

VA Vitassay

Real-Time PCR Kits

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I

PCR en tiempo real para la detección cualitativa, identificación y diferenciación de *Enterobacter spp.*, *Acinetobacter baumannii* y/o *Escherichia coli* en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and identification of *Enterobacter spp.*, *Acinetobacter baumannii* and/or *Escherichia coli* species in clinical samples.

CE IVD

ES EN



Uso previsto

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I permite la detección cualitativa y la diferenciación del ADN de *Enterobacter spp.*, *Acinetobacter baumannii* y *Escherichia coli* mediante PCR en tiempo real en muestras de hemocultivos e hisopos de pacientes con sospecha de infección bacteriana y/o infección multirresistente o colonización, así como hisopados para control epidemiológico por parte del profesional sanitario. Este producto está destinado a ayudar en el diagnóstico de las infecciones por *Enterobacter spp.*, *Acinetobacter baumannii* y *Escherichia coli*, 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 I, 4x8-well strip, low profile	7041073
Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I, 4x8-well strip, high profile	7042073

Reactivos suministrados

Para las referencias 7041073 y 7042073:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S073/ 7042S073	Gram-negative I strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C073	Gram-negative I 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 ≤ -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 µL, 20-200 µL)
- 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

Enterobacter spp., *Acinetobacter baumannii* y *Escherichia coli* son patógenos nosocomiales gran-negativos multirresistentes. Sus infecciones afectan principalmente a los pacientes de las unidades de cuidados intensivos y a los pacientes inmunodeprimidos. El desarrollo de cepas multirresistentes está causando un importante problema sanitario en todo el mundo.

Estos patógenos están asociados a un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR), ya que son capaces de adaptarse al entorno hospitalario y adquirir fácilmente múltiples elementos genéticos móviles que albergan genes de resistencia y virulencia.

Enterobacter spp.

El género *Enterobacter* incluye bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos, que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. En 2019, se habían encontrado 22 especies de este género: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. arachidis*, *E. asburiae*, *E. carcinogenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. dissolvans*, *E. gergoviae*, *E. helveticus*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. nimipressuralis*, *E. oryzae*, *E. pulveris*, *E. pyrinus*, *E. radicincitans*, *E. soli*, *E. taylorae* y *E. turicensis*. Entre estas especies, *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori* y *E. nimipressuralis*, se agrupan dentro del grupo del complejo *Enterobacter cloacae*.

Las *Enterobacter* spp. están presentes en una variedad de hábitats ambientales y se encuentran en el agua, las aguas residuales, el suelo, las plantas o las heces de los animales. Estos microorganismos son comensales naturales del microbiota intestinal animal y humana, y también son patógenos oportunistas de plantas y humanos.

Enterobacter spp. posee diferentes endotoxinas, se ha observado que las cepas de *Enterobacter* spp. Secretan, *in vitro*, enterotoxinas, alfa-hemolisinas y citotoxinas como las toxinas tipo Shiga II. Las *Enterobacter* spp. están implicadas en numerosas infecciones de la piel y los tejidos blandos, el tracto respiratorio, los huesos y las articulaciones, el sistema nervioso central, el tracto gastrointestinal, los abscesos cerebrales, la neumonía, la meningitis, la septicemia y las heridas, el tracto urinario (en particular las relacionadas con catéteres) y las infecciones de la cavidad abdominal/intestinales.

Acinetobacter baumannii

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) es un cocobacilo Gram-negativo, aeróbico, no móvil, que pertenece al género *Acinetobacter*. La bacteria se adapta a un amplio rango de temperaturas y valores de pH y es capaz de sobrevivir tanto a superficies abióticas como bióticas, lo que favorece en la contribución de su diseminación y propagación de cepas patógenas multirresistentes. La letalidad de las infecciones por *Acinetobacter* es elevada. Entre las especies de *Acinetobacter*, *A. baumannii* es la más prevalente, responsable del 95% de las infecciones y brotes en los hospitales.

Aunque su reservorio sigue siendo desconocido, este organismo se ha encontrado en el suelo, el agua y los alimentos, incluyendo el pescado, la leche, las verduras crudas y la carne. Los pacientes hospitalizados y vulnerables tienen un mayor riesgo de infecciones por *A. baumannii* porque penetra a través de los defectos de la piel y las vías respiratorias. Es un patógeno oportunista que causa infecciones de la piel, el torrente sanguíneo, el tracto urinario y otros tejidos blandos, infecciones de heridas, bacteriemia, endocarditis, meningitis y neumonía.

Se han identificado varios factores de virulencia mediante análisis genómicos y fenotípicos, incluyendo porinas de la membrana externa, fosfolipasas, proteasas, lipopolisacáridos, polisacáridos capsulares, sistemas de secreción de proteínas y sistemas de quelación de hierro.

Escherichia coli

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria anaerobia facultativa Gram-negativa, miembro de la familia bacteriana de las *Enterobacteriaceae*. Es el habitante comensal más frecuente del tracto gastrointestinal humano y de los animales homeotermo. Es, además, una de las especies patógenas más importantes. Esta bacteria es capaz de crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, convirtiéndola en un importante organismo huésped en biotecnología. El nicho de la *E. coli* comensal es la capa mucosa del colon de los mamíferos. Estas cepas de *E. coli* comensales causan enfermedades cuando el huésped está inmunodeprimido, o cuando se rompen las barreras gastrointestinales normales. Es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en lactantes y niños pequeños.

