



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Disposición

Número:

Referencia: EX-2022-16386269-APN-DGA#ANMAT

VISTO el N° EX-2022-16386269-APN-DGA#ANMAT del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma **BIOARS S.A.** solicita autorización para la venta de los Productos médicos para diagnóstico *in vitro* denominados **1) VIASURE H. pylori + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit. 2) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit. 3) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit. 4) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit .**

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99.

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico que establece que el producto reúne las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia y corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM de los productos médicos para diagnóstico *in vitro* objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por el Decreto N° 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1°.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) de los productos médicos para diagnóstico *in vitro* denominados: **1) VIASURE H. pylori + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit. 2) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit. 3) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit. 4) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit** de acuerdo con lo solicitado por la firma **BIOARS S.A.** con los Datos Identificatorios Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2°.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulos y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2022-71869243-APN-INPM#ANMAT.

ARTÍCULO 3°.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar

leyenda “Autorizado por la ANMAT PM **1127-423**”, con exclusión de toda otra leyenda no autorizada y/o contemplada en la normativa vigente.

ARTÍCULO 4°.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta disposición.

ARTÍCULO 5°.- Regístrese. Inscríbese en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica a los nuevos productos. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4°. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

NOMBRE COMERCIAL:

1) VIASURE H. pylori + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

2) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit.

3) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit.

4) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

INDICACION DE USO:

1) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit esta diseñado para la identificación y diferenciación específica de *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina (CLR) en biopsias (tejido gástrico) procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección gastrointestinal. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos.

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

3) VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit: esta diseñado para la identificación y diferenciación específica de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensible a metilina (MSSA) y/o *Staphylococci* coagulasa negativa resistente a metilina (MRCoNS) en colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianales humanos en medio sólido cromogénico. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por MRSA en combinación con los signos y síntomas clínicos del paciente y los factores de riesgo epidemiológico. Exclusivamente para uso en diagnóstico de in vitro.

4) VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit esta diseñado para la identificación y diferenciación específica de los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a vancomicina (ERV) en muestras clínicas de pacientes con signos y síntomas de infección bacteriana. El uso previsto del test es facilitar la identificación de organismos resistentes a la vancomicina en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. Exclusivamente para uso en diagnóstico de in vitro.

FORMA DE PRESENTACIÓN:

1) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit. Los kits contienen reactivos suficientes para realizar 36, 48, 72 o 96 pruebas según el formato o el equipamiento a utilizar. Además, por cada una de las presentaciones se encuentra la versión con control interno (CI) o con control de extracción (CE). Son en total 18 formas de presentación diferentes.

Formas de presentación: CI) Con control interno y CE) Con control de extracción.

Para CI y CE):

- 1) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile
- 2) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile
- 3) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile
- 4) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile
- 5) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile

- 6) VIASURE H. pylori + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile
- 7) VIASURE H. pylori + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®
- 8) VIASURE H. pylori + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®
- 9) VIASURE H. pylori + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit (96 determinaciones)

Composición: Todos los productos contienen los mismos componentes, difiriendo solo el soporte de reacción que contiene el reactivo de PCR; pudiendo ser tiras o placa de perfil bajo o alto dependiendo del termociclador (*1: Perfil bajo-Low profile-, 2: perfil alto-High profile-, 3: Rotor-Gene®) o tubos para alicuotar las reacciones en otro soporte.

Forma de Presentación	de Formato Final	Cantidad de reactivo	Número de determinaciones	de Formato Perfil*	del
1) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	48		
3) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	96	Bajo	
5) CI/CE	Placa de pocillos	1 placa de 96 pocillos	96		
2) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	48		
4) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	96	Alto	
6) CI/CE	Placa de pocillos	1 placa de 96 pocillos	96		
7) CI/CE	Tira de pocillos	9 tiras de 4 pocillos	36	Rotor-Gene®	
8) CI/CE	Tira de pocillos	18 tiras de 4 pocillos	72	Rotor-Gene®	
9) CI/CE	Viales (sin soporte)	4 viales para 24 determinaciones cada uno	96	-	

Composición de kits CI:

- *H. pylori* + *Clarithromycin resistance*: Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado.

Composición de kits CE:

- *H. pylori* + *Clarithromycin resistance*: Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado.

- **Extraction Control**: Acido nucleico liofilizado no infeccioso

1 vial

El formato de *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* tanto para CI como para CE son:

1); 2); 3); 4) 8-well strips: 6 o 12 tiras de 8 pocillos según sean 48 o 96 determinaciones.

5); 6) 96-well plate: 1 placa

7); 8) 4-well strips: 9 o 18 tiras de 4 pocillos según sean 36 o 72 determinaciones

9) Reaction-Mix tube: 4 viales

Los kits CI y CE contienen, además:

-*Rehydration Buffer*: Solución para la reconstitución del producto estabilizado.

1) a 9) 1 vial x 1,8 mL

- *H. pylori* + *Clarithromycin resistance Positive Control*: DNA sintético liofilizado no infeccioso.

1) a 9) 1 vial

- *Negative control*: Control negativo

1) a 9) 1 vial x 1 mL

- *Water RNase/DNase free*: Agua libre de RNAsa/DNAsa

1) a 9) 1 vial x 1 mL

- *Tear-off 8-cap strips*:

1); 2) 6 tiras de 8 tapones

3); 4); 5); 6) 12 tiras de 8 tapones

- *4-cap strips*:

7) 9 tiras de 4 tapones

8) 18 tiras de 4 tapones

2) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit: Los kits contienen reactivos suficientes para realizar 8, 24, 36 o 48 pruebas según el formato o el equipamiento a utilizar. Además, por cada una de las presentaciones se encuentra la versión con control interno (CI) o con control de extracción (CE). Son en total 18 formas de presentación diferentes.

Formas de presentación: CI) Con control interno y CE) Con control de extracción.

Para CI y CE):

1) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile

2) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile

3) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile

4) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile

5) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile

6) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile

7) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®

8) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®

9) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions

Composición: Todos los productos contienen los mismos componentes, difiriendo solo el soporte de reacción que

contiene el reactivo de PCR; pudiendo ser tiras de perfil bajo o alto dependiendo del termociclador (*Perfil 1: bajo-Low profile-, 2: perfil alto-High profile-, 3: Rotor-Gene®) o tubos para alicuotar las reacciones en otro soporte.

Forma de Presentación	de Formato Final	Cantidad de reactivo	Número de determinaciones	de Formato Perfil*	del
1) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	24		
3) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	48	Bajo	
5) CI/CE	Tira de pocillos	1 tira de 8 pocillos	8		
2) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	24		
4) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	48	Alto	
6) CI/CE	Tira de pocillos	1 tira de 8 pocillos	8		
7) CI/CE	Tira de pocillos	9 tiras de 4 pocillos	36	Rotor-Gene®	
8) CI/CE	Tira de pocillos	2 tiras de 4 pocillos	8	Rotor-Gene®	
9) CI/CE	Viales (sin soporte)	4 viales para 24 determinaciones cada uno	48	-	

*Dependiendo de las especificaciones del termociclador (1: Perfil bajo, 2: perfil alto, 3: Rotor-Gene®) (Ver Anexo Termocicladores)

Composición de kits CI:

- **Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1:** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado.

- **Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2:** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado.

Composición de kits CE:

- **Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1:** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado.

- **Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2:** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado.

- **Extraction Control:** Acido nucleico liofilizado no infeccioso

Cantidad: 1 vial

El formato de **Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1 y 2 tanto** para CI como para CE son:

- **Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1**

5); 6); 1); 2), 3); 4): 8-well strips: 1, 3 o 6 tiras de 8 pocillos según sean 8, 24 o 48 determinaciones.

7); 8) 4-well strips: 2 o 9 tiras de 4 pocillos según sean 8 o 36 determinaciones.

9) Reaction-Mix tube: 2 viales

- **Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2**

5); 6); 1); 2), 3); 4): 8-well strips: 1, 3 o 6 tiras de 8 pocillos según sean 8, 24 o 48 determinaciones.

7); 8) 4-well strips: 2 o 9 tiras de 4 pocillos según sean 8 o 36 determinaciones.

9) Reaction-Mix tube: 2 viales

Los kits CI y CE contienen, además:

- **Rehydration Buffer:** Solución para la reconstitución del producto estabilizado.

1) a 9): 1 vial x 1,8 mL

- **Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Positive Control:** DNA sintético liofilizado no infeccioso.

1) a 9): 1 vial

- **Negative control:** Control negativo

1) a 9): 1 vial x 1 mL

- **Water RNase/DNase free:** Agua libre de RNAsa/DNAsa

1) a 9): 1 vial x 1 mL

- **Tear-off 8-cap strips:**

1); 2): 6 tiras de 8 tapones

3); 4): 12 tiras de 8 tapones

5); 6): 2 tiras de 8 tapones

- **4-cap strips:**

7): 18 tiras de 4 tapones

8): 4 tiras de 4 tapones

3) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit: Los kits contiene reactivos suficientes para realizar 24, 36, 48 o pruebas según el formato o el equipamiento a utilizar. Además, por cada una de las presentaciones se encuentra la versión con control interno (CI) o con control de extracción (CE). Son en total 18 formas de presentación diferentes.

Formas de presentación: CI) Con control interno y CE) Con control de extracción

Para CI y CE):

1). VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile

2) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile

3) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile

4) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile

5) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®

6) VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit

Composición: Todos los productos contienen los mismos componentes, difiriendo solo el soporte de reacción que contiene el reactivo de PCR; pudiendo ser tiras de perfil bajo o alto dependiendo del termociclador (*Perfil 1: bajo-Low profile-, 2: perfil alto-High profile-, 3: Rotor-Gene®) o tubos para alicuotar las reacciones en otro soporte.

Forma de Presentación	de Formato Final	Cantidad de reactivo	Número de determinaciones	de Formato Perfil*	del
1) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	24		
				Bajo	
3) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	48		
2) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	24		
				Alto	
4) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	48		
5) CI/CE	Tira de pocillos	18 tiras de 4 pocillos	36		Rotor-Gene®
6) CI/CE	Viales soporte)	(sin 4 viales para 24 determinaciones cada 48 uno			-

*Dependiendo de las especificaciones del termociclador (1: Perfil bajo, 2: perfil alto, 3: Rotor-Gene®) (Ver Anexo Termocicladores)

Composición de kits CI:

- ***MRSA 1: SAU + MEC A/C:*** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado.

- ***MRSA 2: ORFX:*** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado.

Composición de kits CE:

- ***MRSA 1: SAU + MEC A/C:*** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado.

- ***MRSA 2: ORFX:*** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado.

- ***Extraction Control:*** Acido nucleico liofilizado no infeccioso

Cantidad: 1 vial

El formato de **MRSA 1: SAU + MEC A/C** y **MRSA 2: ORFX** tanto para CI como para CE son:

- MRSA 1: SAU + MEC A/C

1) a 4): 8-well strips: 3 o 6 tiras de 8 pocillos según sean 24 o 48 determinaciones.

5) 4-well strips: 9 tiras de 4 pocillos para 36 determinaciones.

6): Reaction-Mix tube: 2 viales

- MRSA 2: ORFX

1) a 4): 8-well strips: 3 o 6 tiras de 8 pocillos según sean 24 o 48 determinaciones.

5) 4-well strips: 9 tiras de 4 pocillos para 36 determinaciones.

6): Reaction-Mix tube: 2 viales

Los kits CI y CE contienen, además:

- Rehydration Buffer: Solución para la reconstitución del producto estabilizado.

1) a 6): 1 vial x 1,8 mL

- Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Positive Control: DNA sintético liofilizado no infeccioso.

1) a 6): 1 vial

- Negative control: Control negativo

1) a 6): 1 vial x 1 mL

- Water RNase/DNase free: Agua libre de RNAsa/DNAsa

1) a 6): 1 vial x 1 mL

- Tear-off 8-cap strips:

1); 2): 6 tiras de 8 tapones

3); 4): 12 tiras de 8 tapones

- 4-cap strips:

5): 18 tiras de 4 tapones

4) VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit: Los kits contiene reactivos suficientes para realizar 36, 48, 72 o 96 pruebas según el formato o el equipamiento a utilizar. Además, por cada una de las presentaciones se encuentra la versión con control interno (CI) o con control de extracción (CE). Son en total 18 formas de presentación diferentes.

Formas de presentación: CI) Con control interno y CE) Con control de extracción

Para CI y CE):

- 1) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile
- 2) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile
- 3) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile
- 4) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile
- 5) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile
- 6) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile
- 7) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®
- 8) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®
- 9) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

Composición: Todos los productos contienen los mismos componentes, difiriendo solo el soporte de reacción que contiene el reactivo de PCR; pudiendo ser tiras de perfil bajo o alto dependiendo del termociclador (*Perfil 1: bajo-Low profile-, 2: perfil alto-High profile-, 3: Rotor-Gene®) o tubos para alicuotar las reacciones en otro soporte.

Forma de Presentación	de Formato Final	Cantidad de reactivo	Número de determinaciones	de Formato Perfil*	del
1) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	48	Bajo	
3) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	96		

5) CI/CE	Placa de pocillos	1 placa de 96 pocillos	96	
2) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	48	
4) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	96	Alto
6) CI/CE	Placa de pocillos	1 placa de 96 pocillos	96	
7) CI/CE	Tira de pocillos	9 tiras de 4 pocillos	36	Rotor-Gene®
8) CI/CE	Tira de pocillos	18 tiras de 4 pocillos	72	Rotor-Gene®
9) CI/CE	Viales (sin soporte)	4 viales para 24 determinaciones cada uno	96	-

Composición de kits con CI:

-Vancomycin resistance: Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado.

Composición de kits con CE:

-Vancomycin resistance: Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado.

- Extraction control: Acido nucleico liofilizado no infeccioso

Cantidad: 1 vial x 1 mL

El formato de ***Vancomycin resistance*** tanto para CI como para CE son:

1) a 4): 8-well strips: 6 o 12 tiras de 8 pocillos según sean 48 o 96 determinaciones.

5); 6): 96-well plate: 1 placa

7); 8): 4-well strips: 9 o 18 tiras de 4 pocillos según sean 36 o 72 determinaciones

9): Reaction-Mix tube: 4 viales

Los kits CI y CE contienen, además:

-Rehydration Buffer: Solución para la reconstitución del producto estabilizado.

1) a 9): 1 vial x 1,8 mL

- Vancomycin resistance Positive Control: DNA sintético liofilizado no infeccioso.

1) a 9): 1 vial

- Negative control: Control negativo

1) a 9): 1 vial x 1 mL

- Water RNase/DNase free: Agua libre de RNAsa/DNAsa

1) a 9): 1 vial x 1 mL

- Tear-off 8-cap strips:

1); 2): 48 determinaciones: 6 tiras de 8 tapones

3); 4); 5); 6): 96 determinaciones: 12 tiras de 8 tapones

- 4-cap strips:

7): 9 tiras de 4 tapones

8): 18 tiras de 4 tapones

PERÍODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE PRESENTACIÓN: para 1, 2, 3 y 4: 24 (veinticuatro) meses. Conservado a temperatura entre 2- 40°C.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: CERTEST BIOTEC, S.L., C/J, N°1 POL. IND. RIO GÁLLEGO, SAN MATEO DE GÁLLEGO – 50840 (ZARAGOZA), ESPAÑA.

CONDICIÓN DE VENTA/CATEGORÍA: Venta exclusiva a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO.

N° EX-2022-16386269-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by GARAY Valéria Teresa
Date: 2022.10.13 13:21:57 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.10.13 13:22:07 -03:00

PROYECTO DE ROTULOS EXTERNOS

Nombre del producto

1) VIASURE H. pylori + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit

CI) Con control Interno	CE) Con control de Extracción																																							
1) 6x8 well strips low profile																																								
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT 6x8-well strip - low profile</p> <p>REF VS-CLA106L LOT CLA106L-xxx yyyymm</p> <p>CE IVD zc </p> <p>010843544020695817aammdd10CLA106Lxxx</p> <table style="width: 100%; font-size: small;"> <tr> <td>VS-CLA1SL</td> <td>H. pylori + Clarithromycin resistance 8- well strips</td> <td>6x8- well strip</td> </tr> <tr> <td>VS-RB02</td> <td>Rehydration Buffer</td> <td>1 blue vial</td> </tr> <tr> <td>VS-CLA1C</td> <td>H. pylori + Clarithromycin resistance Positive control</td> <td>1 red vial</td> </tr> <tr> <td>VS-NC1</td> <td>H. pylori + Clarithromycin resistance Negative control</td> <td>1 violet vial</td> </tr> <tr> <td>VS-H2O</td> <td>Water RNase/DNase free</td> <td>1 white vial</td> </tr> <tr> <td>VS-OCS</td> <td>Tear-off 8-cap strips</td> <td>6x8-cap strip</td> </tr> </table> <p style="font-size: x-small;">H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Rio Gállego 3, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA106L v.00</p> </div>	VS-CLA1SL	H. pylori + Clarithromycin resistance 8- well strips	6x8- well strip	VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial	VS-CLA1C	H. pylori + Clarithromycin resistance Positive control	1 red vial	VS-NC1	H. pylori + Clarithromycin resistance Negative control	1 violet vial	VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial	VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT 6x8-well strip - low profile</p> <p>REF VS-CLA106LE LOT CLA106LE-xxx yyyymm</p> <p>CE IVD zc </p> <p>010843544021580617aammdd10CLA106LExxx</p> <table style="width: 100%; font-size: small;"> <tr> <td>VS-1CLA1SL</td> <td>CLA 8- well strips</td> <td>6x8- well strip</td> </tr> <tr> <td>VS-RB02</td> <td>Rehydration Buffer</td> <td>1 blue vial</td> </tr> <tr> <td>VS-CLA1C</td> <td>CLA Positive control</td> <td>1 red vial</td> </tr> <tr> <td>VS-EC01</td> <td>Extraction Control</td> <td>1 green vial</td> </tr> <tr> <td>VS-NC1</td> <td>CLA Negative control</td> <td>1 violet vial</td> </tr> <tr> <td>VS-H2O</td> <td>Water RNase/DNase free</td> <td>1 white vial</td> </tr> <tr> <td>VS-OCS</td> <td>Tear-off 8-cap strips</td> <td>6x8-cap strip</td> </tr> </table> <p style="font-size: x-small;">H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Rio Gállego 3, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA106LE v.00</p> </div>	VS-1CLA1SL	CLA 8- well strips	6x8- well strip	VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial	VS-CLA1C	CLA Positive control	1 red vial	VS-EC01	Extraction Control	1 green vial	VS-NC1	CLA Negative control	1 violet vial	VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial	VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip
VS-CLA1SL	H. pylori + Clarithromycin resistance 8- well strips	6x8- well strip																																						
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial																																						
VS-CLA1C	H. pylori + Clarithromycin resistance Positive control	1 red vial																																						
VS-NC1	H. pylori + Clarithromycin resistance Negative control	1 violet vial																																						
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial																																						
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip																																						
VS-1CLA1SL	CLA 8- well strips	6x8- well strip																																						
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial																																						
VS-CLA1C	CLA Positive control	1 red vial																																						
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial																																						
VS-NC1	CLA Negative control	1 violet vial																																						
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial																																						
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip																																						

