyy-xxx)</i>		Use by (yyyy-mm-dd: year-month-day) <i>Fecha de caducidad (yyyy-mm-dd: año-mes-día)</i>		Temperature limitation <i>Limitación de temperatura</i>		Volume <i>Volumen</i>
	CE marking <i>Marcado CE</i>								

Change Control / <i>Control de cambios</i>		
Version N° / <i>Versión N°</i>	Changes / <i>Cambios</i>	Date / <i>Fecha</i>
00	Original version	29/11/2022

Real-Time PCR Kits



VA Vitassay

identifying pathogens worldwide

Vitassay Healthcare, S.L.U

Parque Tecnológico Walqa

Ctra. N-330 Km. 566

22197 Huesca (Spain)

Ph. (+34) 974 001 193

info@vitassay.com

www.vitassay.com

F09-81 Rev.00