Tres síndromes clínicos generales pueden resultar de la infección por uno de estos patotipos: enfermedad entérica/diarreica, infecciones del tracto urinario (ITU) y sepsis/meningitis.

Las principales categorías de cepas de *E. coli* diarreicas incluyen la *E. coli* enteropatógena (EPEC), la *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), la *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Hoy en día, la resistencia a los antimicrobianos es un importante y creciente problema sanitario mundial. La mayoría de las bacterias han evolucionado y transmitido a otras especies la resistencia a los antimicrobianos. El consumo excesivo de antibióticos y el uso inadecuado son algunos de los factores que han acelerado aún más este fenómeno. En Europa, la resistencia a los antimicrobianos en las bacterias Gram-negativas va en aumento, lo que dificulta el tratamiento de varias infecciones graves.

Enterobacter spp. y *Acinetobacter baumannii* son miembros del grupo ESKAPE, cuyos miembros se describen como la principal causa de infecciones nosocomiales resistentes.

Principio de la prueba

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de los genes *Xx* y *Omp* de *Enterobacter* spp., del gen *bap* de *A. baumannii*, y del gen *16S rRNA* de *E. coli*. 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 Gram-negative Nosocomial Agents I, 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 canales de detección de las secuencias diana se describen a continuación:

Diana	Canal detección
<i>Enterobacter spp.</i>	FAM
<i>A. baumannii</i>	ROX
<i>E. coli</i>	Cy5
Control interno	HEX, VIC o JOE (según el 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.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.

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 Gram-negative Nosocomial Agents I ha sido testado en hemocultivos recogidos en viales aeróbicos BD BACTEC™ Plus Aerobic/F y viales anaerobios BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F (Becton Dickinson) así como en muestras de hisopos (de biopsias, de glúteos, de úlceras, de heridas, de lengua, de fluidos articulares, orales, de pelo, perineales, uretrales, de abscesos de

ostomía, nasales, faríngeos, rectales, axilares, inguinales, epiteliales, de colostomía, de estoma, BAS, BAL, esputo) recogidos utilizando un hisopo de poliestireno rompible estéril en 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 medio 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. Las muestras deben transportarse a temperatura ambiente como máximo durante 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 entre 2°C y 8°C hasta 5 días o pueden congelarse a -20°C o menos (-80°C idealmente) para un 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, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras de Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Canton Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

Extracción de DNA

Realizar el aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas utilizando 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:

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek)

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

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Gram-negative I 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 (*Enterobacter spp.*), ROX (*A. baumannii*), Cy5 (*E. coli*) 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 (Ct ≤40) en el canal FAM, Cy5 y ROX.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal (Ct >35 o no señal) en el canal FAM y ROX, y ausencia de señal (Ct >30 o no señal) en el canal 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:

Gram-negative Nosocomial Agents I				Interpretación
<i>Enterobacter</i> (FAM) ¹	<i>A.baumannii</i> (ROX) ²	<i>E. coli</i> (Cy5) ³	Control Interno (HEX)	
+	-	-	+/- ⁴	DNA de <i>Enterobacter</i> Detectado
-	+	-	+/- ⁴	DNA de <i>A. baumannii</i> Detectado
-	-	+	+/- ⁴	DNA de <i>E. coli</i> Detectado
+	+	-	+/- ⁴	DNA de <i>Enterobacter</i> y <i>A. baumannii</i> Detectado
+	-	+	+/- ⁴	DNA de <i>Enterobacter</i> y <i>E. coli</i> Detectado
-	+	+	+/- ⁴	DNA de <i>A. baumannii</i> y <i>E. coli</i> Detectado
+	+	+	+/- ⁴	DNA de todas las dianas Detectado
-	-	-	+ ⁵	DNA molde diana no Detectado ⁵
-	-	-	- ⁵	Test fallido ⁵

¹Para los genes *Xx* y *Omp* 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)

²Para el gen *bap* 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)

³Para el gen *16S rRNA* 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)

⁴En 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).

⁵En el caso de que la detección de las regiones diana de los patógenos resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct >35 del control interno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

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

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

El rendimiento clínico de Vitassay qPCR Agentes Nosocomiales I se evaluó con un total de 1047, de las cuales 627 eran muestras de hisopo y 418 eran hemocultivos. Estas muestras se recogieron en un hospital español de tercer nivel y la comparación con el ensayo Vitassay se realizó según la matriz, y utilizando el método rutinario basado en cultivos, así como un método molecular.

Los estudios clínicos que componen esta evaluación se realizaron de forma retrospectiva con restos de muestras ya diagnosticadas. Para la evaluación molecular posterior, los ácidos nucleicos se extrajeron automáticamente utilizando el kit MagDEA Dx SV en la plataforma magLEAD® 12gC.

Se tomaron muestras de hisopos de diferentes localizaciones corporales (como heridas, inguinal, úlcera, nasal rectal, faríngea, nasal, axilar, glútea, entre otras) y se inocularon inmediatamente en medio de transporte. Las muestras se dividieron en dos grupos según el paciente y la finalidad. Así, 542 muestras se tomaron con fines epidemiológicos y el resto se recogieron de pacientes con sospecha de infecciones bacterianas y/o MDR y/o colonización. El diagnóstico se realizó con la ayuda de técnicas de cultivo más espectrometría de masas, incluyendo medios de cultivo basados en agar, así como MALDI-TOF y métodos de identificación de resistencia a los antimicrobianos (antibiogramas, paneles, etc.). Con esta caracterización inicial se obtuvieron 13 muestras positivas para *Enterobacter* y 38 muestras positivas para *E. coli*. Mientras que no se identificó ninguna muestra positiva para *Acinetobacter baumannii*.