2) 6x8 well strips high profile

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT 6x8-well strip - high profile</p> <p>REF VS-CLA106H LOT CLA106H-xxx yyyymm</p> <p>CE IVD zc </p> <p>010843544020696517aammdd10CLA106Hxxx</p> <table style="width: 100%; font-size: small;"> <tr> <td>VS-CLA1SH</td> <td>H. pylori + Clarithromycin resistance 8- well strips</td> <td>6x8- well strip</td> </tr> <tr> <td>VS-RB02</td> <td>Rehydration Buffer</td> <td>1 blue vial</td> </tr> <tr> <td>VS-CLA1C</td> <td>H. pylori + Clarithromycin resistance Positive control</td> <td>1 red vial</td> </tr> <tr> <td>VS-NC1</td> <td>H. pylori + Clarithromycin resistance Negative control</td> <td>1 violet vial</td> </tr> <tr> <td>VS-H2O</td> <td>Water RNase/DNase free</td> <td>1 white vial</td> </tr> <tr> <td>VS-OCS</td> <td>Tear-off 8-cap strips</td> <td>6x8-cap strip</td> </tr> </table> <p style="font-size: x-small;">H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Rio Gállego 3, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA106H v.00</p> </div>	VS-CLA1SH	H. pylori + Clarithromycin resistance 8- well strips	6x8- well strip	VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial	VS-CLA1C	H. pylori + Clarithromycin resistance Positive control	1 red vial	VS-NC1	H. pylori + Clarithromycin resistance Negative control	1 violet vial	VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial	VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT 6x8-well strip - high profile</p> <p>REF VS-CLA106HE LOT CLA106HE-xxx yyyymm</p> <p>CE IVD zc </p> <p>010843544021583717aammdd10CLA106HExxx</p> <table style="width: 100%; font-size: small;"> <tr> <td>VS-1CLA1SH</td> <td>CLA 8- well strips</td> <td>6x8- well strip</td> </tr> <tr> <td>VS-RB02</td> <td>Rehydration Buffer</td> <td>1 blue vial</td> </tr> <tr> <td>VS-CLA1C</td> <td>CLA Positive control</td> <td>1 red vial</td> </tr> <tr> <td>VS-EC01</td> <td>Extraction Control</td> <td>1 green vial</td> </tr> <tr> <td>VS-NC1</td> <td>CLA Negative control</td> <td>1 violet vial</td> </tr> <tr> <td>VS-H2O</td> <td>Water RNase/DNase free</td> <td>1 white vial</td> </tr> <tr> <td>VS-OCS</td> <td>Tear-off 8-cap strips</td> <td>6x8-cap strip</td> </tr> </table> <p style="font-size: x-small;">H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Rio Gállego 3, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA106HE v.00</p> </div>	VS-1CLA1SH	CLA 8- well strips	6x8- well strip	VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial	VS-CLA1C	CLA Positive control	1 red vial	VS-EC01	Extraction Control	1 green vial	VS-NC1	CLA Negative control	1 violet vial	VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial	VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip
VS-CLA1SH	H. pylori + Clarithromycin resistance 8- well strips	6x8- well strip																																						
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial																																						
VS-CLA1C	H. pylori + Clarithromycin resistance Positive control	1 red vial																																						
VS-NC1	H. pylori + Clarithromycin resistance Negative control	1 violet vial																																						
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial																																						
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip																																						
VS-1CLA1SH	CLA 8- well strips	6x8- well strip																																						
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial																																						
VS-CLA1C	CLA Positive control	1 red vial																																						
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial																																						
VS-NC1	CLA Negative control	1 violet vial																																						
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial																																						
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip																																						

3) 12x8 well strips low profile

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT 12x8-well strip - low profile</p> <p>REF VS-CLA112L LOT CLA112L-xxx yyyymm</p> <p>CE IVD zc </p> <p>010843544020697217aammdd10CLA112Lxxx</p> <table style="width: 100%; font-size: small;"> <tr> <td>VS-CLA1SL</td> <td>H. pylori + Clarithromycin resistance 8- well strips</td> <td>12x8 well strip</td> </tr> <tr> <td>VS-RB02</td> <td>Rehydration Buffer</td> <td>1 blue vial</td> </tr> <tr> <td>VS-CLA1C</td> <td>H. pylori + Clarithromycin resistance Positive control</td> <td>1 red vial</td> </tr> <tr> <td>VS-NC1</td> <td>H. pylori + Clarithromycin resistance Negative control</td> <td>1 violet vial</td> </tr> <tr> <td>VS-H2O</td> <td>Water RNase/DNase free</td> <td>1 white vial</td> </tr> <tr> <td>VS-OCS</td> <td>Tear-off 8-cap strips</td> <td>12x8-cap strip</td> </tr> </table> <p style="font-size: x-small;">H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Rio Gállego 3, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA112L v.00</p> </div>	VS-CLA1SL	H. pylori + Clarithromycin resistance 8- well strips	12x8 well strip	VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial	VS-CLA1C	H. pylori + Clarithromycin resistance Positive control	1 red vial	VS-NC1	H. pylori + Clarithromycin resistance Negative control	1 violet vial	VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial	VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT 12x8-well strip - low profile</p> <p>REF VS-CLA112LE LOT CLA112LE-xxx yyyymm</p> <p>CE IVD zc </p> <p>010843544021581317aammdd10CLA112LExxx</p> <table style="width: 100%; font-size: small;"> <tr> <td>VS-1CLA1SL</td> <td>CLA 8- well strips</td> <td>12x8- well strip</td> </tr> <tr> <td>VS-RB02</td> <td>Rehydration Buffer</td> <td>1 blue vial</td> </tr> <tr> <td>VS-CLA1C</td> <td>CLA Positive control</td> <td>1 red vial</td> </tr> <tr> <td>VS-EC01</td> <td>Extraction Control</td> <td>1 green vial</td> </tr> <tr> <td>VS-NC1</td> <td>CLA Negative control</td> <td>1 violet vial</td> </tr> <tr> <td>VS-H2O</td> <td>Water RNase/DNase free</td> <td>1 white vial</td> </tr> <tr> <td>VS-OCS</td> <td>Tear-off 8-cap strips</td> <td>12x8-cap strip</td> </tr> </table> <p style="font-size: x-small;">H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Rio Gállego 3, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA112LE v.00</p> </div>	VS-1CLA1SL	CLA 8- well strips	12x8- well strip	VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial	VS-CLA1C	CLA Positive control	1 red vial	VS-EC01	Extraction Control	1 green vial	VS-NC1	CLA Negative control	1 violet vial	VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial	VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip
VS-CLA1SL	H. pylori + Clarithromycin resistance 8- well strips	12x8 well strip																																						
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial																																						
VS-CLA1C	H. pylori + Clarithromycin resistance Positive control	1 red vial																																						
VS-NC1	H. pylori + Clarithromycin resistance Negative control	1 violet vial																																						
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial																																						
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip																																						
VS-1CLA1SL	CLA 8- well strips	12x8- well strip																																						
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial																																						
VS-CLA1C	CLA Positive control	1 red vial																																						
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial																																						
VS-NC1	CLA Negative control	1 violet vial																																						
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial																																						
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip																																						

BIOTARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidenta

BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
 DIRECTOR TÉCNICO

4) 12x8 well strips high profile

H. pylori + Clarithromycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
12x8-well strip - high profile

REF VS-CLA112H LOT CLA112H-xxx yyyymm

CE IVD 96

010843544020688917aammd10CLA112Hxxx

VS-CLA1SH	H. pylori + Clarithromycin resistance B- well strips	12x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-CLA1C	H. pylori + Clarithromycin resistance Positive control	1 red vial
VS-NC1	H. pylori + Clarithromycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA112H v.00

H. pylori + Clarithromycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
12x8-well strip - high profile

REF VS-CLA112HE LOT CLA112HE-xxx yyyymm

CE IVD 96

010843544021584417aammd10CLA112HExxx

VS-1CLA1SH	CLA 8- well strips	12x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-CLA1C	CLA Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	CLA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA112HE v.00

5) 96 well plate low profile

H. pylori + Clarithromycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
96-well plate - low profile

REF VS-CLA113L LOT CLA113L-xxx yyyymm

CE IVD 96

010843544020699617aammd10CLA113Lxxx

VS-CLA1PL	H. pylori + Clarithromycin resistance 96-well plate	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-CLA1C	H. pylori + Clarithromycin resistance Positive control	1 red vial
VS-NC1	H. pylori + Clarithromycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA113L v.00

H. pylori + Clarithromycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
96-well plate - low profile

REF VS-CLA113LE LOT CLA113LE-xxx yyyymm

CE IVD 96

010843544021582017aammd10CLA113LExxx

VS-1CLA1PL	CLA 96-well plate	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-CLA1C	CLA Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	CLA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA113LE v.00

6) 96 well plate high profile

H. pylori + Clarithromycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
96-well plate - high profile

REF VS-CLA113H LOT CLA113H-xxx yyyymm

CE IVD 96

010843544020700917aammd10CLA113Hxxx

VS-CLA1PH	H. pylori + Clarithromycin resistance 96 - well plate	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-CLA1C	H. pylori + Clarithromycin resistance Positive control	1 red vial
VS-NC1	H. pylori + Clarithromycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA113H v.00

H. pylori + Clarithromycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
96-well plate - high profile

REF VS-CLA113HE LOT CLA113HE-xxx yyyymm

CE IVD 96

010843544021585117aammd10CLA113HExxx

VS-1CLA1PH	CLA 96-well plate	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-CLA1C	CLA Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	CLA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA113HE v.00

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Echevés
Presidente

BIO DATA S.A.
BIO CLAUDIA TICHEVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

7) 9x4 well strips Rotor Gene

H. pylori + Clarithromycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
9x4-well strip

REF VS-CLA136 LOT CLA136-xxx yyyy-mm

IVD CE 36

010843544021175417yyymmdd10CLA136Exxx

VS-CLA1RG	H. pylori + Clarithromycin resistance 4-well strips	9x4 well-strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-CLA1C	H. pylori + Clarithromycin resistance Positive control	1 red vial
VS-NC1	H. pylori + Clarithromycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS-RG	Tear-off 8-cap strips	9x4-cap strip

H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA136 v.00

H. pylori + Clarithromycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
9x4-well strip

REF VS-CLA136E LOT CLA136E-xxx yyyy-mm

IVD CE 36

010843544022135317yyymmdd10CLA136Exxx

VS-1CLA1RG	CLA 4-well strips	9x4 well-strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-CLA1C	CLA Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	CLA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS-RG	4-cap strips	9x4-cap strip

H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA136E v.00

8) 18x4 well strips Rotor Gene

H. pylori + Clarithromycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
18x4-well strip

REF VS-CLA172 LOT CLA172-xxx yyyy-mm

IVD CE 72

010843544021176117yyymmdd10CLA172Exxx

VS-CLA1RG	H. pylori + Clarithromycin resistance 4-well strips	18x4 well-strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-CLA1C	H. pylori + Clarithromycin resistance Positive control	1 red vial
VS-NC1	H. pylori + Clarithromycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS-RG	Tear-off 8-cap strips	18x4-cap strip

H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA172 v.00

H. pylori + Clarithromycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
18x4-well strip

REF VS-CLA172E LOT CLA172E-xxx yyyy-mm

IVD CE 72

010843544022160917yyymmdd10CLA172Exxx

VS-1CLA1RG	CLA 4-well strips	18x4 well-strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-CLA1C	CLA Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	CLA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS-RG	4-cap strips	18x4-cap strip

H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA172E v.00

9) Viales de reacción

H. pylori + Clarithromycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
4 tubes x 24 reactions

REF VS-CLA196T LOT CLA196T-xxx yyyy-mm

CE IVD 96

010843544021523317yyymmdd10CLA196TExxx

VS-CLA1TB	CLA Reaction-Mix tubes	4 white vials
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-CLA1C	CLA Positive control	1 red vial
VS-NC1	CLA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial

H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA196T v.00

H. pylori + Clarithromycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
4 tubes x 24 reactions

REF VS-CLA196TE LOT CLA196TE-xxx yyyy-mm

CE IVD 96

010843544021499117yyymmdd10CLA196TEExxx

VS-1CLA1TB	CLA Reaction-Mix tubes	4 white vials
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-CLA1C	CLA Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	CLA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial

H. pylori + Clarithromycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CLA196TE v.00

Patricia del Carmen Etchevès

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidenta

Claudia Etchevès

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

2) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit

CI) Con control Interno CE) Con control de Extracción

1) 6x8 well strips low profile

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile

CE IVD 24 40°C certest.es/viasure/labeling

REF VS-CPE106L LOT CPE106L-XXX yyy-mm

UDI

3 x CA1 8-well strips
3 x CA2 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
6 x Tear-off 8-cap strips

(01)08435440216513
(17)991231
(10)CPE106L000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE106L v.00

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile

CE IVD 24 40°C certest.es/viasure/labeling

REF VS-CPE106LE LOT CPE106LE-XXX yyy-mm

UDI

3 x CA1 8-well strips
3 x CA2 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
6 x Tear-off 8-cap strips

(01)08435440216605
(17)991231
(10)CPE106LE000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE106LE v.00

2) 6x8 well strips high profile

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, High Profile

CE IVD 24 40°C certest.es/viasure/labeling

REF VS-CPE106H LOT CPE106H-XXX yyy-mm

UDI

3 x CA1 8-well strips
3 x CA2 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
6 x Tear-off 8-cap strips

(01)08435440216506
(17)991231
(10)CPE106H000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE106H v.00

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, High Profile

CE IVD 24 40°C certest.es/viasure/labeling

REF VS-CPE106HE LOT CPE106HE-XXX yyy-mm

UDI

3 x CA1 8-well strips
3 x CA2 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
6 x Tear-off 8-cap strips

(01)08435440216599
(17)991231
(10)CPE106HE000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE106HE v.00

3) 12x8 well strips low profile

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile

CE IVD 48 40°C certest.es/viasure/labeling

REF VS-CPE112L LOT CPE112L-XXX yyy-mm

UDI

6 x CA1 8-well strips
6 x CA2 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips

(01)08435440216537
(17)991231
(10)CPE112L000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE112L v.00

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile

CE IVD 48 40°C certest.es/viasure/labeling

REF VS-CPE112LE LOT CPE112LE-XXX yyy-mm

UDI

6 x CA1 8-well strips
6 x CA2 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips

(01)08435440216629
(17)991231
(10)CPE112LE000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE112LE v.00

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

4) 12x8 well strips high profile

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, High Profile

CE IVD 48 40°C certest.es/
viasure/labeling

REF VS-CPE112H LOT CPE112H-XXX yyyy-mm

6 x CA1 8-well strips
6 x CA2 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips

UDI
(01)08435440216520
(17)991231
(10)CPE112H000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE112H v.00

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, High Profile

CE IVD 48 40°C certest.es/
viasure/labeling

REF VS-CPE112HE LOT CPE112HE-XXX yyyy-mm

6 x CA1 8-well strips
6 x CA2 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips

UDI
(01)08435440216612
(17)991231
(10)CPE112HE000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE112HE v.00

5) 1x8 well strips low profile

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile

CE IVD 8 40°C certest.es/
viasure/labeling

REF VS-CPE101L LOT CPE101L-XXX yyyy-mm

1 x CA1 8-well strips
1 x CA2 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
2 x Tear-off 8-cap strips

UDI
(01)08435440216575
(17)991231
(10)CPE101L000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE101L v.00

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile

CE IVD 8 40°C certest.es/
viasure/labeling

REF VS-CPE101LE LOT CPE101LE-XXX yyyy-mm

1 x CA1 8-well strips
1 x CA2 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
2 x Tear-off 8-cap strips

UDI
(01)08435440216687
(17)991231
(10)CPE101LE000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE101LE v.00

6) 1x8 well strips high profile

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, High Profile

CE IVD 8 40°C certest.es/
viasure/labeling

REF VS-CPE101H LOT CPE101H-XXX yyyy-mm

1 x CA1 8-well strips
1 x CA2 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
2 x Tear-off 8-cap strips

UDI
(01)08435440216588
(17)991231
(10)CPE101H000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE101H v.00

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, High Profile

CE IVD 8 40°C certest.es/
viasure/labeling

REF VS-CPE101HE LOT CPE101HE-XXX yyyy-mm

1 x CA1 8-well strips
1 x CA2 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
2 x Tear-off 8-cap strips

UDI
(01)08435440216650
(17)991231
(10)CPE101HE000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE101HE v.00

Handwritten signature
BIOARS S.A.
BIOO. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

Handwritten signature
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidenta

7) 9x4 well strips Rotor Gene

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, Rotor-Gene

CE IVD 36 2°C certest.es/
viasure/labeling

REF VS-CPE136 LOT CPE136-XXX yyyy-mm

9 x CA1 4-well strips
9 x CA2 4-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
18 x Tear-off 4-cap strips

UDI
(01)08435440216551
(17)991231
(10)CPE136000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE136 v.00

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, Rotor-Gene

CE IVD 36 2°C certest.es/
viasure/labeling

REF VS-CPE136E LOT CPE136E-XXX yyyy-mm

9 x CA1 4-well strips
9 x CA2 4-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
18 x Tear-off 4-cap strips

UDI
(01)08435440216643
(17)991231
(10)CPE136E000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE136E v.00

8) 2x4 well strips Rotor Gene

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, Rotor-Gene

CE IVD 8 2°C certest.es/
viasure/labeling

REF VS-CPE101 LOT CPE101-XXX yyyy-mm

2 x CA1 4-well strips
2 x CA2 4-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
4 x Tear-off 4-cap strips

UDI
(01)08435440216582
(17)991231
(10)CPE101000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE101 v.00

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, Rotor-Gene

CE IVD 8 2°C certest.es/
viasure/labeling

REF VS-CPE101E LOT CPE101E-XXX yyyy-mm

2 x CA1 4-well strips
2 x CA2 4-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
4 x Tear-off 4-cap strips

UDI
(01)08435440216674
(17)991231
(10)CPE101E000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE101E v.00

9) Viales de reacción

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, Tube Format

CE IVD 48 2°C certest.es/
viasure/labeling

REF VS-CPE148T LOT CPE148T-XXX yyyy-mm

2 x CA1 Reaction-Mix tubes
2 x CA2 Reaction-Mix tubes
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)

UDI
(01)08435440216544
(17)991231
(10)CPE148T000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE148T v.00

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
Real Time PCR Detection Kit, Tube Format

CE IVD 48 2°C certest.es/
viasure/labeling

REF VS-CPE148TE LOT CPE148TE-XXX yyyy-mm

2 x CA1 Reaction-Mix tubes
2 x CA2 Reaction-Mix tubes
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)

UDI
(01)08435440216636
(17)991231
(10)CPE148TE000

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-CPE148TE v.00

Handwritten signature

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcnevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOG. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

3) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit

CI) Con control Interno CE) Con control de Extracción

1) 6x8 well strips low profile

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
REAL TIME PCR DETECTION KIT
6x8-well strip - low profile

REF VS-MSA106L LOT MSA106L-xxx yyy-yy-mm

CE IVD 40°C 24

010843544021167917aamddd10MSA106Lxxxxyy

VS-MR11SL	MRSA 1: SAU + MEC A/C 8- well strips	3x8-well strip
VS-MR21SL	MRSA 2: ORFX 8- well strips	3x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-MSA1C	MSA Positive control	1 red vial
VS-NC1	MSA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-MSA106L v.00

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
REAL TIME PCR DETECTION KIT
6x8-well strip - low profile

REF VS-MSA106LE LOT MSA106LE-xxx yyy-yy-mm

CE IVD 40°C 24

010843544022142617aamddd10MSA106LExxxxyy

VS-1MR11SL	MRSA 1: SAU + MEC A/C 8- well strips	3x8-well strip
VS-1MR21SL	MRSA 2: ORFX 8- well strips	3x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-MSA1C	MSA Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	MSA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-MSA106LE v.00

2) 6x8 well strips high profile

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
REAL TIME PCR DETECTION KIT
6x8-well strip - high profile