Curiosamente, cuando se compararon con los resultados del Vitassay, se encontraron muchas discrepancias, que se resolvieron posteriormente con la secuenciación. Así, los resultados obtenidos, para las muestras de hisopo fueron los siguientes:

<i>A.baumannii</i>		Routine assay + sequencing		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	4	0	4
	Negative	0	623	623
	Total	4	623	627
<i>Enterobacter</i>		Routine assay + sequencing		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	85	0	85
	Negative	0	542	542
	Total	85	542	627
<i>E. coli</i>		Routine assay + sequencing		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	166	0	166
	Negative	0	461	461
	Total	166	461	627

Tabla A: Resultados del análisis Vitassay qPCR Agentes Nosocomiales I vs. NAAT para objetivos de *A. baumannii*, *Enterobacter* y *E. coli* en muestras de hemocultivos.

Por otro lado, las muestras de sangre total se cultivaron en medios aeróbicos y anaeróbicos con un kit comercial. Los microbios que crecieron en esos medios se sembraron posteriormente en placas de medio de agar sólido y se analizaron con MALDI-TOF, de forma similar a las muestras de hisopos. También se evaluó la MDR. En el diagnóstico inicial, 8 muestras fueron positivas para *Enterobacter* y 111 para *E. coli*. Ninguna muestra fue identificada como positiva para *A. baumannii*. Cuando se comparó con el kit Vitassay qPCR, se encontraron 8 discrepancias, que se evaluaron con el análisis molecular y los resultados finales fueron los indicados a continuación:

Enterobacter		Routine assay		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	10	0	10
	Negative	0	408	408
	Total	0	408	418
A.baumannii		Routine assay		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	0	0	0
	Negative	0	418	418
	Total	0	418	418
E. coli		Routine assay		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	111	0	111
	Negative	0	307	307
	Total	111	461	418

Tabla B: Resultados de Vitassay qPCR Agentes Nosocomiales I frente al ensayo de rutina para objetivos de *A. baumannii*, *Enterobacter* y *E. coli* en muestras de hemocultivos.

Además, las muestras que resultaron positivas con el kit Vitassay qPCR y las muestras negativas seleccionadas al azar también se analizaron con los kits de PCR CE-IVD especializados en la diferenciación de estos patógenos. Los resultados obtenidos con la metodología convencional y la prueba NAAT se compararon con los obtenidos con el ensayo Vitassay.

Enterobacter		NAAT analysis		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	10	0	10
	Negative	0	46	46
	Total	0	46	56
A.baumannii		NAAT Analysis		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	0	0	0
	Negative	0	26	26
	Total	0	26	26

<i>E. coli</i>		NAAT Analysis		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	23	0	23
	Negative	0	33	33
	Total	23	33	56

Tabla C: Resultados del análisis Vitassay qPCR Agentes Nosocomiales I vs. NAAT para objetivos de *A. baumannii*, *Enterobacter* y *E. coli* en muestras de hemocultivos.

Con estos datos, se calculó la sensibilidad y la especificidad:

Tras el análisis estadístico (IC=95%), estos estudios han mostrado valores de sensibilidad para *Enterobacter* de 1(0,95-1); para *A. baumannii* de 1 (0,39-1) y para *E. coli* de 1(0,97-1) en muestras de hisopo. La especificidad fue de 1 (0,99-1) para todos los objetivos.

En cuanto a las muestras de hemocultivos, la sensibilidad para *Enterobacter* fue de 1(0,69-1) y para *E. coli* de 1(0,96-1). Debido a la falta de muestras positivas para *A. baumannii*, no se pudo calcular la sensibilidad. La especificidad fue de 1(0,98-1) para *A. baumannii* y *E. coli*, y de 1 (0,99-1) para *Enterobacter*.

En general, Vitassay qPCR Agentes Nosocomiales I presenta una alta sensibilidad y especificidad para la detección de *A. baumannii*, *Enterobacter* y *E. coli*. Cabe destacar la superioridad de este kit de qPCR sobre la metodología de rutina del laboratorio.

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 2×10^{-3} CFU/ μ l para *E. cloacae* subsp. *cloacae*, 2×10^{-3} CFU/ μ l para *A. baumannii*, y 5×10^{-3} CFU/ μ l para *E. coli* (tasa positividad $\geq 95\%$), en muestras de sangre y un límite de detección de 4×10^{-3} CFU/ μ l para *E. cloacae* subsp. *cloacae*, 10^{-3} CFU/ μ l para *A. baumannii*, y 10^{-2} CFU/ μ l para *E. coli* (tasa positividad $\geq 95\%$), en muestras de orina.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de los diferentes patógenos fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas con ninguna de las especies, excepto en algunas muestras con posible contaminación por el/los patógeno/s diana, debido al tipo de matriz. *Shigella spp.* y *E. coli* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, comparten varias características fenotípicas comunes y están estrechamente relacionados genéticamente. De hecho, la similitud nucleotídica entre *Shigella* y *E. coli* es del 80% al 90%, lo que da lugar a que su diferenciación resulte un desafío:

Pruebas de reactividad cruzada					
Adenovirus tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41 ¹	+/-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2c	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	Norovirus GI ²	-	<i>Borrelia miyamotoi</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Norovirus GII (GII.4)	-	<i>Borrelia spielmanii</i>	-
Astrovirus genotipos I-VIII	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Coxiella burnetii</i> cepa Nine Mile Q	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Leptospira</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Salmonella bongori</i> serovar 66:z41:-	-	<i>Rickettsia conorii</i> cepa Moroccan	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>enteritidis</i>	-	<i>Theileria annulata</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>gallinarum</i>	-	Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, cepa Neudorfi	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>paratyphi A y B</i>	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-

<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>pullorum</i>	-	Virus Chikungunya S27 Petersfield	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> serotipo 4,5,12:i:1,2.	-	Virus Chikungunya Martinique	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhi</i>	-	Virus Chikungunya F24	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Sapovirus ²	+/-	Virus Chikungunya WHO IS (R91064)	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	Dengue 1 Hawaii A	-
<i>Clostridium difficile</i> 027 ⁴	+/-	<i>Shigella dysenteriae</i> serotipo 1 ³	+/-	Dengue 2 New Guinea C	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Shigella flexneri</i> ³	+/-	Dengue 3 H87	-
Coxsackievirus A24, A9 y B3	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Dengue 4 H241	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotipo O1:K1	-	Virus de la Encefalitis Japonesa	-
<i>Cryptosporidium hominis</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> (O:3, O:9)	-	Virus de la Encefalitis Japonesa Nakayama	-
<i>Dientamoeba fragilis</i> / <i>Blastocystis hominis</i> ²	+/-	<i>Anaplasma marginale</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> cepa 3D7	-
Echovirus 30	-	<i>Bartonella henselae</i> cepa <i>Houston-1</i>	-	Virus de la fiebre del Valle del Rift AR21229	-
<i>Entamoeba dispar</i> / <i>Blastocystis hominis</i> ²	+/-	<i>Borrelia hermsii</i>	-	Virus de la fiebre del Valle del Rift MP12	-
<i>Entamoeba histolytica</i> cepa DS4-868	-	<i>Borrelia lusitanae</i>	-	Virus de la Encefalitis de San Luis	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Borrelia valaisiana</i>	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
Enterovirus 68 y 71	-	<i>Borrelia azfeli</i> cepa <i>P-Ko/1984</i>	-	Virus Usutu	-
<i>Giardia intestinalis</i> cepa <i>WB</i> clon <i>C6</i>	-	<i>Borrelia bavariensis</i>	-	Virus del Nilo Occidental (NY99, Heja y Ug37)	-
<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Borrelia bissetti</i>	-	Virus de la Fiebre Amarilla cepa 17D	-
<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	<i>Borrelia burgdorferi</i> cepa <i>IRS</i>	-	Virus de la Fiebre Amarilla Neurotrópico Francés	-
<i>Helicobacter pylori</i> <i>J99</i>	-	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> cepa <i>B31</i>	-	Virus Zika FB-GWUH-2016	-
Rotavirus A humano	-	<i>Borrelia garinii</i> cepa <i>tipo</i>	-	Virus Zika cepas Africana, Asiática PF13/251013-18, de la Polinesia Francesa (11474/16 y 11468/16)	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Borrelia japonica</i>	-		

¹Se sobreexpresó en cultivo y puede que porte DNA de *E. coli*. Para Adenovirus Tipo 2, cepa Adenoid 6, el resultado se confirmó mediante el kit comercial FTD Neonatal Meningitis.

²Es una muestra sintética en matriz fecal y puede que porte DNA de *E. coli*. Para Norovirus GI, el resultado positivo para *E. coli* fue confirmado mediante el kit comercial FTD Neonatal Meningitis.

³*Shigella* y *E. coli* comparte nel 80-90% de homología de secuencia y es difícil distinguirlas por PCR.

⁴Es una muestra sintética en matriz fecal y puede que porte DNA de *E. coli*.

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I para *Enterobacter* se evaluó utilizando DNA extraído de *Enterobacter cloacae* subs. *cloacae* cepa *CDC 442-68* (como modelo), mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I para *A.baumannii* se evaluó utilizando DNA extraído de *Acinetobacter baumannii* cepa 5377 (como modelo), mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I para *E. coli* se evaluó utilizando DNA extraído de las siguientes cepas (como modelos) mostrando resultados positivos:

Escherichia coli cepas 1101362 (que expresa KPC) y 1001728 (que expresa NDM-1)

Escherichia coli que expresan IMP, MCR-1, y CTX-M-15, OXA-1 y TEM-1

Escherichia coli enteroinvasiva (que expresa el gen *ipaH*)

Escherichia coli enteropatogénica (que expresa el gen *eae*)

Escherichia coli enterohemorrágica, serotipo O157:H7

Escherichia coli enterotoxigénica serotipo O25:H42

Termocicladores compatibles

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

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- NEOS-96 Real-Time PCR System (Linear)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)

¹: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- 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 de hisopos, como de biopsias, de glúteo, de úlceras, de heridas, de lengua, de fluidos articulares, orales, de pelo, perineales, uretrales, de abscesos e hisopos de ostomía, procedentes de pacientes con sospecha de infección bacteriana y/o infección multirresistente o colonización, por parte de su profesional de la salud (PS), así como de muestras de hisopos para control epidemiológico como hisopos nasales, faríngeos, rectales, axilares, inguinales, epiteliales, de colostomía, de estoma, de aspirados broncoalveolares (BAS de sus siglas en inglés), de lavados broncoalveolares (BAL de sus siglas en inglés) y de esputo. El uso de otras muestras no se ha establecido y han de ser validadas por el usuario. 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 I positivo 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 el aislamiento de DNA); c) Degradación del DNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) mutaciones potenciales de las secuencias diana de *Enterobacter*, *A. baumannii* y/o *E. coli* 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 vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); g) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante.