REF VS-MSA106H LOT MSA106H-xxx yyy-yy-mm

CE IVD 40°C 24

010843544021169317aamddd10MSA106Hxxxxyy

VS-MR11SH	MRSA 1: SAU + MEC A/C 8- well strips	3x8-well strip
VS-MR21SH	MRSA 2: ORFX 8- well strips	3x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-MSA1C	MSA Positive control	1 red vial
VS-NC1	MSA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-MSA106H v.00

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
REAL TIME PCR DETECTION KIT
6x8-well strip - high profile

REF VS-MSA106HE LOT MSA106HE-xxx yyy-yy-mm

CE IVD 40°C 24

010843544020256417aamddd10MSA106HExxxxyy

VS-1MR11SH	MRSA 1: SAU + MEC A/C 8- well strips	3x8-well strip
VS-1MR21SH	MRSA 2: ORFX 8- well strips	3x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-MSA1C	MSA Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	MSA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-MSA106HE v.00

3) 12x8 well strips low profile

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
REAL TIME PCR DETECTION KIT
12x8-well strip - low profile

REF VS-MSA112L LOT MSA112L-xxx yyy-yy-mm

CE IVD 40°C 48

010843544021168617aamddd10MSA112Lxxxxyy

VS-MR11SL	MRSA 1: SAU + MEC A/C 8- well strips	6x8-well strip
VS-MR21SL	MRSA 2: ORFX 8- well strips	6x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-MSA1C	MSA Positive control	1 red vial
VS-NC1	MSA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-MSA112L v.00

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
REAL TIME PCR DETECTION KIT
12x8-well strip - low profile

REF VS-MSA112LE LOT MSA112LE-xxx yyy-yy-mm

CE IVD 40°C 48

010843544022144917aamddd10MSA112LExxxxyy

VS-1MR11SH	MRSA 1: SAU + MEC A/C 8- well strips	6x8-well strip
VS-1MR21SH	MRSA 2: ORFX 8- well strips	6x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-MSA1C	MSA Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	MSA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Rio Gállego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-MSA112LE v.00

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Echevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ECHEVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

4) 12x8 well strips high profile

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
REAL TIME PCR DETECTION KIT
12x8-well strip - high profile

REF VS-MSA112H LOT MSA112H-xxx yyyymm

CE IVD

010843544021170917aammdd10MSA112Hxxx

VS-MR11SH	MRSA 1: SAU + MEC A/C 8- well strips	6x8-well strip
VS-MR21SH	MRSA 2: ORFX 8- well strips	6x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-MSA1C	MSA Positive control	1 red vial
VS-NC1	MSA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNAse free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gallego 8, Calle J, Nº 1, 50842 San Mateo de Gallego, Zaragoza (SPAIN) VS-MSA112H v.00

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
REAL TIME PCR DETECTION KIT
12x8-well strip - high profile

REF VS-MSA112HE LOT MSA112HE-xxx yyyymm

CE IVD

010843544022145617aammdd10MSA112HExxx

VS-1MR11SH	MRSA 1: SAU + MEC A/C 8- well strips	6x8-well strip
VS-1MR21SH	MRSA 2: ORFX 8- well strips	6x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-MSA1C	MSA Positive control	1 red vial
VS-EC01	MSA Negative control	1 green vial
VS-NC1	MSA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNAse free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gallego 8, Calle J, Nº 1, 50842 San Mateo de Gallego, Zaragoza (SPAIN) VS-MSA112HE v.00

5) 18x4 well strips Rotor Gene

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
REAL TIME PCR DETECTION KIT
18x4-well strip

REF VS-MSA136 LOT MSA136-xxx yyyymm

CE IVD

010943544021171617aammdd10MSA136xxx

VS-MR11RG	MRSA 1: SAU + MEC A/C 4- well strips	9x4-well strip
VS-MR21RG	MRSA 2: ORFX 4- well strips	9x4-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-MSA1C	MSA Positive control	1 red vial
VS-NC1	MSA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNAse free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	18x4-cap strip

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gallego 8, Calle J, Nº 1, 50842 San Mateo de Gallego, Zaragoza (SPAIN) VS-MSA136 v.00

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
REAL TIME PCR DETECTION KIT
18x4-well strip

REF VS-MSA136E LOT MSA136E-xxx yyyymm

IVD CE

010843544022944517yyymmdd10MSA136Exxx

VS-1MR11RG	MRSA 1 4-well strips	9x4 well-strip
VS-1MR21RG	MRSA 2 4-well strips	9x4 well-strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-MSA1C	MSA Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	MSA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNAse free	1 white vial
VS-OCS-RG	4-cap strips	18x4-cap strip

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gallego 8, Calle J, Nº 1, 50842 San Mateo de Gallego, Zaragoza (SPAIN) VS-MSA136E v.00

6) Viales de reacción

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
REAL TIME PCR DETECTION KIT
4 tubes x 24 reactions

REF VS-MSA148T LOT MSA148T-xxx yyyymm

CE IVD

010843544022195517yyymmdd10MSA148Txxx

VS-MR11TB	MRSA 1: SAU + MEC A/C Reaction-Mix tube	2 white vials
VS-MR21TB	MRSA 2: ORFX Reaction-Mix tube	2 white vials
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-MSA1C	MSA Positive control	1 red vial
VS-NC1	MSA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNAse free	1 white vial

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gallego 8, Calle J, Nº 1, 50842 San Mateo de Gallego, Zaragoza (SPAIN) VS-MSA148T v.00

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
REAL TIME PCR DETECTION KIT
4 tubes x 24 reactions

REF VS-MSA148TE LOT MSA148TE-xxx yyyymm

CE IVD

010843544021410817yyymmdd10MSA148TExxx

VS-1MR11TB	MRSA 1: SAU + MEC A/C Reaction-Mix tube	2 white vials
VS-1MR21TB	MRSA 2: ORFX Reaction-Mix tube	2 white vials
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-MSA1C	MSA Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	MSA Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNAse free	1 white vial

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gallego 8, Calle J, Nº 1, 50842 San Mateo de Gallego, Zaragoza (SPAIN) VS-MSA148TE v.00

[Handwritten signature]

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta

[Handwritten signature]
BIOARS S.A.
D.O. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

4) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

CI) Con control Interno CE) Con control de Extracción

1) 6x8 well strips low profile

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
6x8-well strip - low profile

REF VS-VAN106L LOT VAN106L-xxx yyy-mm

CE IVD zc

010843544020837217aamdd10VAN106Lxxx

VS-VAN1SL	Vancomycin resistance 8- well strips	6x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN106L v.00

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
6x8-well strip - low profile

REF VS-VAN106LE LOT VAN106LE-xxx yyy-mm

CE IVD zc

010843544022138417aamdd10VAN106LExxx

VS-1VAN1SL	Vancomycin resistance 8- well strips	6x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN106LE v.00

2) 6x8 well strips high profile

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
6x8-well strip - high profile

REF VS-VAN106H LOT VAN106H-xxx yyy-mm

CE IVD zc

010843544020836917aamdd10VAN106Hxxx

VS-VAN1SH	Vancomycin resistance 8- well strips	6x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN106H v.00

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
6x8-well strip - high profile

REF VS-VAN106HE LOT VAN106HE-xxx yyy-mm

CE IVD zc

010843544022137117aamdd10VAN106HExxx

VS-1VAN1SH	Vancomycin resistance 8- well strips	6x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	6x8-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN106HE v.00

3) 12x8 well strips low profile

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
12x8-well strip - low profile

REF VS-VAN112L LOT VAN112L-xxx yyy-mm

CE IVD zc

010843544020839517aamdd10VAN112Lxxx

VS-VAN1SL	Vancomycin resistance 8- well strips	12x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN112L v.00

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
12x8-well strip - low profile

REF VS-VAN112LE LOT VAN112LE-xxx yyy-mm

CE IVD zc

010843544022138817aamdd10VAN112LExxx

VS-1VAN1SL	Vancomycin resistance 8- well strips	12x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN112LE v.00

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta

BIOARS S.A.
BIOG. CLAUDIA ETCHEVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

4) 12x8 well strips high profile

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
12x8-well strip - high profile

REF VS-VAN112H LOT VAN112H-xxx yyyymm

CE IVD 40°C 96

010843544020840217aamddd10VAN112Hxxx

VS-VAN1SH	Vancomycin resistance 8- well strips	12x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gallego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gallego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN112H v.00

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
12x8-well strip - high profile

REF VS-VAN112HE LOT VAN112HE-xxx yyyymm

CE IVD 40°C 96

010843544022139517aamddd10VAN112HExxx

VS-1VAN1SH	Vancomycin resistance 8- well strips	12x8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gallego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gallego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN112HE v.00

5) 96 well plate low profile

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
96-well plate - low profile

REF VS-VAN113L LOT VAN113L-xxx yyyymm

CE IVD 40°C 96

010843544020841517aamddd10VAN113Lxxx

VS-VAN1PL	Vancomycin resistance 96-well plate	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gallego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gallego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN113L v.00

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
96-well plate - low profile

REF VS-VAN113LE LOT VAN113LE-xxx yyyymm

CE IVD 40°C 96

010843544022140117aamddd10VAN113LExxx

VS-1VAN1PL	Vancomycin resistance 96- well plate	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gallego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gallego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN113LE v.00

6) 96 well plate high profile

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
96-well plate - high profile

REF VS-VAN113H LOT VAN113H-xxx yyyymm

CE IVD 40°C 96

010843544020842617aamddd10VAN113Hxxx

VS-VAN1PH	Vancomycin resistance 96-well plate	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gallego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gallego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN113H v.00

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
96-well plate - high profile

REF VS-VAN113HE LOT VAN113HE-xxx yyyymm

CE IVD 40°C 96

010843544022141817aamddd10VAN113HExxx

VS-1VAN1PH	Vancomycin resistance 96- well plate	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	12x8-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gallego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gallego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN113HE v.00

7) 9x4 well strips Rotor Gene

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
9x4-well strip

REF VS-VAN136 LOT VAN136-xxx yyyymm

IVD CE 40°C 36

010843544022945217yyymmdd10VAN136xxx

VS-VAN1RG	Vancomycin resistance 4-well strips	9x4 well-strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS-RG	4-cap strips	9x4-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gallego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gallego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN136 v.00

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
9x4-well strip

REF VS-VAN136E LOT VAN136E-xxx yyyymm

IVD CE 40°C 36

010843544022946317yyymmdd10VAN136Exxx

VS-1VAN1RG	Vancomycin resistance 4-well strips	9x4 well-strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNase free	1 white vial
VS-OCS-RG	4-cap strips	9x4-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Rio Gallego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gallego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN136E v.00

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente

CLAUDIA ETCHÉVEZ
DIRECTOR TÉCNICO

8) 18x4 well strips Rotor Gene

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
18x4-well strip

REF VS-VAN172 LOT VAN172-xxx yyyymm

IVD CE 72

010843544022947617yyymmdd10VAN172xxx

VS-VAN1RG	Vancomycin resistance 4-well strips	18x4 well-strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNAse free	1 white vial
VS-OCS-RG	Tear-off 8-cap strips	18x4-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN172 v.00

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
18x4-well strip

REF VS-VAN172E LOT VAN172E-xxx yyyymm

IVD CE 72

010843544022948317yyymmdd10VAN172Exxx

VS-1VAN1RG	Vancomycin resistance 4-well strips	18x4 well-strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNAse free	1 white vial
VS-OCS-RG	4-cap strips	18x4-cap strip

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN172E v.00

9) Viales de reacción

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
4 tubes x 24 reactions

REF VS-VAN196T LOT VAN196T-xxx yyyymm

CE IVD 96

010843544021636017aaammdd10VAN196Txxx

VS-VAN1TB	Vancomycin resistance Reaction-Mix tube	4 white vials
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNAse free	1 white vial

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN196T v.00

Vancomycin resistance
REAL TIME PCR DETECTION KIT
4 tubes x 24 reactions

REF VS-VAN196TE LOT VAN196TE-xxx yyyymm

CE IVD 96

010843544021629217yyymmdd10VAN196TExxx

VS-1VAN1TB	Vancomycin resistance Reaction-Mix tube	4 white vials
VS-RB02	Rehydration Buffer	1 blue vial
VS-VAN1C	Vancomycin resistance Positive control	1 red vial
VS-EC01	Extraction Control	1 green vial
VS-NC1	Vancomycin resistance Negative control	1 violet vial
VS-H2O	Water RNase/DNAse free	1 white vial

Vancomycin resistance REAL TIME PCR DETECTION KIT
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego 8, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-VAN196TE v.00

Claudia Etchevés
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

Patricia del Carmen Etchevés
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta

PROYECTO DE ROTULOS INTERNOS

Nombre del producto

1) VIASURE H. pylori + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit

C) Con Control Interno.

Low profile

Tira de pocillos – Sobre de aluminio	Placa – Sobre de aluminio

High Profile

Tira de pocillos – Sobre de aluminio	Placa – Sobre de aluminio

Perfil para instrumentos Rotor-Gene

Tira de pocillos – Sobre de aluminio

Tubo de reacción

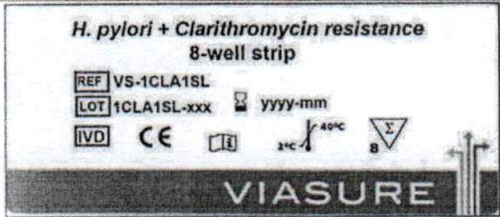

Tubo de reacción – Sobre de aluminio	Tubo de reacción - Tubo

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



[Signature]
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVEZ
DIRECTOR TÉCNICO

CE) Con Control de Extracción


Low Profile

<p>Tira de pocillos – Sobre de aluminio</p> 	<p>Placa – Sobre de aluminio</p> 
---	---

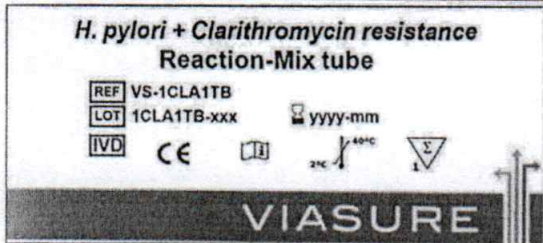
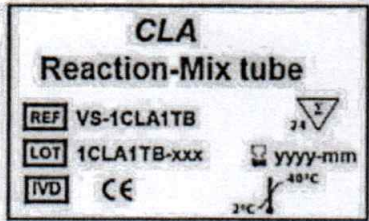
High Profile

<p>Tira de pocillos – Sobre de aluminio</p> 	<p>Placa – Sobre de aluminio</p> 
---	---

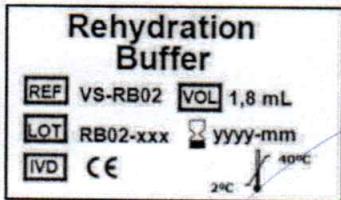
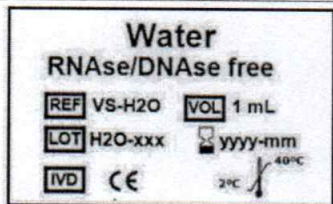
Perfil para instrumentos Rotor-Gene

<p>Tira de pocillos – Sobre de aluminio</p> 

Tubo de reacción

<p>Tubo de reacción – Sobre de aluminio</p> 	<p>Tubo de reacción - Tubo</p> 
---	---

CI) y CE) Componentes comunes a todas las presentaciones

<p>Tampón de rehidratación - Tubo</p> 	<p>Agua libre de RNAasa/DNAasa - Tubo</p> 
---	--

BIOARS S.
Patricia del Carmen Etcheve
Presidente

BIOL. CLAUDIA ETCHÉVEZ
DIRECTOR TÉCNICO

<p>Control negativo - Tubo</p> <div data-bbox="227 161 666 385" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Negative Control</p> <p>REF VS-NC1 VOL 1 mL</p> <p>LOT NC1-xxx yyyy-mm</p> <p>IVD CE</p> <p>20°C 40°C</p> </div>	<p>Control positivo - Sobre de aluminio</p> <div data-bbox="846 161 1403 407" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p><i>H. pylori + Clarithromycin resistance</i> Positive Control</p> <p>REF VS-CLA1C</p> <p>LOT CLA1C-xxx yyyy-mm</p> <p>IVD CE</p> <p>20°C 40°C</p> <p>CAUTION Do not open in pre-PCR environment</p> <p>VIASURE</p> </div>
<p>Control positivo - Tubo</p> <div data-bbox="180 488 588 712" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p><i>H. pylori + Clarithromycin resistance</i> Positive Control</p> <p>REF VS-CLA1C</p> <p>LOT CLA1C-xxx yyyy-mm</p> <p>IVD CE</p> <p>20°C 40°C</p> </div>	

Exclusivo de CE) Componente Control de extracción (incluido solo en las presentaciones mencionadas en CE, "con control de extracción")

<p>Control de extracción - Sobre de aluminio</p> <div data-bbox="175 913 708 1153" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Extraction Control</p> <p>REF VS-EC01</p> <p>LOT EC01-xxx yyyy-mm</p> <p>IVD CE</p> <p>20°C 40°C</p> <p>CAUTION Open and rehydrate in pre-PCR area away from the Positive Control</p> <p>VIASURE</p> </div>	<p>Control de extracción - Tubo</p> <div data-bbox="953 922 1288 1124" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Extraction Control</p> <p>REF VS-EC01</p> <p>LOT EC01-xxx yyyy-mm</p> <p>IVD CE</p> <p>20°C 40°C</p> </div>
---	--

[Handwritten Signature]

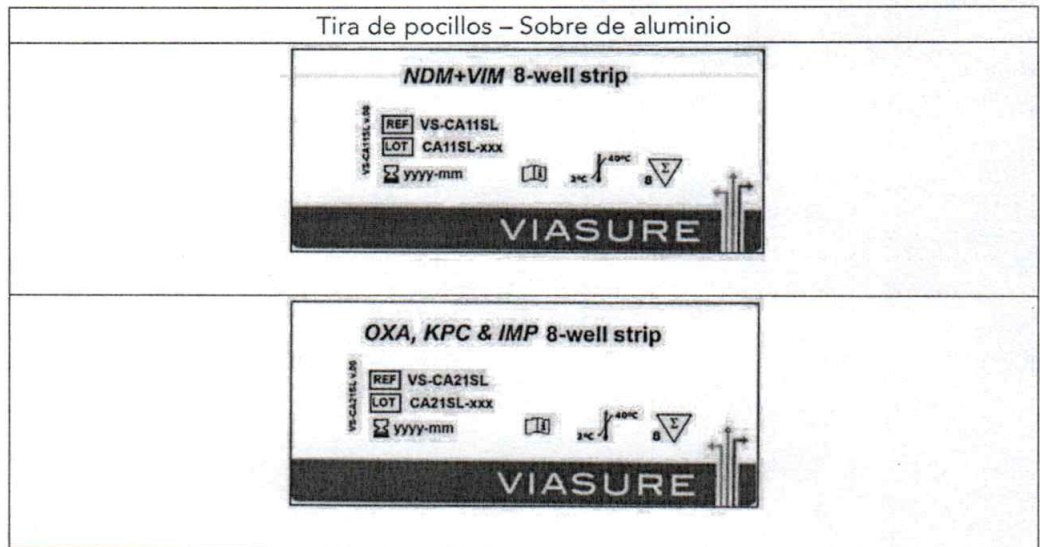
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente

[Handwritten Signature]