- La detección del DNA puede no indicar la presencia de bacterias viables y/o infecciosas o que sean el agente causante de los síntomas clínicos.
- Resultados negativos no impiden la infección por *Enterobacter*, *A. baumannii* y/o *E. coli* 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.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con *Enterobacter*, *A. baumannii* y/o *E. coli*, y se han descartado otras infecciones bacterianas y/o infecciones multirresistentes o colonizaciones, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR, el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.

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 <i>realplex</i>
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 Gram-negative Nosocomial Agents I allows the qualitative detection and differentiation of DNA from *Enterobacter spp.*, *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* by Real-Time PCR in blood culture and swab samples from patients with suspect 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 *Enterobacter spp.*, *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* infections diagnosis, alongside the patient's clinical data, epidemiological risk factors, and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I 4x8-well strip, low profile	7041073
Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I 4x8-well strip, high profile	7042073

Reagents provided

In references 7041073 and 7042073:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S073/ 7042S073	Gram-negative I strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C073	Gram-negative I 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 ≤ -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

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

Enterobacter spp., *Acinetobacter baumannii*, and *Escherichia coli* are gram-negative nosocomial multidrug-resistant pathogens. Their infections mainly affect patients in intensive care units and immunocompromised patients. The development of multidrug-resistant strains is causing a major health problem worldwide.

Because of their adaptation to the hospital environment and their capacity to easily acquire multiple genetic mobile elements harboring resistance and virulence genes, these pathogens are usually associated with a multidrug resistance (MDR) phenotype. (Davin-Regli et al., 2019).

***Enterobacter* spp.**

The genus *Enterobacter* includes facultative anaerobic Gram-negative bacilli, which belongs to the *Enterobacteriaceae* family. In 2019, 22 species had been found in this genus: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. arachidis*, *E. asburiae*, *E. carcinogenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. dissolvans*, *E. gergoviae*, *E. helveticus*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. nimipressuralis*, *E. oryzae*, *E. pulveris*, *E. pyrinus*, *E. radicincitans*, *E. soli*, *E. taylorae*, and *E. turicensis*. Among these species, *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, and *E. nimipressuralis*, are grouped within the *Enterobacter cloacae* complex group.

Enterobacter spp. are present in a variety of environmental habitats and are found in water, sewage, soil, plants, or animal feces. These microorganisms are natural commensals of the animal and human gut microbiota, and they are also opportunistic pathogens of plants and humans.

Enterobacter spp. possesses different endotoxins, it has been observed that *Enterobacter* spp. strains secreted in vitro enterotoxins, alpha-hemolysins, and cytotoxins like Shiga-like toxins II. *Enterobacter* spp. are involved in numerous infections of skin and soft tissues, respiratory tract, bone and joints, central nervous system, gastrointestinal tract, cerebral abscess, pneumonia, meningitis, septicemia, and wound, urinary tract (particularly catheter related), and abdominal cavity/intestinal infections.

Acinetobacter baumannii

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) is gram-negative, aerobic coccobacilli, non-motile, which belongs to *Acinetobacter* genus. The bacteria can be adapted to a wide range of temperatures and pH values and is able to survive both abiotic and biotic surfaces, which favors the contribution of their dissemination and spread of pathogenic multidrug-resistant strains. The lethality of *Acinetobacter* infections is elevated in more than half of cases. Among *Acinetobacter* spp., *A. baumannii* is the most prevalent, responsible for 95% of infections and outbreaks in hospitals.

Although its reservoir remains unknown, this organism has been found in soil, water, and food, including fish, milk, raw vegetables, and meat. Hospitalized and vulnerable patients are at higher risk of *A. baumannii* infections because it penetrates through skin and airway defects. It is an opportunistic pathogen which causes infections of the skin, bloodstream, urinary tract, and other soft tissues, wound infections, bacteremia, endocarditis, meningitis, and pneumonia.

Several virulence factors have been identified by genomic and phenotypic analyses, including outer membrane porins, phospholipases, proteases, lipopolysaccharides, capsular polysaccharides, protein secretion systems, and iron-chelating systems.

Escherichia coli

Escherichia coli (*E. coli*) is a facultative anaerobic Gram-negative bacteria member of the bacterial family of *Enterobacteriaceae*. It is the most prevalent commensal inhabitant in human gastrointestinal tract and warm-blooded animals, as well as one of the most important pathogens. The bacterium is able to grow under both aerobic and anaerobic condition, making it an important host organism in biotechnology. The niche of commensal *E. coli* is the mucous layer of the mammalian colon. This commensal *E. coli* strains cause disease when the host is immunocompromised or where the normal gastrointestinal barriers are breached. It is a major cause of morbidity and mortality in infants and young children.

Three general clinical syndromes can result from infection with one of these pathotypes: enteric/diarrhoeal disease, urinary tract infections (UTIs) and sepsis/meningitis.

The major categories of diarrheagenic *E. coli* strains include enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) and enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC).

Nowadays, antimicrobial resistance is a major and increasing global healthcare problem. Most of bacteria have evolved and transmitted antimicrobial resistance to other species. The excessive consumption of antibiotics and the inappropriate use are among factors which further accelerated this phenomenon. In Europe, antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria is on the rise, making difficult the treatment of several serious infections.

Enterobacter spp. and *Acinetobacter baumannii* are members of the ESKAPE group, whose members are described as the leading cause of resistant nosocomial infections.

Test principle

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I is based on the real-time amplification of a conserved region of *Xx* and *Omp* genes of *Enterobacter* spp., *bap* gene of *A. baumannii*, and *16S rRNA* of *E. coli*. After DNA isolation, the pathogens presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

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

fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible inhibition reaction. The detection channels of the target sequences are described below:

Target	Detection Channel
<i>Enterobacter spp.</i>	FAM
<i>A. baumannii</i>	ROX
<i>E. coli</i>	Cy5
Internal Control (IC)	HEX, VIC, or JOE (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.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.

Procedures

Specimen collection, transport, and conservation

For specimen collection, conservation, and transport, user-validated conditions must be followed. The Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I has been tested in blood culture samples collected in aerobic vials BD BACTEC™ Plus Aerobic/F and in anaerobic vials BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F (Becton Dickinson), as well as in swab samples (biopsy, gluteal, ulcer, wound, tongue, joint fluid, oral, hair, perineal, urethral, abscess, ostomy, nasal, pharyngeal, rectal, axillar, inguinal, epithelial, colostomy, stoma, BAS, BAL, sputum) collected using a sterile breakable polystyrene swab and placed into AMIES transport medium (Deltalab). 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. 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 a long time. 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, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras de Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Canton Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

DNA extraction

For nucleic acid isolation from clinical samples, 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:

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

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Gram-negative I 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 to 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 (*Enterobacter spp.*), ROX (*A. baumannii*), Cy5 (*E. coli*), 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 ≤40) in FAM, HEX, Cy5 and ROX channel, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence (Ct >35 or no signal) in FAM and ROX channel, and it must show signal' absence (Ct > 30 or no signal) in Cy5 channel, 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 ≤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:

Gram-negative Nosocomial Agents I				Interpretation
<i>Enterobacter</i> (FAM) ¹	<i>A.baumannii</i> (ROX) ²	<i>E. coli</i> (Cy5) ³	Internal Control (HEX)	
+	-	-	+/- ⁴	<i>Enterobacter</i> DNA Detected
-	+	-	+/- ⁴	<i>A. baumannii</i> DNA Detected
-	-	+	+/- ⁴	<i>E. coli</i> DNA Detected
+	+	-	+/- ⁴	<i>Enterobacter</i> and <i>A.</i> <i>baumannii</i> DNA Detected
+	-	+	+/- ⁴	<i>Enterobacter</i> and <i>E. coli</i> DNA Detected
-	+	+	+/- ⁴	<i>A. baumannii</i> and <i>E. coli</i> DNA Detected
+	+	+	+/- ⁴	All targets' DNA Detected
-	-	-	+ ⁵	Targets not detected ²
-	-	-	- ⁵	Failed test

¹ For *Xx* and *Omp* genes a cut-off of Ct 35 has been set. Therefore:

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

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

² For *bap* gene a cut-off of Ct 35 has been set. Therefore:

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

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

³ For *16S rRNA* gene a cut-off of Ct 30 has been set. Therefore:

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤30)

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

⁴ Sometimes, the Internal Control (IC) detection is not necessary since a high copies number of the target can cause a preferential amplification of target-specific nucleic acids. The Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal).

⁵ In the case of negative pathogens 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 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.

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

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

Clinical Performance of Vitassay qPCR Nosocomial Agents I was evaluated with a total of 1047, of which 627 were swab samples and 418 were blood cultures. These samples were collected in Spanish third level hospital and the comparison with Vitassay assay was performed according to the matrix, and using the cultured-base routine method, as well as a molecular method.

The clinical studies comprising this evaluation were done retrospectively with remnants from already-diagnosed specimens. For the later molecular assessment, nucleic acids were automatically extracted using MagDEA Dx SV Kit on the magLEAD® 12gC platform.

Swabs samples were taken from different body locations (such as wounds, inguinal, ulcer, rectal nasal, pharyngeal, nasal, armpit, gluteus, among others) and they were immediately inoculated in transport medium. The samples were divided into two groups depending on the patient and purpose. This way, 542 samples were taken for epidemiological purposes and the rest were collected from patients with suspicion of bacterial and/or MDR infections and/or colonization. The diagnosis was made with the aid of culture + mass-spectrometry techniques, including agar-based culture media, as well as MALDI-TOF and methods for identification of antimicrobial resistance (antibiograms, panels, etc). With this initial characterisation *Enterobacter* 13 positive samples and 38 *E. coli* positive samples were obtained. Whereas no positive sample for *Acinetobacter baumannii* was identified.

Interestingly, when compared to Vitassay results, many discrepancies were found, which were later addressed with sequencing. Thus, the results obtained, for swab samples were as follows:

<i>A.baumannii</i>		Routine assay + sequencing		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	4	0	4
	Negative	0	623	623
	Total	4	623	627
<i>Enterobacter</i>		Routine assay + sequencing		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	85	0	85
	Negative	0	542	542
	Total	85	542	627
<i>E. coli</i>		Routine assay + sequencing		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	166	0	166
	Negative	0	461	461
	Total	166	461	627

Table A: Results of Vitassay qPCR Nosocomial Agents I vs. the routine assay and sequencing for *A. baumannii*, *Enterobacter* and *E. coli* targets in swab samples.