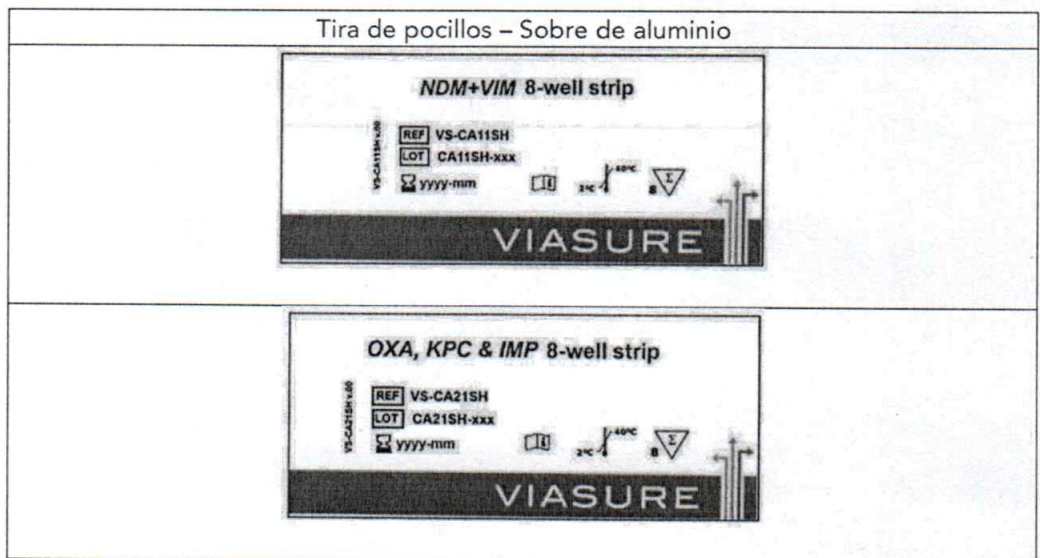
BIOARS S.A.
BIOO CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

2) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit

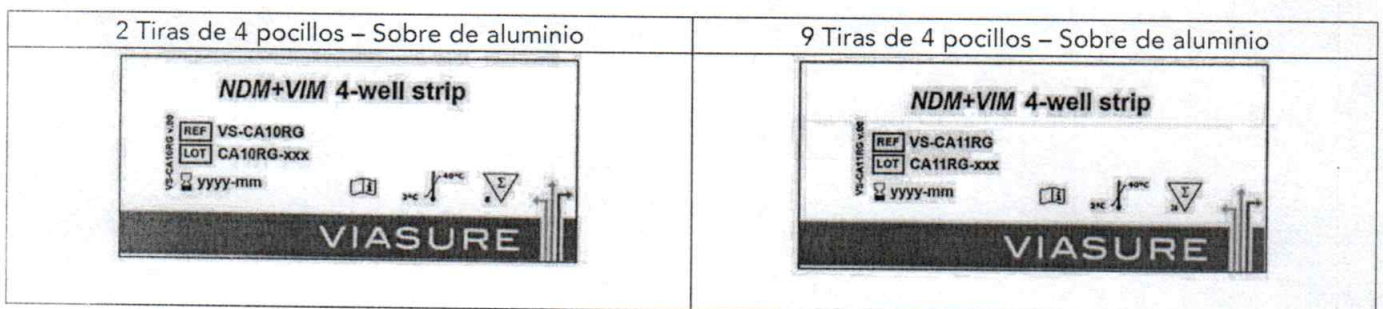
C1) Con Control Interno
Low profile



High Profile



Perfil para instrumentos Rotor-Gene



[Handwritten signature]

BIOLAB S.A.
BIOQ. CLAUDIA FLOREVE
DIRECTOR TECNICO

BIOLAB S.A.
Patricia del Carril
Presidente

[Handwritten signature]

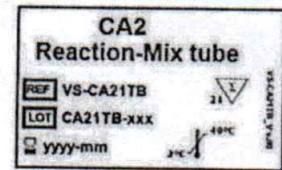
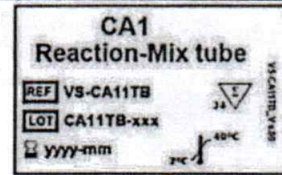


Tubo de reacción

Tubo de reacción – Sobre de aluminio

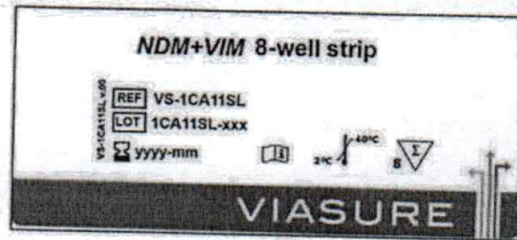


Tubo de reacción - Tubo



CE) Con Control de Extracción
 Low profile

Tira de pocillos – Sobre de aluminio



[Signature]
 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente

[Signature]
 BIOARS S.A.
 BIO CLAUDIA ETCHÉVÉS
 DIRECTOR TÉCNICO

High Profile

Tira de pocillos – Sobre de aluminio	

Perfil para instrumentos Rotor-Gene

2 Tiras de 4 pocillos – Sobre de aluminio	9 Tiras de 4 pocillos – Sobre de aluminio

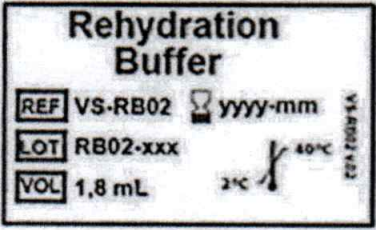
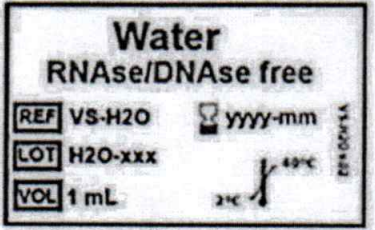
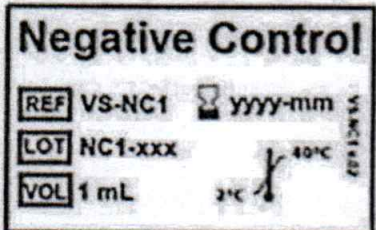
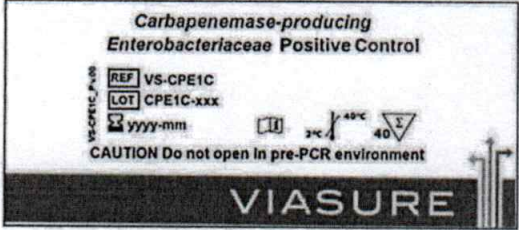
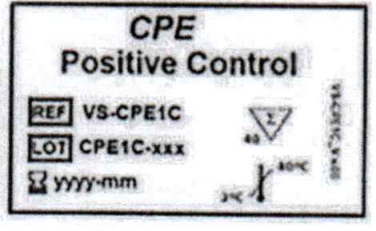
Tubo de reacción

Tubo de reacción – Sobre de aluminio	Tubo de reacción - Tubo

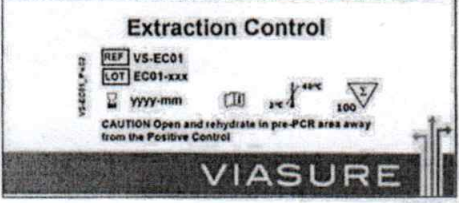
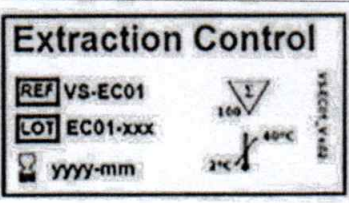
BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevès
 Presidente

[Handwritten Signature]
 BIOLAB S.A.
 DIRECTOR TECNICO

CI) y CE) Componentes comunes a todas las presentaciones

<p>Tampón de rehidratación - Tubo</p> 	<p>Agua libre de RNAasa/DNAasa - Tubo</p> 
<p>Control negativo - Tubo</p> 	<p>Control positivo - Sobre de aluminio</p> 
<p>Control positivo - Tubo</p> 	

Exclusivo de CE) Componente Control de extracción (incluido solo en las presentaciones mencionadas en CE, "con control de extracción")

<p>Control de extracción - Sobre de aluminio</p> 	<p>Control de extracción - Tubo</p> 
--	--

[Handwritten signature]
 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente

BIOARS S.A.
 BIOQ CLAUDIA ETCHÉVÉS
 DIRECTOR TÉCNICO

[Handwritten signature]

3) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit

Cl) Con Control Interno
Low profile



High profile



Perfil para instrumentos Rotor-Gene



[Signature]
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente

[Signature]
BIOARS S.A.
BIOO. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO



Tubo de reacción

Tubo de reacción – Sobre de aluminio	Tubo de reacción - Tubo
<p>MRSA 1: SAU + MEC A/C Reaction-Mix tube</p> <p>REF VS-MR11TB LOT MR11TB-xxx yyyymm</p> <p>IVD CE ISO 13485 2°C 40°C</p> <p>VIASURE</p>	<p>MR1 Reaction-Mix tube</p> <p>REF VS-MR11TB LOT MR11TB-xxx yyyymm</p> <p>IVD CE ISO 13485 24 2°C 40°C</p>
<p>MRSA 2: ORFX Reaction-Mix tube</p> <p>REF VS-MR21TB LOT MR21TB-xxx yyyymm</p> <p>IVD CE ISO 13485 2°C 40°C</p> <p>VIASURE</p>	<p>MR2 Reaction-Mix tube</p> <p>REF VS-MR21TB LOT MR21TB-xxx yyyymm</p> <p>IVD CE ISO 13485 24 2°C 40°C</p>

CE) Con Control de Extracción
Low profile

Tira de pocillos – Sobre de aluminio
<p>MRSA 1: SAU + MEC A/C 8-well strip</p> <p>REF VS-1MR11SL LOT 1MR11SL-xxx yyyymm</p> <p>IVD CE ISO 13485 2°C 40°C</p> <p>VIASURE</p>
<p>MRSA 2: ORFX 8-well strip</p> <p>REF VS-1MR21SL LOT 1MR21SL-xxx yyyymm</p> <p>IVD CE ISO 13485 2°C 40°C</p> <p>VIASURE</p>

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

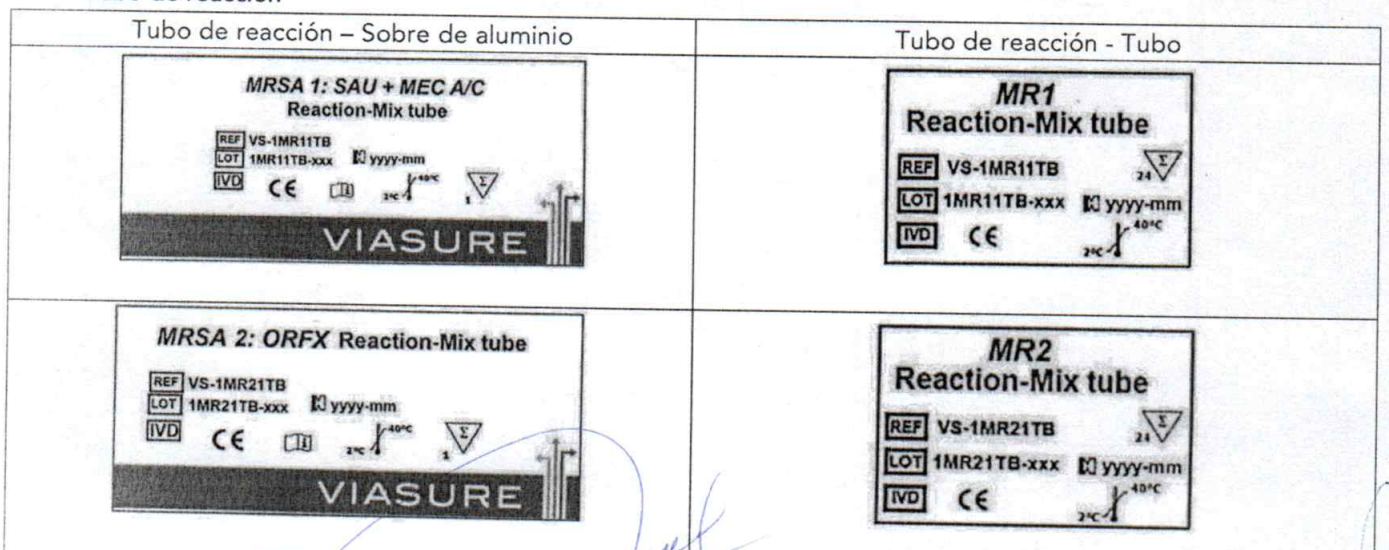
High Profile



Perfil para instrumentos Rotor-Gene



Tubo de reacción



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevea
Presidenta

[Signature]
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ET CHEVEA
DIRECTOR TECNICO

CI) y CE) Componentes comunes a todas las presentaciones

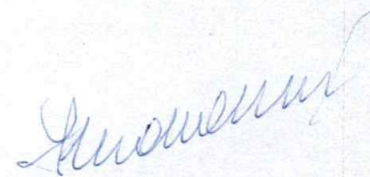
<p>Tampón de rehidratación - Tubo</p> <div data-bbox="244 271 675 524"> <p>Rehydration Buffer</p> <p>REF VS-RB02 VOL 1,8 mL</p> <p>LOT RB02-xxx yyyy-mm</p> <p>IVD CE 2°C 40°C</p> </div>	<p>Agua libre de RNAasa/DNAasa - Tubo</p> <div data-bbox="943 271 1358 524"> <p>Water RNase/DNase free</p> <p>REF VS-H2O VOL 1 mL</p> <p>LOT H2O-xxx yyyy-mm</p> <p>IVD CE 2°C 40°C</p> </div>
<p>Control negativo - Tubo</p> <div data-bbox="300 618 624 815"> <p>Negative Control</p> <p>REF VS-NC1 VOL 1 mL</p> <p>LOT NC1-xxx yyyy-mm</p> <p>IVD CE 2°C 40°C</p> </div>	<p>Control positivo – Sobre de aluminio</p> <div data-bbox="879 618 1422 860"> <p>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Positive Control</p> <p>REF VS-MSA1C</p> <p>LOT MSA1C-xxx yyyy-mm</p> <p>IVD CE 2°C 40°C 40</p> <p>CAUTION Do not open in pre-PCR environment</p> <p>VIASURE</p> </div>
<p>Control positivo - Tubo</p> <div data-bbox="268 943 555 1128"> <p>MSA Positive Control</p> <p>REF VS-MSA1C</p> <p>LOT MSA1C-xxx yyyy-mm</p> <p>IVD CE 2°C 40°C</p> </div>	

Exclusivo de CE) Componente Control de extracción (incluido solo en las presentaciones mencionadas en CE, "con control de extracción")

<p>Control de extracción – Sobre de aluminio</p> <div data-bbox="225 1384 687 1592"> <p>Extraction Control</p> <p>REF VS-EC01</p> <p>LOT EC01-xxx yyyy-mm</p> <p>IVD CE 2°C 40°C 100</p> <p>CAUTION Open and rehydrate in pre-PCR area away from the Positive Control</p> <p>VIASURE</p> </div>	<p>Control de extracción - Tubo</p> <div data-bbox="975 1384 1318 1576"> <p>Extraction Control</p> <p>REF VS-EC01</p> <p>LOT EC01-xxx yyyy-mm</p> <p>IVD CE 2°C 40°C</p> </div>
---	--



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

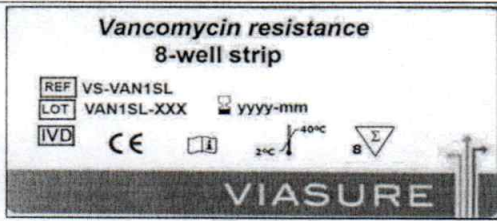



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

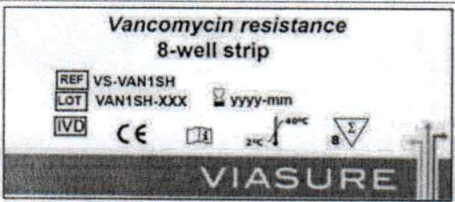

4) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

C1) Con Control Interno.

Low profile

<p>Tira de pocillos – Sobre de aluminio</p> 	<p>Placa – Sobre de aluminio</p> 
---	---


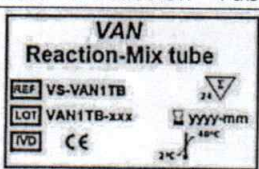
High Profile

<p>Tira de pocillos – Sobre de aluminio</p> 	<p>Placa – Sobre de aluminio</p> 
---	---

Perfil para instrumentos Rotor-Gene


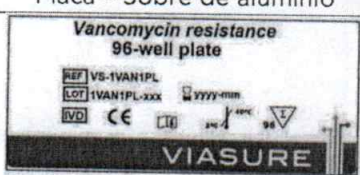
<p>Tira de pocillos – Sobre de aluminio</p> 

Tubo de reacción

<p>Tubo de reacción – Sobre de aluminio</p> 	<p>Tubo de reacción - Tubo</p> 
---	---

CE) Con Control de Extracción

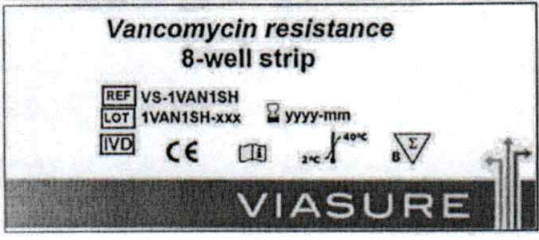

Low Profile

<p>Tira de pocillos – Sobre de aluminio</p> 	<p>Placa – Sobre de aluminio</p> 
---	---


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVEZ
DIRECTOR TÉCNICO


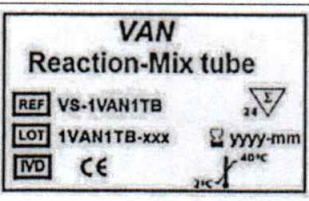
High Profile

<p>Tira de pocillos – Sobre de aluminio</p> 	<p>Placa – Sobre de aluminio</p> 
---	---


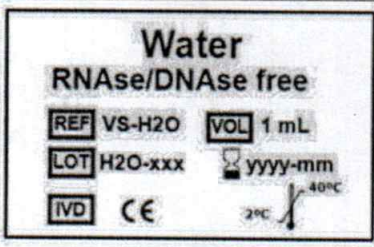
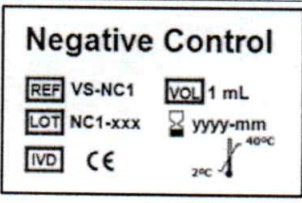
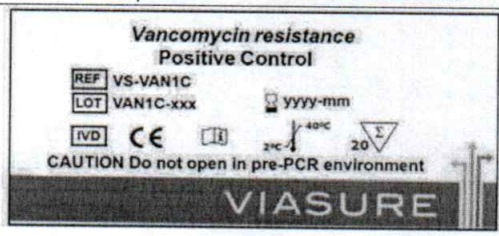
Perfil para instrumentos Rotor-Gene

<p>Tira de pocillos – Sobre de aluminio</p> 

Tubo de reacción

<p>Tubo de reacción – Sobre de aluminio</p> 	<p>Tubo de reacción - Tubo</p> 
--	--


CI) y CE) Componentes comunes a todas las presentaciones

<p>Tampón de rehidratación - Tubo</p> 	<p>Agua libre de RNAasa/DNAasa - Tubo</p> 
<p>Control negativo - Tubo</p> 	<p>Control positivo – Sobre de aluminio</p> 

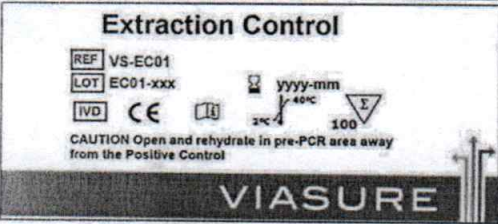

[Handwritten signature]

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

[Handwritten signature]
BIOARS S.A.
BIOO. CLAUDIA ETCHÉVEZ
DIRECTOR TÉCNICO

Control positivo - Tubo	
	

Exclusivo de CE) Componente Control de extracción (incluido solo en las presentaciones mencionadas en CE, "con control de extracción")

Control de extracción – Sobre de aluminio	Control de extracción - Tubo
	



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

VIASURE

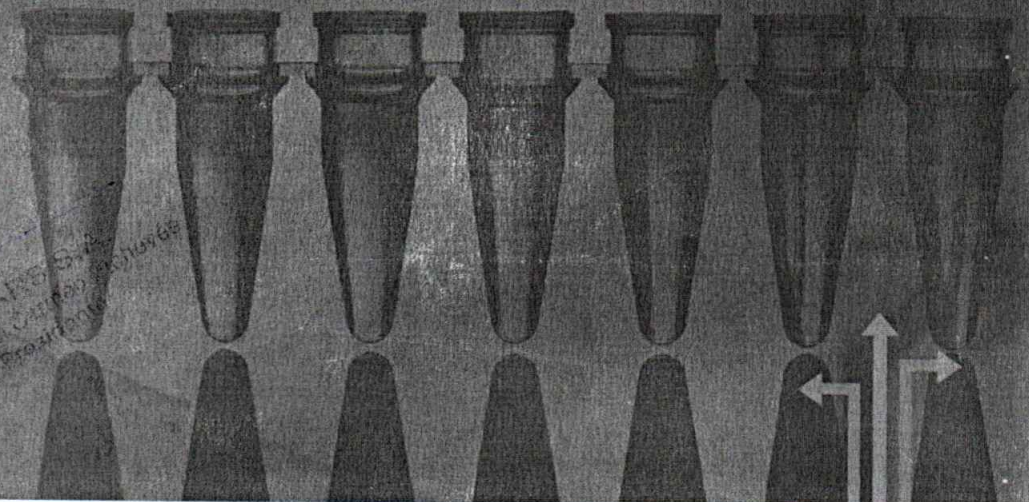
Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

H. pylori + Clarithromycin resistance

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CLA106L
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CLA106H
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CLA112L
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CLA112H
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CLA113L
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CLA113H
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CLA136
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CLA172



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina (CLR) en biopsias (tejido gástrico) procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección gastrointestinal. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las biopsias gástricas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina. El ensayo para detectar la resistencia a CLR está basado en la detección de mutaciones puntuales en el gen 23S rRNA.