On the other hand, whole blood samples were cultured in aerobic and anaerobic media with a commercial kit. The microbes that grew in that media were later seeded on solid agar medium plates and analysed with MALDI-TOF, similarly to swabs samples. MDR was also assessed. In initial diagnosis, 8 positive specimens were positive for *Enterobacter* and 111 were for *E. coli*. No sample was identified as positive for *A. baumannii*. When compared to Vitassay qPCR kit, 8 discrepancies were found, and they were assessed with molecular analysis and final results were as indicated below:

<i>Enterobacter</i>		Routine assay		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	10	0	10
	Negative	0	408	408
	Total	0	408	418
<i>A.baumannii</i>		Routine assay		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	0	0	0
	Negative	0	418	418
	Total	0	418	418
<i>E. coli</i>		Routine assay		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	111	0	111
	Negative	0	307	307
	Total	111	461	418

Table B: Results of Vitassay qPCR Nosocomial Agents I vs. the routine assay for *A. baumannii*, *Enterobacter* and *E. coli* targets in blood culture samples.

In addition, samples that were positive with Vitassay qPCR kit and negative samples randomly selected were also tested with CE-IVD PCR kits specialized in the differentiation of these pathogens. Results obtained with conventional methodology and NAAT test were compared to the ones obtained with Vitassay assay.

<i>Enterobacter</i>		NAAT analysis		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	10	0	10
	Negative	0	46	46
	Total	0	46	56
<i>A.baumannii</i>		NAAT Analysis		
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I		Positive	Negative	Total
	Positive	0	0	0
	Negative	0	26	26
	Total	0	26	26

<i>E. coli</i>		NAAT Analysis		
		Positive	Negative	Total
Vitassay qPCR Nosocomial Agents I	Positive	23	0	23
	Negative	0	33	33
	Total	23	33	56

Table C: Results of Vitassay qPCR Nosocomial Agents I vs. NAAT analysis for *A. baumannii*, *Enterobacter* and *E. coli* targets in blood culture samples.

With these data, sensitivity and specificity were calculated:

After the statistical analysis (CI=95%), these studies have shown sensitivity values for *Enterobacter* 1(0.95-1); for *A. baumannii* of 1 (0.39-1) and for *E. coli* of 1(0.97-1) in swab samples. Specificity was of 1 (0.99-1) for all the targets.

Regarding blood culture samples, sensitivity for *Enterobacter* was 1(0.69-1) and for *E. coli* was 1(0.96-1). Due to the lack of *A. baumannii* positive specimens, sensitivity could not be calculated. Specificity was of 1(0.98-1) for *A.baumannii* and *E.coli*, and of 1 (0.99-1) for *Enterobacter*.

Overall, Vitassay qPCR Nosocomial Agents I presents high sensitivity and specificity for the detection of *A. baumannii*, *Enterobacter* and *E. coli*. It is noteworthy the superiority of this qPCR kit over the routine laboratory methodology.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by 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 2×10^{-3} CFU/ μ l for *E.cloacae* subsp. *cloacae*, 2×10^{-3} CFU/ μ l for *A. baumannii*, and 5×10^{-3} CFU/ μ l for *E. coli* (positive rate $\geq 95\%$), on blood samples, and 4×10^{-3} CFU/ μ l for *E.cloacae* subsp. *cloacae*, 10^{-3} CFU/ μ l for *A. baumannii* and 10^{-2} CFU/ μ l for *E. coli* (positive rate of $\geq 95\%$), on urine samples.

Analytical specificity

The analytical specificity for the different pathogen detection, was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed with any of the species, except for some samples with potential contamination by the target pathogen/s due to the matrix type. *Shigella spp.* and *E. coli* belong to the family *Enterobacteriaceae*, share many common phenotypic characteristics and are closely genetic relatedness. In fact, the nucleotide similarity between *Shigella* and *E. coli* is 80% to 90%, which cause a challenging differentiation:

Cross-reactivity testing					
Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41 ¹	+/-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2c	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	Norovirus GI ²	-	<i>Borrelia miyamotoi</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Norovirus GII (GII.4)	-	<i>Borrelia spielmanii</i>	-
Astrovirus genotypes I-VIII	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Coxiella burnetii</i> strain Nine Mile Q	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Leptospira</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Salmonella bongori</i> serovar 66:z41:-	-	<i>Rickettsia conorii</i> strain Moroccan	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>enteritidis</i>	-	<i>Theileria annulata</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>gallinarum</i>	-	Tick-borne encephalitis virus, strain Neudorfi	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>paratyphi A and B</i>	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-

<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>pullorum</i>	-	Chikungunya Virus S27 Petersfield	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> serotype 4,5,12:i:1,2.	-	Chikungunya Virus Martinique	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhi</i>	-	Chikungunya Virus F24	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Sapovirus ²	+/-	Chikungunya Virus WHO IS (R91064)	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	Dengue 1 Hawaii A	-
<i>Clostridium difficile</i> 027 ⁴	+/-	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 1 ³	+/-	Dengue 2 New Guinea C	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Shigella flexneri</i> ³	+/-	Dengue 3 H87	-
Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Dengue 4 H241	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O1:K1	-	Japanese Encephalitis Virus	-
<i>Cryptosporidium hominis</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> (O:3, O:9)	-	Japanese Encephalitis Virus Nakayama	-
<i>Dientamoeba fragilis</i> / <i>Blastocystis hominis</i> ²	+/-	<i>Anaplasma marginale</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> strain 3D7	-
Echovirus 30	-	<i>Bartonella henselae</i> strain Houston-1	-	Rift Valley fever virus AR21229	-
<i>Entamoeba dispar</i> / <i>Blastocystis hominis</i> ²	+/-	<i>Borrelia hermsii</i>	-	Rift Valley fever virus MP12	-
<i>Entamoeba histolytica</i> strain DS4-868	-	<i>Borrelia lusitanae</i>	-	St. Louis Encephalitis Virus	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Borrelia valaisiana</i>	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
Enterovirus 68 and 71	-	<i>Borrelia azfeli</i> strain P-Ko/1984	-	Usutu Virus	-
<i>Giardia intestinalis</i> strain WB clone C6	-	<i>Borrelia bavariensis</i>	-	West Nile virus (NY99, Heja and Ug37)	-
<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Borrelia bisetti</i>	-	Yellow fever virus strain 17D	-
<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	<i>Borrelia burgdorferi</i> strain IRS	-	French Neurotropic Yellow fever virus	-
<i>Helicobacter pylori</i> J99	-	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> strain B31	-	Zika Virus FB-GWUH-2016	-
Human Rotavirus A	-	<i>Borrelia garinii</i> strain type	-	Zika Virus strains African, Asian PF13/251013-18, from French Polynesia (11474/16 and 11468/16)	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Borrelia japonica</i>	-		