2. Introducción y explicación

El género *Helicobacter pylori* pertenece a la familia *Helicobacteriaceae*, a la orden *Campylobacterales*. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria gram-negativa de forma de espiral microaerofílica que es capaz de colonizar el epitelio gástrico humano y la parte superior del intestino delgado (duodeno).

Se estima que más de la mitad de la población está infectada con *H. pylori*, pero la mayoría de los individuos son asintomáticos. Las nuevas infecciones pueden deberse a la transmisión directa entre personas, ya sea a través de la vía oral-oral, fecal-oral o ambas. Sin embargo, no debe descartarse el papel de la forma cocoide de *H. pylori* como un vehículo de infección a partir de diferentes fuentes de transmisión, como los alimentos y el agua. *H. pylori* está implicado en la patogénesis de la gastritis atrófica, úlcera gastroduodenal, cáncer gástrico y linfoma gástrico de tejido linfóide asociado a la mucosa (MALT).

En la actualidad, hay varios ensayos diagnósticos disponibles para la detección de *H. pylori* agrupados como "invasivos" o "no invasivos" pero ninguno de ellos puede considerarse *gold standard* por sí solo. Los métodos invasivos incluyen histología, cultivo y test rápido de ureasa, lo que requiere muestras de biopsia gástrica obtenidas mediante una gastroscopia. Los métodos no invasivos incluyen la detección del antígeno en heces, pruebas serológicas y prueba del aliento (UBT) entre otros.

La ureasa es un factor importante para el mantenimiento y la virulencia de la bacteria en la mucosa gástrica. Se compone de dos subunidades estructurales codificadas por genes, *ureA* y *ureB*, que han sido utilizadas frecuentemente como genes diana para la detección específica de *H. pylori*.

La claritromicina es un antibiótico bacteriostático que se usa principalmente en la infancia para tratar las infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores, pero su indicación para tratar *H. pylori* es la más utilizada. El modo de acción principal de la claritromicina, como uno de los antibióticos de amplio espectro utilizados en la terapia contra *H. pylori*, es prevenir la traducción de proteínas. Después de la primera exposición a la claritromicina, las mutaciones espontáneas (en ambos operones de 23S rRNA) confieren genotipo y fenotipo de resistencia a *H. pylori*. El impacto directo de estas mutaciones es la aparición de cepas de *H. pylori* resistentes

a la claritromicina. Hasta ahora, las dos mutaciones principales son A2142G y A2143G, se consideraron como la principal causa de resistencia a los antibióticos clínicos aislados.

3. Procedimiento

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *H. pylori*, la resistencia a Claritromicina y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA en biopsias (tejido gástrico). Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *H. pylori*, la resistencia a Claritromicina y/o Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes *ureB* y 23S rRNA para *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA respectivamente.

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la amplificación, las mutaciones puntuales en el gen 23S rRNA de *H. pylori* (A2142G y A2143G), que le confieren resistencia a Claritromicina se detectan en el canal FAM, *H. pylori* se detecta en el canal ROX, Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA se detecta en el canal HEX, VIC o JOE y el control interno (CI) se detecta en el canal Cy5 (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1, 2 y 3. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 3 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Defection Kit con Ref. VS-CLA106L, VS-CLA106H, VS-CLA112L y VS-CLA112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Defection Kit con Ref. VS-CLA113L y VS-CLA113H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Transparente	9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	9/18 tiras de 4 tapones

Tabla 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Defection Kit con Ref. VS-CLA136 y VS-CLA172. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL. y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.

- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-CLA113L, VS-CLA113H, VS-CLA136 y VS-CLA172). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para referencias VS-CLA136 y VS-CLA172 (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

8.1. Preparación de la muestra

Las biopsias (tejido gástrico) se deben recoger en recipientes limpios y deben ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda el uso de muestras frescas.

Para conservar durante un tiempo prolongado, las muestras pueden congelarse a -20°C o -80°C . En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. No se recomiendan ciclos de congelación y descongelación. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

8.1.1. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA a partir de biopsias (tejido gástrico) puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado*.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- ZP02004 MagPurix Tissue DNA Extraction Kit and ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit (muestras de biopsias), utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.)
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).

**Con el fin de mejorar el rendimiento y la calidad del DNA bacteriano de las biopsias, se recomienda el tratamiento previo de la muestra con lisozima a 37°C como se describe en las "Instrucciones de uso" para el aislamiento de DNA bacteriano. Además, la utilización de pequeños volúmenes de elución puede elevar la concentración de DNA.*

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *H. pylori* + Clarithromycin resistance Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *H. pylori* + Clarithromycin resistance Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Protocolo PCR

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

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

Añadir 15 µL del Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *H. pylori* + Clarithromycin resistance Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) en diferentes pocillos y cerrar los pocillos con los tapones suministrados.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	63°C

Tabla 5. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (resistencia a Claritromicina), ROX (*H. pylori*), HEX, JOE o VIC (Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA) y Cy5 (CI). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

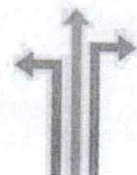
El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *H. pylori* + Clarithromycin resistance. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para considerar que una muestra contiene *H. pylori* resistente y/o sensible a claritromicina ésta debe ser *H. pylori* positiva. Además, se recomienda verificar el nivel de fluorescencia en los canales FAM y HEX para discriminar entre resistencia a Claritromicina y/o Claritromicina con secuencia wild-type.

Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

[Handwritten signature]
 BIOARS S.A.
 BIOD. CLAUDIA ETCHEVÉS
 DIRECTOR TÉCNICO

[Large handwritten signature]

BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente



Resistencia a Claritromicina (FAM)	<i>H. pylori</i> (ROX)	Claritromicina secuencia wild-type (HEX)	Control interno (Cy5)	Control negativo	Control positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> positivo. Resistencia a Claritromicina positiva y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva ^a
+	+	-	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> positivo y Resistencia a Claritromicina positiva; Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA negativa ^b
-	+	+	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> positivo y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva, Resistencia a Claritromicina negativa ^c
+	-	+	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> negativo; Resistencia a Claritromicina positiva y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva
-	-	-	+	-	+	<i>H. pylori</i> negativo. Resistencia a Claritromicina negativa y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA negativa
-	-	+	+/-	-	+	Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva
+	-	-	+/-	-	+	Resistencia a Claritromicina positiva
-	+	-	+/-	-	+	Inválido
-	-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	+	Inválido

Tabla 6. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

^a Presencia de cepas resistentes a Claritromicina y con secuencia wild-type simultáneamente en la misma muestra clínica. Deben observarse niveles de fluorescencia similares en los canales HEX y FAM. Por el contrario, si se observan diferencias entre la señal fluorescente de ambos canales, observe la posibilidad de interpretación ^b o ^c.

^b Se puede observar un pequeño nivel de fluorescencia en los canales HEX.

^c Se puede observar un pequeño nivel de fluorescencia en los canales de FAM.

Handwritten signature
 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHEVÉS
 DIRECTOR TÉCNICO

Handwritten signature
 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente



Figura 1 y 2. Ejecución correcta de muestra de resistencia a claritromicina y *H. pylori* positivo y pequeño nivel de fluorescencia en canales HEX (wild-type) ejecutados en Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR System (Figura 1) y ejecución correcta de *H. pylori* positivo y de secuencia wild-type la muestra y el pequeño nivel de fluorescencia en los canales de FAM (resistencia a la claritromicina) se ejecutan en Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR System (Figura 2).

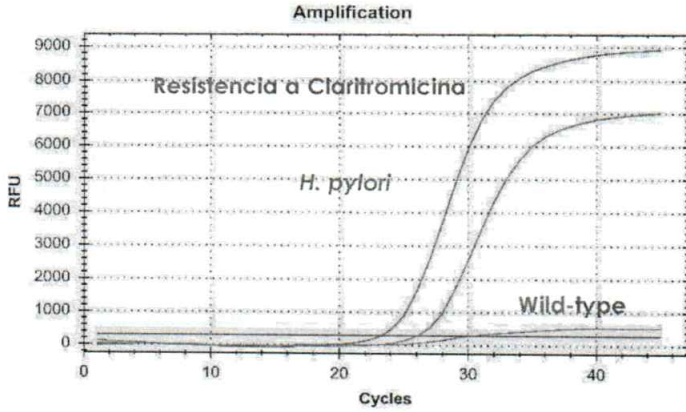


Figura 1

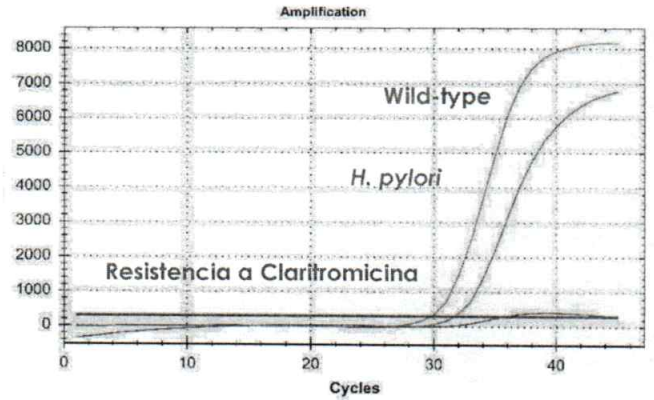
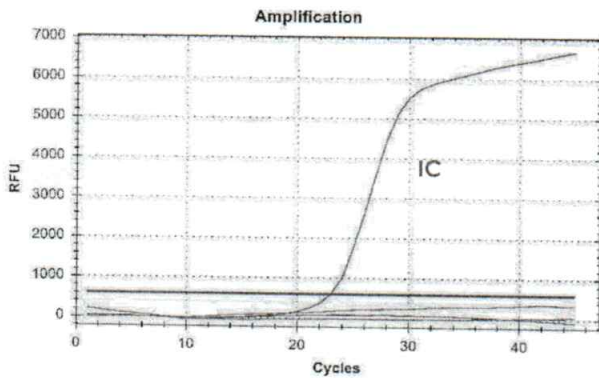


Figura 2

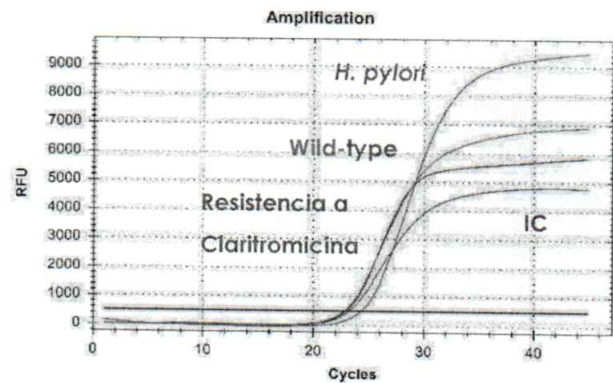
Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

Figura 3. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR System.



Control Negativo



Control Positivo

El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque ha sido validado solo con DNA extraído de biopsias (tejido gástrico) humanas.
- 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. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina. *H. pylori* y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas pueden afectar la detección de nuevas variantes, lo que da como resultado un falso negativo con VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit.
- Otras especies diferentes de *H. pylori* podrían portar diferentes alelos en el gen de 23S rRNA y dar resultados positivos a las secuencias wild-type de claritromicina y / o la resistencia a la claritromicina.

11. Control de calidad

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron biopsias de tejido gástrico humano de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular (RIDA®GENE Helicobacter pylori (R-Biopharm)). Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE <i>H. pylori</i> + <i>Clarithromycin resistance</i> Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE <i>Helicobacter pylori</i> (R-Biopharm)		
		+	-
+	99	3*	102
-	2*	102	104
Total	101	105	206

Tabla 7. Comparativa de resultados para *H. pylori*.

*La baja cantidad de DNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado.

VIASURE <i>H. pylori</i> + <i>Clarithromycin resistance</i> Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE <i>Helicobacter pylori</i> (R-Biopharm)		
		+	-
+	23	0	23
-	2#	77	79
Total	25	77	102

Tabla 8. Comparativa de resultados para *Clarithromycin resistance*.

Estas 2 muestras son cepas sensibles a Claritromicina según VIASURE y cepas resistentes a Claritromicina según R-biopharm. Son cepas sensibles a Claritromicina según secuenciación, confirmando nuestros resultados.

VIASURE <i>H. pylori</i> + <i>Clarithromycin resistance</i> Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE <i>Helicobacter pylori</i> (R-Biopharm)		
		+	-
+	77	2#	79
-	0	23	23
Total	77	25	102

Tabla 9. Comparativa de resultados para *Clarithromycin* secuencias wild-type en el 23S rRNA.

Estas 2 muestras son cepas sensibles a Claritromicina según VIASURE y cepas resistentes a Claritromicina según R-biopharm. Son cepas sensibles a Claritromicina según secuenciación, confirmando nuestros resultados.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina; utilizando VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina. (Figura 4, 5 y 6)

Claudia Etcheves
BIOARS S.A.
BIOQ CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TÉCNICO

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Biondi
Presidente

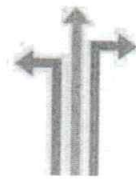


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar Clarithromycin resistance (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96TM Real-Time PCR System (canal FAM).

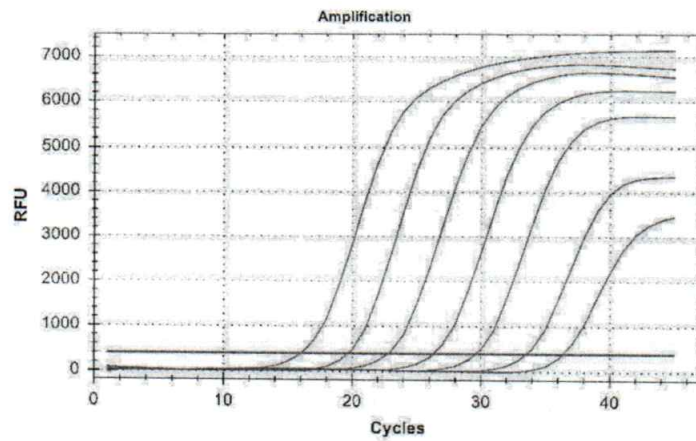


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar *H. pylori* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96TM Real-Time PCR System (canal ROX).

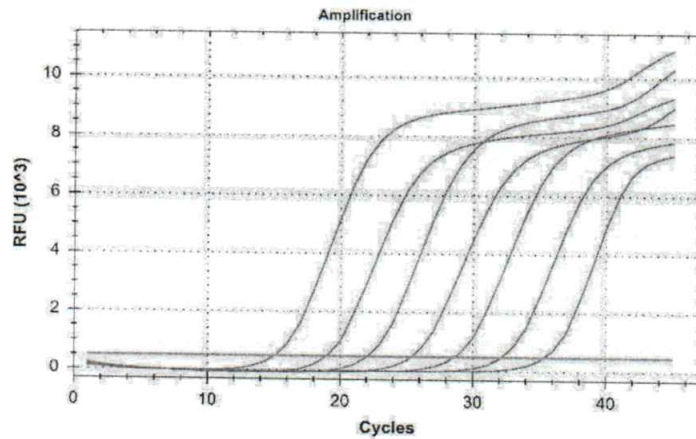
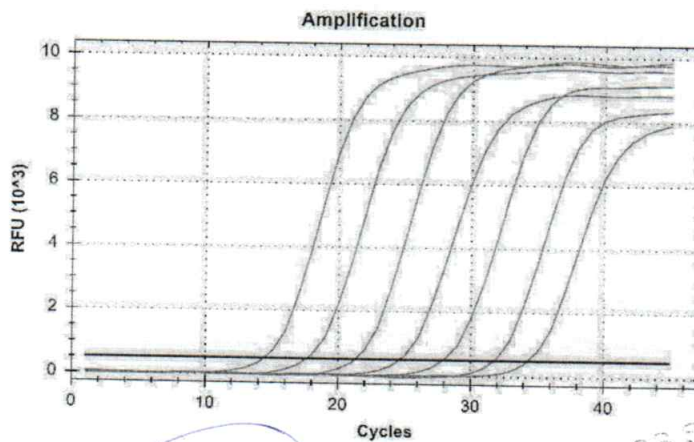
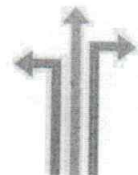


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar Clarithromycin secuencia wild-type (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo AriaMx Real-Time PCR System (canal HEX).



[Handwritten Signature]
 BIOARS S.A.
 BIOO CLAUDIA ETCHEVES
 DIRECTOR TECNICO

[Handwritten Signature]
 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevès
 Presidente



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *H. pylori* + Clarithromycin resistance fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos entéricos más comunes o que pueden estar presentes en la flora intestinal. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, con la excepción de *H. heilmannii*, que junto con *H. pylori* puede causar gastritis crónica en humanos.

Prueba de reacción cruzada					
<i>Helicobacter felis</i> *	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
<i>Helicobacter hepaticus</i> *	-	<i>Campylobacter hyointestinalis</i> *	-	<i>Arcobacter butzleri</i>	-
<i>Helicobacter cinaedi</i> *	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Helicobacter heilmannii</i> *	-/+	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3*	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	Adenovirus serotipos 40/41	-
<i>Salmonella paratyphi B</i>	-	<i>Clostridium difficile</i> 027*	-	Adenovirus serotipos 1-5	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Adenovirus serotipos 8/15/31	-
<i>Salmonella bongori</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica	-	Rotavirus A	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica	-	Norovirus Genotipos I y II	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva	-	Astrovirus Genotype I-VIII	-
<i>Salmonella pullorum</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena	-	Sapovirus	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> *	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> *	-	<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-
<i>Campylobacter coli</i> *	-	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i> *	-	<i>Giardia intestinalis</i> *	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Dientamoeba fragilis</i>	-

Tabla 10. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

*Estos organismos muestran señal de amplificación en el canal de Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA.

La especificidad del ensayo de resistencia a claritromicina fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Prueba de reacción cruzada			
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315 resistente a la meticilina	-	<i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ST398 resistente a la meticilina	-	Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> mecC resistente a la meticilina	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2146G)	-/+
Aislado cMRSA (oxa ^R , PVL-positive, spa:t 310)	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2147G)	-/+
Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48	-	<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	-
Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48	-	<i>Enterococcus faecium</i> cepa LMG16165 tipo VanA	-
Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) y KPC-2	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1 tipo VanA	-
<i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2 tipo VanB	-
<i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-	<i>E. faecalis</i> (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz tipo VanB	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142 tipos VanC y VanB	-
<i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC	-

Tabla 11. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit para *Helicobacter pylori* se evaluó frente a las cepas de *Helicobacter pylori* J99 y Sydney, mostrando un resultado positivo.







La reactividad de VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit para la resistencia a Claritromicina se evaluó frente a cepas de *H. pylori* wild-type y portadoras de las mutaciones puntuales A2142G y A2143G, mostrando un resultado negativo y positivo respectivamente.

13. Bibliography/Bibliografía

1. C. Schabereiter-Gurtner *et al.* Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(10): 4512-4518.
2. J.G. Kusters *et al.* Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19(3): 449-490.
3. F. Can *et al.* Urease activity and urea gene sequencing of coccoid forms of *Helicobacter pylori* induced by different factors. *Current Microbiology* 2008; 56(2): 150-155.
4. R.X. Tang *et al.* Diversity of *Helicobacter pylori* isolates in expression of antigens and induction of antibodies. *World Journal of Gastroenterology* 2008; 14(30): 4816-4822.

5. S.K. Patel et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World Journal of Gastroenterology* 2014; 20(36): 12847-12859.
6. M. Varbanova et al. Chronic gastritis-an update. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology* 2014; 28(6): 1031-1042.
7. Abadi A.T.B. et al. Resistance to clarithromycin and gastroenterologist's persistence roles in nomination for *Helicobacter pylori* as high priority pathogen by World Health Organization. *World Journal of Gastroenterology* 2017; 23(35): 6379-6384.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

<p>IVD In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i></p>	<p> Keep dry Almacenar en lugar seco</p>	<p> Use by Fecha de caducidad</p>	<p> Manufacturer Fabricante</p>	<p>LOT Batch code Número de lote</p>
<p> Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso</p>	<p> Temperature limitation Limitación de temperatura</p>	<p> Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test</p>	<p>DIL Sample diluent Diluyente de muestra</p>	<p>REF Catalogue number Número de referencia</p>

[Handwritten Signature]
BIOARS S.A.
BIOO CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

[Handwritten Signature]
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidenta



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlife Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000PT™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005PT™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

- (1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.
- (3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.
- (4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.
- (5) No lectura en canal Cy5.
- (6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.

Patricia Corrales
Presidenta

33



ANEXO 2

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 Tabla A3.

TERMOICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DPrime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTile Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 500.


*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: March 2019


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

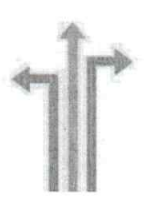

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

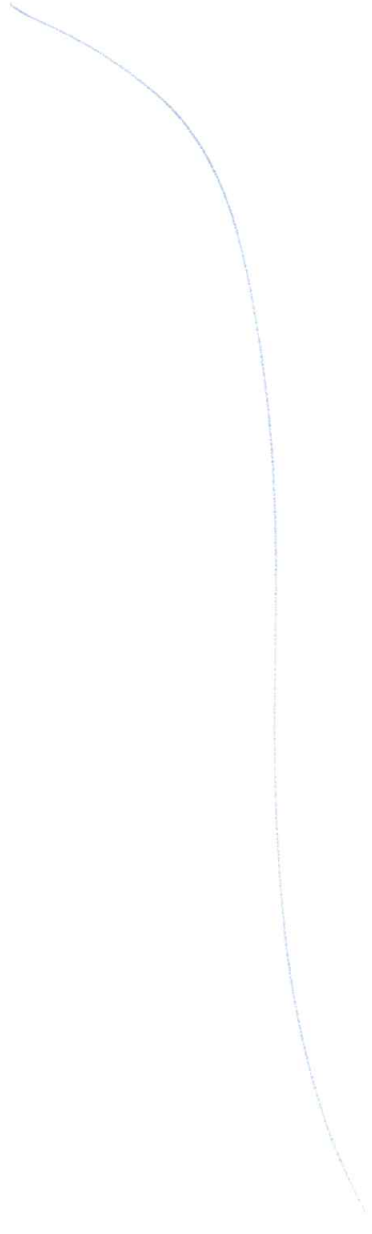




[Handwritten signature]
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

[Handwritten signature]
BIOARS S.A.
BIOG CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

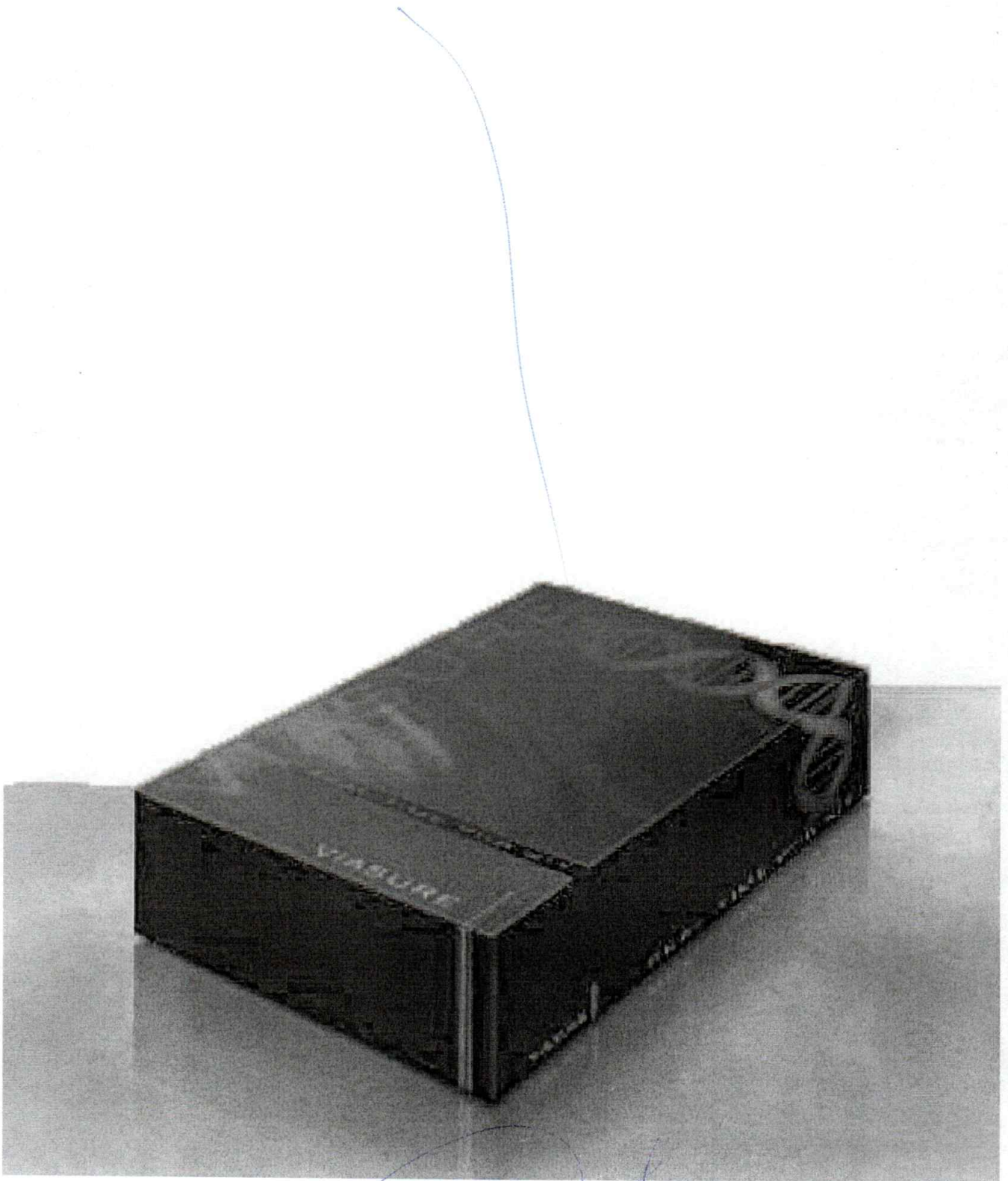




Patricia del Carmen Etchevés
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

Claudia Etchevés
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO





IU-CLA012enes0719 rev.08

[Handwritten signature]
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVEY
DIRECTOR TECNICO

BIOQ. S.A.
Patricia del Carmen Echeveay
Presidente





CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.cerfest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC

VIASURE

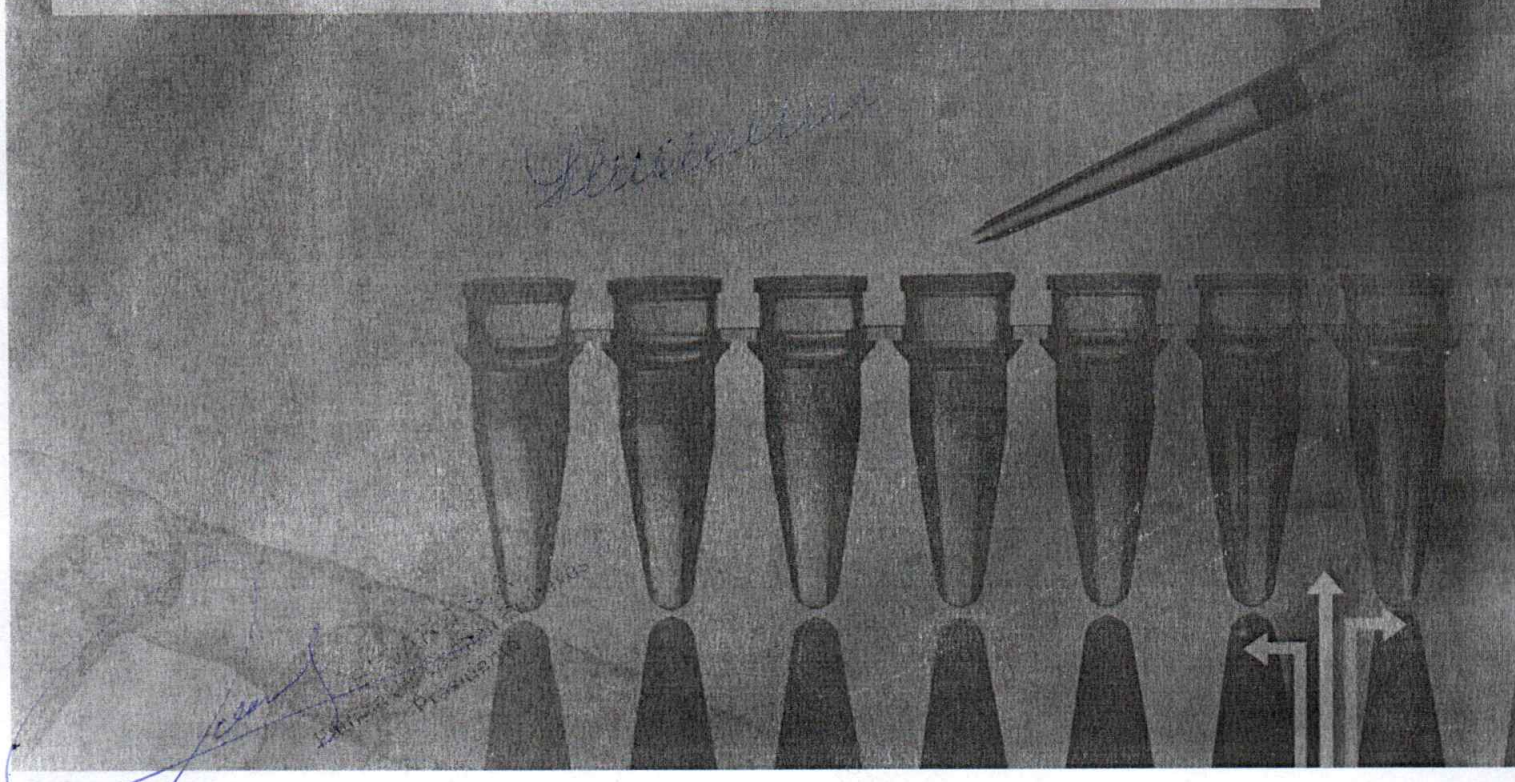
Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

H. pylori + Clarithromycin resistance

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CLA106LE
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CLA106HE
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CLA112LE
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CLA112HE
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CLA113LE
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CLA113HE
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CLA136E
VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CLA172E



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina (CLR) en biopsias (tejido gástrico) procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección gastrointestinal. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las biopsias gástricas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina. El ensayo para detectar la resistencia a CLR está basado en la detección de mutaciones puntuales en el gen 23S rRNA.

2. Introducción y explicación

El género *Helicobacter pylori* pertenece a la familia *Helicobacteriaceae*, a la orden *Campylobacterales*. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria gram-negativa de forma de espiral microaerofílica que es capaz de colonizar el epitelio gástrico humano y la parte superior del intestino delgado (duodeno).

Se estima que más de la mitad de la población está infectada con *H. pylori*, pero la mayoría de los individuos son asintomáticos. Las nuevas infecciones pueden deberse a la transmisión directa entre personas, ya sea a través de la vía oral-oral, fecal-oral o ambas. Sin embargo, no debe descartarse el papel de la forma cocoide de *H. pylori* como un vehículo de infección a partir de diferentes fuentes de transmisión, como los alimentos y el agua. *H. pylori* está implicado en la patogénesis de la gastritis atrófica, úlcera gastroduodenal, cáncer gástrico y linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT).

En la actualidad, hay varios ensayos diagnósticos disponibles para la detección de *H. pylori* agrupados como "invasivos" o "no invasivos" pero ninguno de ellos puede considerarse *gold standard* por sí solo. Los métodos invasivos incluyen histología, cultivo y test rápido de ureasa, lo que requiere muestras de biopsia gástrica obtenidas mediante una gastroduodenoscopia. Los métodos no invasivos incluyen la detección del antígeno en heces, pruebas serológicas y prueba del aliento (UBT) entre otros.

La ureasa es un factor importante para el mantenimiento y la virulencia de la bacteria en la mucosa gástrica. Se compone de dos subunidades estructurales codificadas por genes, *ureA* y *ureB*, que han sido utilizadas frecuentemente como genes diana para la detección específica de *H. pylori*.

La claritromicina es un antibiótico bacteriostático que se usa principalmente en la infancia para tratar las infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores, pero su indicación para tratar *H. pylori* es la más utilizada. El modo de acción principal de la claritromicina, como uno de los antibióticos de amplio espectro utilizados en la terapia contra *H. pylori*, es prevenir la traducción de proteínas. Después de la primera exposición a la claritromicina, las mutaciones espontáneas (en ambos operones de 23S rRNA) confieren genotipo y fenotipo de resistencia a *H. pylori*. El impacto directo de estas mutaciones es la aparición de cepas de *H. pylori* resistentes



a la claritromicina. Hasta ahora, las dos mutaciones principales son A2142G y A2143G, se consideraron como la principal causa de resistencia a los antibióticos clínicos aislados.

3. Procedimiento

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *H. pylori*, la resistencia a Claritromicina y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA en biopsias (tejido gástrico). Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *H. pylori*, la resistencia a Claritromicina y/o Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes *ureB* y 23S rRNA para *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA respectivamente.

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede adicionarse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa. Tras la amplificación, las mutaciones puntuales en el gen 23S rRNA de *H. pylori* (A2142G y A2143G), que le confieren resistencia a Claritromicina se detectan en el canal FAM, *H. pylori* se detecta en el canal ROX, Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA se detecta en el canal HEX, VIC o JOE y el control de extracción (CE) se detecta en el canal Cy5 (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1, 2 y 3. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 3 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CLA106LE, VS-CLA106HE, VS-CLA112LE y VS-CLA112HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CLA113LE y VS-CLA113HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	9/18 tiras de 4 tapones

Tabla 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CLA136E y VS-CLA172E. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrifuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.

- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-CLA113LE, VS-CLA113HE, VS-CLA136E y VS-CLA172E). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para referencias VS-CLA136E y VS-CLA172E (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

8.1. Control de extracción liofilizado

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

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

8.2. Preparación de la muestra

Las biopsias (tejido gástrico) se deben recoger en recipientes limpios y deben ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda el uso de muestras frescas.

Para conservar durante un tiempo prolongado, las muestras pueden congelarse a -20°C o -80°C . En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. No se recomiendan ciclos de congelación y descongelación. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

8.2.1. Extracción de DNA

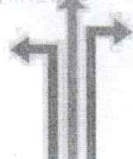
Si el Control de Extracción se utiliza para monitorizar el proceso de aislamiento de los ácidos nucleicos y como control de la posible inhibición de la PCR, añadir 5 μL del CE a la muestra o a la mezcla del tampón de lisis-muestra. (muestras clínicas, control positivo y/o negativo). Cerrar cada uno de los tubos y mezclar con la ayuda del vórtex durante 10 segundos.

Si el Control de Extracción se emplea sólo como control de inhibición de la PCR, añadir 1 μL de CE a la mezcla de reacción reconstituida.

Para la extracción de DNA a partir de biopsias (tejido gástrico) puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado*.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- ZP02004 MagPurix Tissue DNA Extraction Kit and ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit (muestras de biopsias), utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.)
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).

*Con el fin de mejorar el rendimiento y la calidad del DNA bacteriano de las biopsias, se recomienda el tratamiento previo de la muestra con lisozima a 37°C como se describe en las "Instrucciones de uso" para el aislamiento de DNA bacteriano. Además, la utilización de pequeños volúmenes de elución puede elevar la concentración de DNA.



8.3. Control positivo liofilizado

El vial de *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.4. Protocolo PCR

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

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

Añadir 15 µL del Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

- 1) Añadir muestras y controles.

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

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

Añadir 5 µL de *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

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

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 2) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	63°C

Tabla 5. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (resistencia a Claritromicina), ROX (*H. pylori*), HEX, JOE o VIC (Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA) y Cy5 (Control Extracción). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005PTM Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *H. pylori* + Clarithromycin resistance. Comprobar la emisión de la señal del control de extracción para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para considerar que una muestra contiene *H. pylori* resistente y/o sensible a claritromicina ésta debe ser *H. pylori* positiva. Además, se recomienda verificar el nivel de fluorescencia en los canales FAM y HEX para discriminar entre resistencia a Claritromicina y/o Claritromicina con secuencia wild-type. Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

Resistencia a Claritromicina (FAM)	<i>H. pylori</i> (ROX)	Claritromicina secuencia wild-type (HEX)	Control extracción (Cy5)	Control negativo	Control positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> positivo, Resistencia a Claritromicina positiva y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva ^a
+	+	-	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> positivo y Resistencia a Claritromicina positiva; Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA negativa ^b
-	+	+	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> positivo y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva, Resistencia a Claritromicina negativa ^c
+	-	+	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> negativo; Resistencia a Claritromicina positiva y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva
-	-	-	+	-	+	<i>H. pylori</i> negativo, Resistencia a Claritromicina negativa y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA negativa
-	-	+	+/-	-	+	Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva
+	-	-	+/-	-	+	Resistencia a Claritromicina positiva
-	+	-	+/-	-	+	Inválido
-	-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	+	Inválido

Tabla 6. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

[Handwritten Signature]
 BIGARS S.A.
 Patricia del Carmen Etcheve
 Presidente

[Handwritten Signature]
 BIGARS S.A.
 BICA CLAUDIA ETCHÉVE
 DIRECTOR TÉCNICO

^a Presencia de cepas resistentes a Claritromicina y con secuencia wild-type simultáneamente en la misma muestra clínica. Deben observarse niveles de fluorescencia similares en los canales HEX y FAM. Por el contrario, si se observan diferencias entre la señal fluorescente de ambos canales, observe la posibilidad de interpretación ^b o ^c.