¹It was overexpressed in culture and may carry DNA from E. coli. For Adenovirus Type 2, Strain Adenoid 6, the result was confirmed by the commercial kit FTD Neonatal Meningitis.

²It is a synthetic sample in faecal matrix and may carry DNA from E. coli. For Norovirus GI, the positive result for E. coli was confirmed by the commercial kit FTD Neonatal Meningitis.

³Shigella and E. coli share 80-90% of sequence homology and are difficult to distinguish by PCR.

⁴It is a synthetic sample in faecal matrix and may carry DNA from Enterobacter.

Analytical reactivity

The Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I kit's reactivity for Enterobacter was evaluated against extracted DNA from Enterobacter cloacae subs. Cloacae strain CDC 442-68, (as template), showing positive results.

The Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I kit's reactivity for A. baumannii was evaluated against extracted DNA from Acinetobacter baumannii strain 5377, (as template), showing positive results.

The Vitassay qPCR Gram-negative Nosocomial Agents I kit's reactivity for E. coli was evaluated against extracted DNA from the following strains (as template), showing positive results:

Escherichia coli strains 1101362 (which expresses KPC) and 1001728 (which expresses NDM-1)

Escherichia coli expressing IMP, MCR-1, γ CTX-M-15, OXA-1 and TEM-1

Enteroinvasive *Escherichia coli* (which expresses ipaH gene)

Enteropathogenic *Escherichia coli* (which expresses eae gene)

Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, serotype O157:H7

Enterotoxigenic *Escherichia coli* serotipo O25:H42

Compatibles real-time PCR equipment

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

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- NEOS-96 Real-Time PCR System (Linear)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)

¹: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

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 and blood culture and swab samples swabs samples such us biopsy, gluteal swabs, ulcer swabs, wound swabs, tongue swab, joint fluid swab, oral swabs, hair swabs, perineal swab, urethral swab, abscess swabs and ostomy swabs from patients with suspect of bacterial infection and/or multi-resistant infection or colonization by their healthcare professional (HCP), as well as from swab specimens for epidemiological control such us nasal, pharyngeal, rectal swabs, axillary swabs, inguinal swabs, epithelial swabs, colostomy swabs, stoma swab, bronchoalveolar aspirates (BAS), bronchoalveolar lavages (BAL) and sputum specimens. 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; 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 Gram-negative I 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 isolation); c) DNA degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) potential mutations of the target regions of the *Enterobacter*, *A. baumannii* and/or *E. coli* covered by this test which may result in DNA being undetectable 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 vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs 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.
- Detection of DNA may not indicate the presence of viable and/or infectious bacteria or that these are the causative agents for clinical symptoms.
- Negative results do not preclude *Enterobacter*, *A. baumannii* and/or *E. coli* 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.

- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible *Enterobacter*, *A. baumannii* and/or *E. coli* infection, and other bacterial infections and/or multi-resistant infection or colonization 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 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⁾
Special Formats ⁽⁷⁾	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Bio Molecular Systems	DNA-Technology
Mic Real Time PCR Cyclor	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Cepheid	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor ⁽⁸⁾
SmartCycler®	Eppendorf
Qiagen	Mastercycler™ ep realplex
Rotor-Gene® Q	Qiagen
	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/Bibliografia

- Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF and Di Ilio, Carminie. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *International journal of environmental research and public health*. 10(12), 6235-6254.
- Chen HD and Frankel G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS microbiology reviews*. 29(1):83-98.
- 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.
- Gomes T A, Elias WP, Scaletsky IC, Guth BE, Rodrigues JF, Piazza RM, Ferreira LC, and Martinez MB. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian journal of microbiology. Brazilian Society for Microbiology*. 47(Suppl 1):3–30.
- Ibrahim, S., Al-Saryi, N., Al-Kadmy, I., & Aziz, S. N. (2021). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Molecular biology reports*, 48(10), 6987–6998.
- Kaper JB, Nataro JP and Mobley HL. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*. 2(2):123-140.
- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., Cha, C. J., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 55.
- Lupo, A., Haenni, M., & Madec, J. Y. (2018). Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiology spectrum*, 6(3), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0007-2017.
- Meini, S., Tascini, C., Cei, M., Sozio, E., & Rossolini, G. M. (2019). AmpC β -lactamase-producing Enterobacterales: what a clinician should know. *Infection*, 47(3), 363–375.
- Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 6(4), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.
- Sanders, W. E., Jr, & Sanders, C. C. (1997). *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clinical microbiology reviews*, 10(2), 220–241.

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 / Control de cambios		
Version Nº / Versión Nº	Changes / Cambios	Date / Fecha
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