^b Se puede observar un pequeño nivel de fluorescencia en los canales HEX.

^c Se puede observar un pequeño nivel de fluorescencia en los canales de FAM.

Figura 1 y 2. Ejecución correcta de muestra de resistencia a claritromicina y *H. pylori* positivo y pequeño nivel de fluorescencia en canales HEX (wild-type) ejecutados en Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR System (Figura 1) y ejecución correcta de *H. pylori* positivo y de secuencia wild-type la muestra y el pequeño nivel de fluorescencia en los canales de FAM (resistencia a la claritromicina) se ejecutan en Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR System (Figura 2).

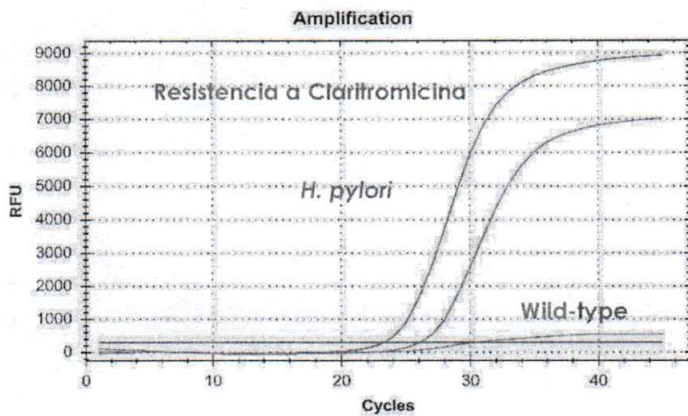


Figura 1

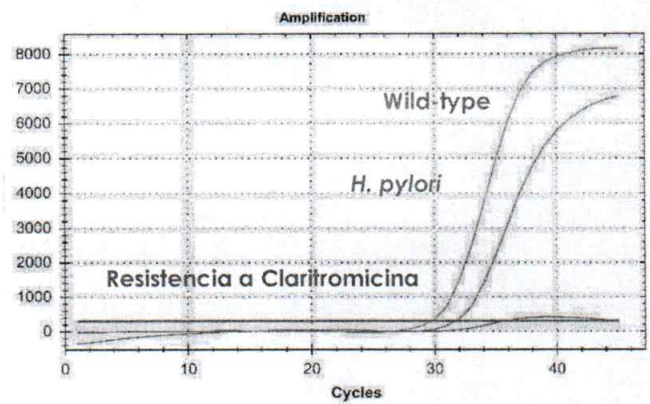


Figura 2

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el Control de Extracción muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del Control Extraction 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.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el Control de Extracción si la presenta. Un fallo en el proceso de extracción y la inhibición de la reacción de PCR pueden ser excluidas por la amplificación del Control de Extracción.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta

Guadalupe

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

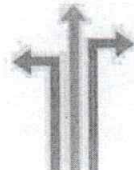
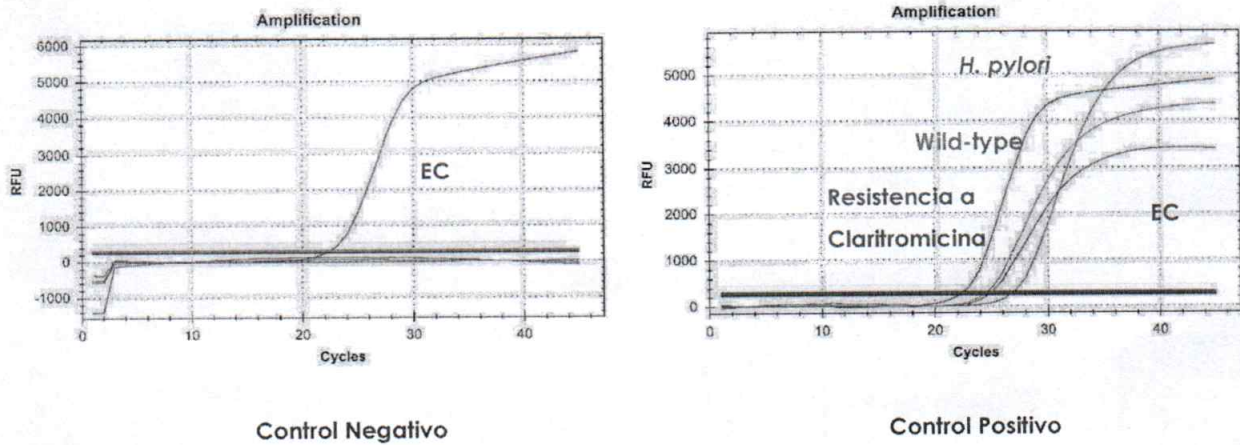


Figura 3. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96TM Real-Time PCR System.



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de ambos, el Control de Extracción y de la muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas durante la purificación de los ácidos nucleicos de y/o inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

En los controles de extracción se pueden observar diferencias en los valores de Ct entre las muestras control (control negativo y control positivo) y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

Para muestras en el límite de detección (LOD) o muestras negativas con un valor de Ct para el control de extracción ≥ 35 , se recomienda filtrar la muestra, o diluir el extraído (1:10 and 1:100) para evitar las posibles interferencias e inhibidores en la reacción de amplificación. Conviene revisar las instrucciones de uso del proceso de extracción empleado por el usuario.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque ha sido validado solo con DNA extraído de biopsias (tejido gástrico) humanas.
- 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. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.

- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina, *H. pylori* y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas pueden afectar la detección de nuevas variantes, lo que da como resultado un falso negativo con VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit.
- Otras especies diferentes de *H. pylori* podrían portar diferentes alelos en el gen de 23S rRNA y dar resultados positivos a las secuencias wild-type de claritromicina y / o la resistencia a la claritromicina.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *H. pylori* + Clarithromycin resistance Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el Agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos de debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.

11. Control de calidad

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control de extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clinica

Se evaluaron biopsias de tejido gástrico humano de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular (RIDA@GENE Helicobacter pylori (R-Biopharm)). Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit	RIDA@GENE Helicobacter pylori (R-Biopharm)			Total
		+	-	
+	99	3*	102	
-	2*	102	104	
Total	101	105	206	

Tabla 7. Comparativa de resultados para *H. pylori*.

*La baja cantidad de DNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado.

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE Helicobacter pylori (R-Biopharm)			
		+	-	Total
	+	23	0	23
	-	2#	77	79
Total	25	77	102	

Tabla 8. Comparativa de resultados para Clarithromycin resistance.

Estas 2 muestras son cepas sensibles a Claritromicina según VIASURE y cepas resistentes a Claritromicina según R-biopharm. Son cepas sensibles a Claritromicina según secuenciación, confirmando nuestros resultados.

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE Helicobacter pylori (R-Biopharm)			
		+	-	Total
	+	77	2#	79
	-	0	23	23
Total	77	25	102	

Tabla 9. Comparativa de resultados para Clarithromycin secuencias wild-type en el 23S rRNA.

Estas 2 muestras son cepas sensibles a Claritromicina según VIASURE y cepas resistentes a Claritromicina según R-biopharm. Son cepas sensibles a Claritromicina según secuenciación, confirmando nuestros resultados.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina; utilizando VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina. (Figura 4, 5 y 6).

Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar Clarithromycin resistance (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96TM Real-Time PCR System (canal FAM).

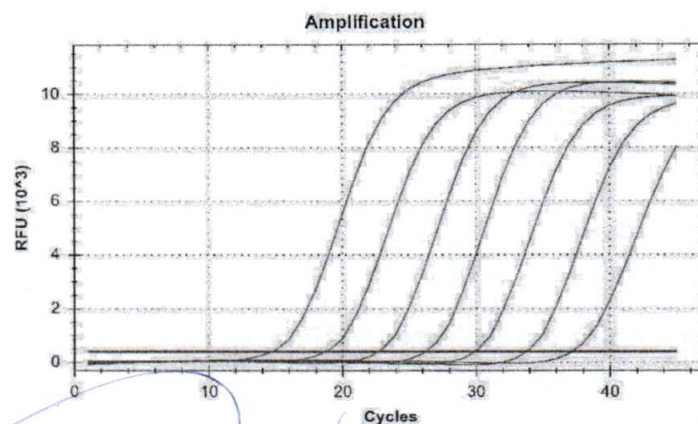


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar *H. pylori* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR System (canal ROX).

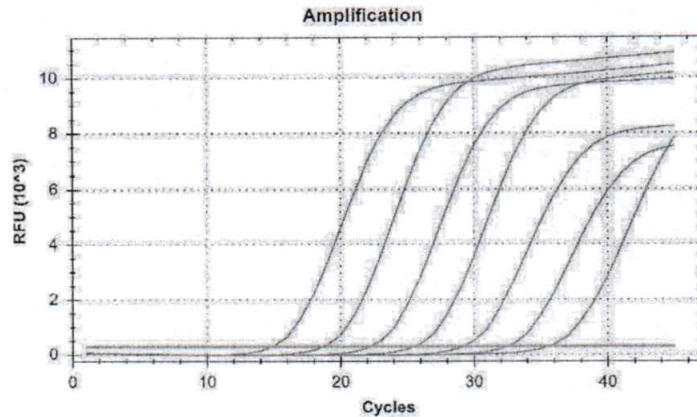
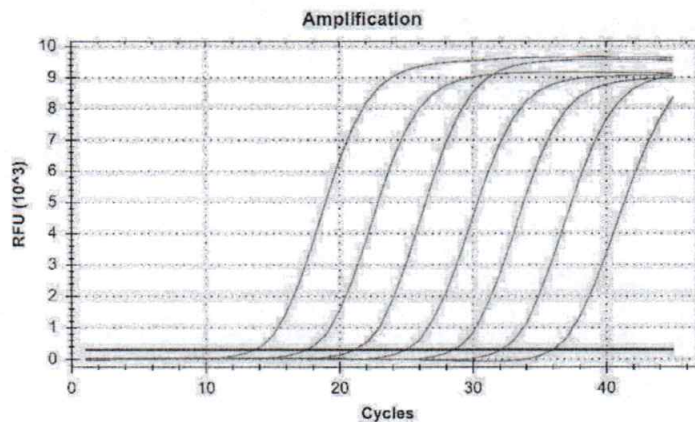
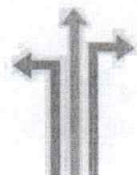


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar Clarithromycin secuencia wild-type (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo AriaMx Real-Time PCR System (canal HEX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *H. pylori* + Clarithromycin resistance fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos entéricos más comunes o que pueden estar presentes en la flora intestinal. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, con la excepción de *H. heilmannii*, que junto con *H. pylori* puede causar gastritis crónica en humanos.



Prueba de reacción cruzada					
<i>Helicobacter felis</i> *	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
<i>Helicobacter hepaticus</i> *	-	<i>Campylobacter hyointestinalis</i> *	-	<i>Arcobacter butzleri</i>	-
<i>Helicobacter cinaedi</i> *	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Helicobacter heilmannii</i> *	-/+	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3*	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Salmonella paratyphi</i> A	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	Adenovirus serotipos 40/41	-
<i>Salmonella paratyphi</i> B	-	<i>Clostridium difficile</i> 027*	-	Adenovirus serotipos 1-5	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Adenovirus serotipos 8/15/31	-
<i>Salmonella bongori</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica	-	Rotavirus A	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica	-	Norovirus Genotipos I y II	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva	-	Astrovirus Genotype I-VIII	-
<i>Salmonella pullorum</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogénica	-	Sapovirus	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> *	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> *	-	<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-
<i>Campylobacter coli</i> *	-	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i> *	-	<i>Giardia intestinalis</i> *	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Dientamoeba fragilis</i>	-

Tabla 10. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

*Estos organismos muestran señal de amplificación en el canal de Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA.

La especificidad del ensayo de resistencia a claritromicina fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.



Prueba de reacción cruzada			
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315 resistente a la meticilina	-	<i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ST398 resistente a la meticilina	-	Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> mecC resistente a la meticilina	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2146G)	-/+
Aislado cMRSA (oxaF, PVL-positive, spa:t 310)	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2147G)	-/+
Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48	-	<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	-
Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48	-	<i>Enterococcus faecium</i> cepa LMG16165 tipo VanA	-
Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) y KPC-2	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1 tipo VanA	-
<i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2 tipo VanB	-
<i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-	<i>E. faecalis</i> (Andrewes y Harder) Schleifer y Kilpper-Balz tipo VanB	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142 tipos VanC y VanB	-
<i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC	-

Tabla 11. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit para *Helicobacter pylori* se evaluó frente a las cepas de *Helicobacter pylori* J99 y Sydney, mostrando un resultado positivo.


La reactividad de VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit para la resistencia a Claritromicina se evaluó frente a cepas de *H. pylori* wild-type y portadoras de las mutaciones puntuales A2142G y A2143G, mostrando un resultado negativo y positivo respectivamente.

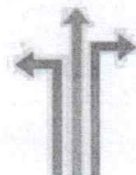
13. Bibliography/Bibliografía

1. C. Schabereiter-Gurtner *et al.* Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(10): 4512-4518.
2. J.G. Kusters *et al.* Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19(3): 449-490.
3. F. Can *et al.* Urease activity and urea gene sequencing of coccoid forms of *Helicobacter pylori* induced by different factors. *Current Microbiology* 2008; 56(2): 150-155.
4. R.X. Tang *et al.* Diversity of *Helicobacter pylori* isolates in expression of antigens and induction of antibodies. *World Journal of Gastroenterology* 2008; 14(30): 4816-4822.

5. S.K. Patel *et al.* Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World Journal of Gastroenterology* 2014; 20(36): 12847-12859.
6. M. Varbanova *et al.* Chronic gastritis-an update. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology* 2014; 28(6): 1031-1042.
7. Abadi A.T.B. *et al.* Resistance to clarithromycin and gastroenterologist's persistence roles in nomination for *Helicobacter pylori* as high priority pathogen by World Health Organization. *World Journal of Gastroenterology* 2017; 23(35): 6379-6384.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

<p>IVD</p> <p><i>In vitro</i> diagnostic device</p> <p>Producto para diagnóstico <i>in vitro</i></p>		<p>Keep dry</p> <p>Almacenar en lugar seco</p>		<p>Use by</p> <p>Fecha de caducidad</p>		<p>Manufacturer</p> <p>Fabricante</p>		<p>Batch code</p> <p>Número de lote</p>
<p></p> <p>Consult instructions for use</p> <p>Consultar las instrucciones de uso</p>		<p>Temperature limitation</p> <p>Limitación de temperatura</p>		<p>Contains sufficient for <n> test</p> <p>Contiene <n> test</p>	<p>DIL</p>	<p>Sample diluent</p> <p>Diluyente de muestra</p>		<p>Catalogue number</p> <p>Número de referencia</p>



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

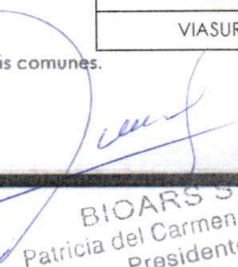
Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Optical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

- (1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.
- (3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.
- (4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.
- (5) No lectura en canal Cy5.
- (6) Lectura solo en canales FAM y HEX.


Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.



 BIOCARS S.A.

 Patricia del Carmen Etchevés

 Presidente



 35

ANEXO 2

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 Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquaring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real

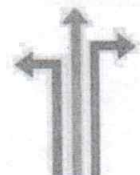
ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.


*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

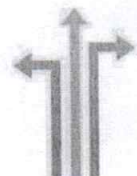


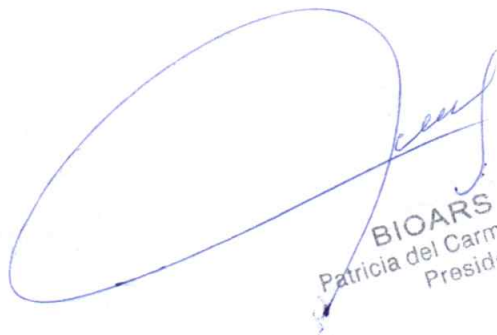
- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: February 2021

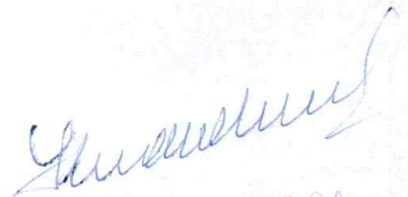

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO





BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidenta



BIOARS S.A.
BIOO. CLAUDIA ETICHEVÈS
DIRECTOR TÉCNICO





CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II - Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC

Patricia de Carrizosa
BIOTEC S.L.
Patricia de Carrizosa
President

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina (CLR) en biopsias (tejido gástrico) procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección gastrointestinal. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las biopsias gástricas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina. El ensayo para detectar la resistencia a CLR está basado en la detección de mutaciones puntuales en el gen 23S rRNA.

2. Introducción y explicación

El género *Helicobacter pylori* pertenece a la familia *Helicobacteriaceae*, a la orden *Campylobacterales*. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria gram-negativa de forma de espiral microaerófila que es capaz de colonizar el epitelio gástrico humano y la parte superior del intestino delgado (duodeno).

Se estima que más de la mitad de la población está infectada con *H. pylori*, pero la mayoría de los individuos son asintomáticos. Las nuevas infecciones pueden deberse a la transmisión directa entre personas, ya sea a través de la vía oral-oral, fecal-oral o ambas. Sin embargo, no debe descartarse el papel de la forma cocoide de *H. pylori* como un vehículo de infección a partir de diferentes fuentes de transmisión, como los alimentos y el agua. *H. pylori* está implicado en la patogénesis de la gastritis atrófica, úlcera gastroduodenal, cáncer gástrico y linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT).

En la actualidad, hay varios ensayos diagnósticos disponibles para la detección de *H. pylori* agrupados como "invasivos" o "no invasivos" pero ninguno de ellos puede considerarse *gold standard* por sí solo. Los métodos invasivos incluyen histología, cultivo y test rápido de ureasa, lo que requiere muestras de biopsia gástrica obtenidas mediante una gastroscopia. Los métodos no invasivos incluyen la detección del antígeno en heces, pruebas serológicas y prueba del aliento (UBT) entre otros.

La ureasa es un factor importante para el mantenimiento y la virulencia de la bacteria en la mucosa gástrica. Se compone de dos subunidades estructurales codificadas por genes, *ureA* y *ureB*, que han sido utilizadas frecuentemente como genes diana para la detección específica de *H. pylori*.

La claritromicina es un antibiótico bacteriostático que se usa principalmente en la infancia para tratar las infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores, pero su indicación para tratar *H. pylori* es la más utilizada. El modo de acción principal de la claritromicina, como uno de los antibióticos de amplio espectro utilizados en la terapia contra *H. pylori*, es prevenir la traducción de proteínas. Después de la primera exposición a la claritromicina, las mutaciones espontáneas (en ambos operones de 23S rRNA) confieren genotipo y fenotipo de resistencia a *H. pylori*. El impacto directo de estas mutaciones es la aparición de cepas de *H. pylori* resistentes



a la claritromicina. Hasta ahora, las dos mutaciones principales son A2142G y A2143G, se consideraron como la principal causa de resistencia a los antibióticos clínicos aislados.

3. Procedimiento

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *H. pylori*, la resistencia a Claritromicina y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA en biopsias (tejido gástrico). Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *H. pylori*, la resistencia a Claritromicina y/o Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes *ureB* y 23S rRNA para *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA respectivamente.

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la amplificación, las mutaciones puntuales en el gen 23S rRNA de *H. pylori* (A2142G y A2143G), que le confieren resistencia a Claritromicina se detectan en el canal FAM, *H. pylori* se detecta en el canal ROX, Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA se detecta en el canal HEX, VIC o JOE y el control interno (CI) se detecta en el canal Cy5 (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	4 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CLA196T.



5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo tubos individuales, tiras de tubos y/o placas).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL. y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

VIASURE *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar los kits de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, excepto el tubo de Reaction-Mix rehidratado. Una vez el vial *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* Reaction-Mix ha sido reconstituido puede mantenerse a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).
- El vial con la mezcla de reacción rehidratada que no se utilice, se debe cerrar y almacenar en el interior del pouch con el material desecante para protegerlo de la luz y la humedad.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

8.1. Preparación de la muestra

Las biopsias (tejido gástrico) se deben recoger en recipientes limpios y deben ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda el uso de muestras frescas.

Para conservar durante un tiempo prolongado, las muestras pueden congelarse a -20°C o -80°C . En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba.

No se recomiendan ciclos de congelación y descongelación. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

8.1.1. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA a partir de biopsias (tejido gástrico) puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado*.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- ZP02004 MagPurix Tissue DNA Extraction Kit and ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit (muestras de biopsias), utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.)
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).

**Con el fin de mejorar el rendimiento y la calidad del DNA bacteriano de las biopsias, se recomienda el tratamiento previo de la muestra con lisozima a 37°C como se describe en las "Instrucciones de uso" para el aislamiento de DNA bacteriano. Además, la utilización de pequeños volúmenes de elución puede elevar la concentración de DNA.*

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *H. pylori* + Clarithromycin resistance Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *H. pylori* + Clarithromycin resistance Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C . Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a $25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ o $2-8^{\circ}\text{C}$ hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

8.4. Protocolo PCR

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

Añadir 15 μL de *H. pylori* + Clarithromycin resistance Reaction-Mix (vial blanco) en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 μL de DNA extraído de cada muestra, de *H. pylori* + Clarithromycin resistance Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) en diferentes pocillos y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	63°C

Tabla 2. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (resistencia a Claritromicina), ROX (*H. pylori*), HEX, JOE o VIC (Clarithromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA) y Cy5 (CI). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *H. pylori* + Clarithromycin resistance. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con

el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para considerar que una muestra contiene *H. pylori* resistente y/o sensible a claritromicina ésta debe ser *H. pylori* positiva. Además, se recomienda verificar el nivel de fluorescencia en los canales FAM y HEX para discriminar entre resistencia a Claritromicina y/o Claritromicina con secuencia wild-type.

Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

Resistencia a Claritromicina (FAM)	<i>H. pylori</i> (ROX)	Claritromicina secuencia wild-type (HEX)	Control interno (Cy5)	Control negativo	Control positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> positivo. Resistencia a Claritromicina positiva y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva ^a
+	+	-	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> positivo y Resistencia a Claritromicina positiva; Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA negativa ^b
-	+	+	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> positivo y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva, Resistencia a Claritromicina negativa ^c
+	-	+	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> negativo; Resistencia a Claritromicina positiva y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva
-	-	-	+	-	+	<i>H. pylori</i> negativo, Resistencia a Claritromicina negativa y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA negativa
-	-	+	+/-	-	+	Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva
+	-	-	+/-	-	+	Resistencia a Claritromicina positiva
-	+	-	+/-	-	+	Inválido
-	-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	+	Inválido

Tabla 3. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

^a Presencia de cepas resistentes a Claritromicina y con secuencia wild-type simultáneamente en la misma muestra clínica. Deben observarse niveles de fluorescencia similares en los canales HEX y FAM. Por el contrario, si se observan diferencias entre la señal fluorescente de ambos canales, observe la posibilidad de interpretación ^b o ^c.

^b Se puede observar un pequeño nivel de fluorescencia en los canales HEX.

^c Se puede observar un pequeño nivel de fluorescencia en los canales de FAM.



Figura 1 y 2. Ejecución correcta de muestra de resistencia a claritromicina y *H. pylori* positivo y pequeño nivel de fluorescencia en canales HEX (wild-type) ejecutados en Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR System (Figura 1) y ejecución correcta de *H. pylori* positivo y de secuencia wild-type la muestra y el pequeño nivel de fluorescencia en los canales de FAM (resistencia a la claritromicina) se ejecutan en Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR System (Figura 2).

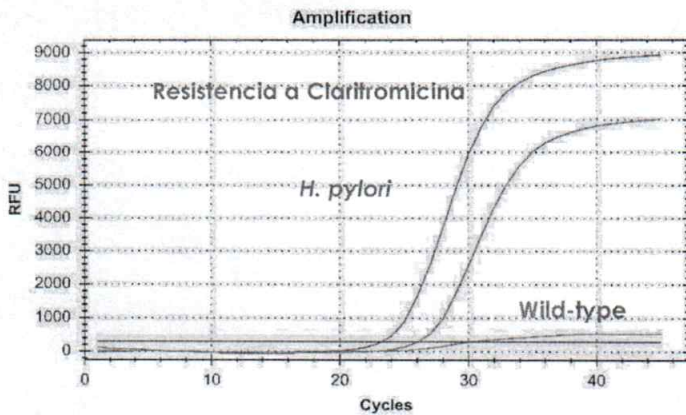


Figura 1

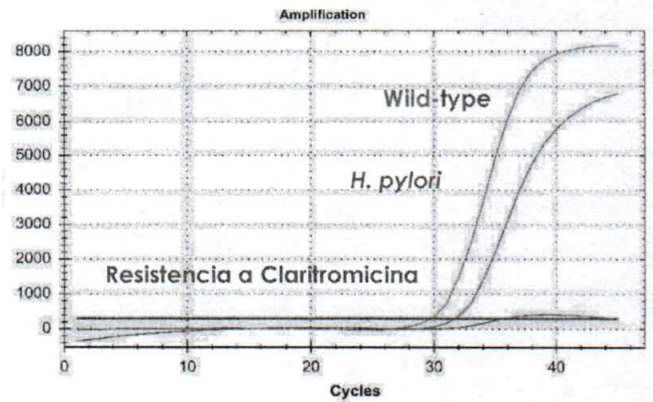
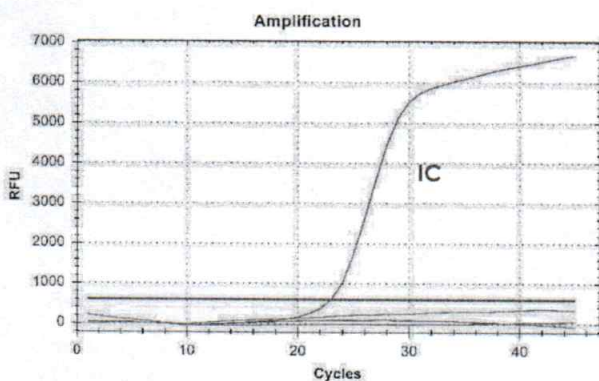


Figura 2

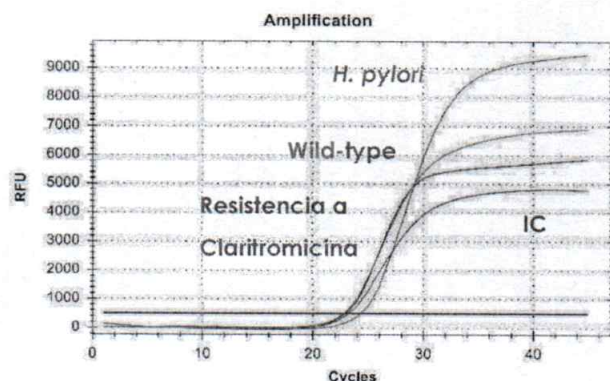
Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

Figura 3. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR System.



Control Negativo



Control Positivo

El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque ha sido validado solo con DNA extraído de biopsias (tejido gástrico) humanas.
- 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. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina, *H. pylori* y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas pueden afectar la detección de nuevas variantes, lo que da como resultado un falso negativo con VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit.
- Otras especies diferentes de *H. pylori* podrían portar diferentes alelos en el gen de 23S rRNA y dar resultados positivos a las secuencias wild-type de claritromicina y / o la resistencia a la claritromicina.

11. Control de calidad

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron biopsias de tejido gástrico humano de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular (RIDA®GENE Helicobacter pylori (R-Biopharm)). Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE Helicobacter pylori (R-Biopharm)			
		+	-	Total
	+	99	3*	102
	-	2*	102	104
Total	101	105	206	

Tabla 4. Comparativa de resultados para *H. pylori*.

*La baja cantidad de DNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado.

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE Helicobacter pylori (R-Biopharm)			
		+	-	Total
	+	23	0	23
	-	2#	77	79
Total	25	77	102	

Tabla 5. Comparativa de resultados para Clarithromycin resistance.

Estas 2 muestras son cepas sensibles a Claritromicina según VIASURE y cepas resistentes a Claritromicina según R-biopharm. Son cepas sensibles a Claritromicina según secuenciación, confirmando nuestros resultados.

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE Helicobacter pylori (R-Biopharm)			
		+	-	Total
	+	77	2#	79
	-	0	23	23
Total	77	25	102	

Tabla 6. Comparativa de resultados para Clarithromycin secuencias wild-type en el 23S rRNA.

Estas 2 muestras son cepas sensibles a Claritromicina según VIASURE y cepas resistentes a Claritromicina según R-biopharm. Son cepas sensibles a Claritromicina según secuenciación, confirmando nuestros resultados.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina; utilizando VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina. (Figura 4, 5 y 6).

Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar Clarithromycin resistance (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96TM Real-Time PCR System (canal FAM).

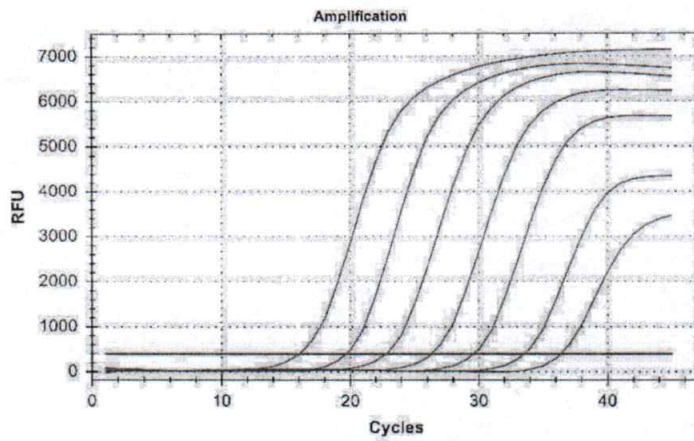


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar *H. pylori* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96TM Real-Time PCR System (canal ROX).

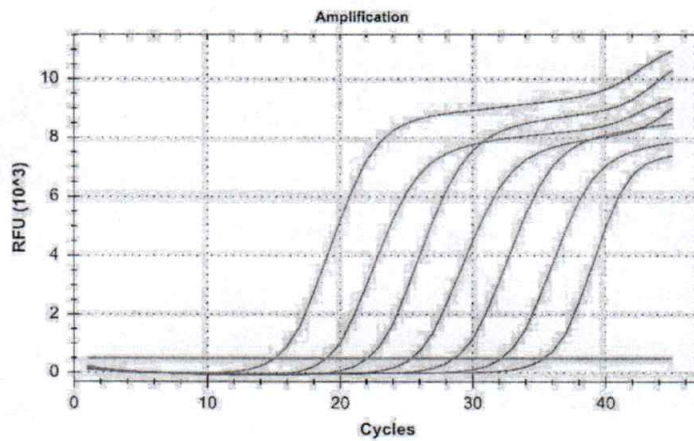
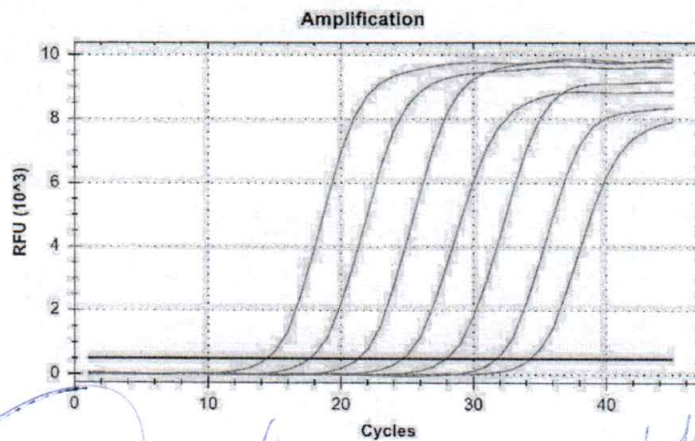


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar Clarithromycin secuencia wild-type (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo AriaMx Real-Time PCR System (canal HEX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *H. pylori* + Clarithromycin resistance fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos entéricos más comunes o que pueden estar presentes en la flora intestinal. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, con la excepción de *H. heilmannii*, que junto con *H. pylori* puede causar gastritis crónica en humanos.

Prueba de reacción cruzada					
<i>Helicobacter felis</i> *	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
<i>Helicobacter hepaticus</i> *	-	<i>Campylobacter hyointestinalis</i> *	-	<i>Arcobacter butzleri</i>	-
<i>Helicobacter cinaedi</i> *	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Helicobacter heilmannii</i> *	-/+	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3*	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Salmonella paratyphi</i> A	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	Adenovirus serotipos 40/41	-
<i>Salmonella paratyphi</i> B	-	<i>Clostridium difficile</i> 027*	-	Adenovirus serotipos 1-5	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Adenovirus serotipos 8/15/31	-
<i>Salmonella bongori</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica	-	Rotavirus A	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica	-	Norovirus Genotipos I y II	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva	-	Astrovirus Genotype I-VIII	-
<i>Salmonella pullorum</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena	-	Sapovirus	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> *	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> *	-	<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-
<i>Campylobacter coli</i> *	-	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i> *	-	<i>Giardia intestinalis</i> *	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Dientamoeba fragilis</i>	-

Tabla 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

*Estos organismos muestran señal de amplificación en el canal de Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA.

La especificidad del ensayo de resistencia a claritromicina fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Prueba de reacción cruzada			
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315 resistente a la meticilina	-	<i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ST398 resistente a la meticilina	-	Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> mecC resistente a la meticilina	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2146G)	-/+
Aislado cMRSA (oxaP, PVL-positive, spa:t 310)	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2147G)	-/+
Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48	-	<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	-
Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48	-	<i>Enterococcus faecium</i> cepa LMG16165 tipo VanA	-
Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) y KPC-2	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1 tipo VanA	-
<i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2 tipo VanB	-
<i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-	<i>E. faecalis</i> (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz tipo VanB	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142 tipos VanC y VanB	-
<i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC	-

Tabla 8. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit para *Helicobacter pylori* se evaluó frente a las cepas de *Helicobacter pylori* J99 y Sydney, mostrando un resultado positivo.











La reactividad de VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit para la resistencia a Claritromicina se evaluó frente a cepas de *H. pylori* wild-type y portadoras de las mutaciones puntuales A2142G y A2143G, mostrando un resultado negativo y positivo respectivamente.

13. Bibliography/Bibliografía

1. C. Schabereiter-Gurtner *et al.* Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(10): 4512-4518.
2. J.G. Kusters *et al.* Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19(3): 449-490.
3. F. Can *et al.* Urease activity and urea gene sequencing of coccoid forms of *Helicobacter pylori* induced by different factors. *Current Microbiology* 2008; 56(2): 150-155.
4. R.X. Tang *et al.* Diversity of *Helicobacter pylori* isolates in expression of antigens and induction of antibodies. *World Journal of Gastroenterology* 2008; 14(30): 4816-4822.

5. S.K. Patel *et al.* Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World Journal of Gastroenterology* 2014; 20(36): 12847-12859.
6. M. Varbanova *et al.* Chronic gastritis-an update. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology* 2014; 28(6): 1031-1042.
7. Abadi A.T.B. *et al.* Resistance to clarithromycin and gastroenterologist's persistence roles in nomination for *Helicobacter pylori* as high priority pathogen by World Health Organization. *World Journal of Gastroenterology* 2017; 23(35): 6379-6384.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

<p> IVD</p> <p><i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i></p>	<p> Keep dry Almacenar en lugar seco</p>	<p> Use by Fecha de caducidad</p>	<p> Manufacturer Fabricante</p>	<p> LOT Batch code Número de lote</p>
<p> Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso</p>	<p> Temperature limitation Limitación de temperatura</p>	<p> Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test</p>	<p> DIL Sample diluent Diluyente de muestra</p>	<p> REF Catalogue number Número de referencia</p>



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

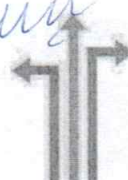
Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
 (2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.
 (3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.
 (4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.
 (5) No lectura en canal Cy5.
 (6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.

BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Tabares
 Presidente

BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHEVE-31
 DIRECTORA TÉCNICA



ANEXO 2

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 Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real

- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: December 2020

IU-CLA196Tenes1220 rev.00

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Trévés
Presidenta

Claudia Echeves

BIOARS S.A.
D^{CA} CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TÉCNICO







CerTest Biotec, S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, N°1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC

Handwritten: BIONIS S.L.
Parque de Cerros Biotec
Zaragoza

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

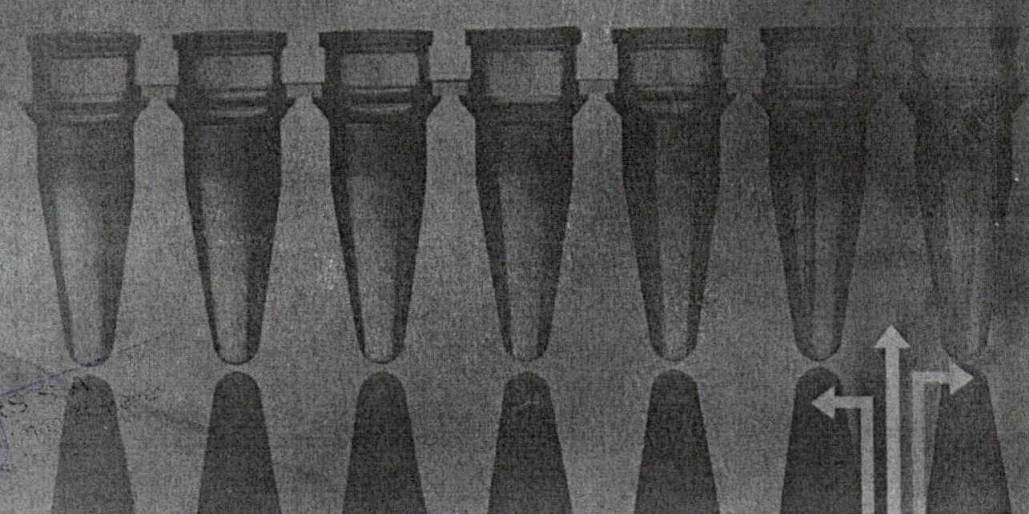
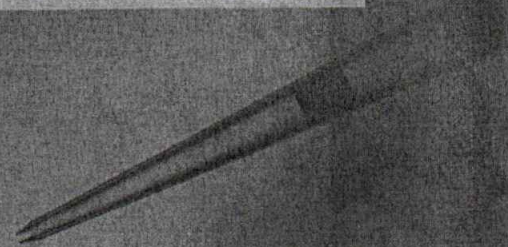
H. pylori + Clarithromycin resistance

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit

VS-CLA19&TE

Handwritten signature
BIOTEC



Handwritten signature
BIOTEC

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina (CLR) en biopsias (tejido gástrico) procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección gastrointestinal. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las biopsias gástricas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina. El ensayo para detectar la resistencia a CLR está basado en la detección de mutaciones puntuales en el gen 23S rRNA.

2. Introducción y explicación

El género *Helicobacter pylori* pertenece a la familia *Helicobacteriaceae*, a la orden *Campylobacterales*. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria gram-negativa de forma de espiral microaerofílica que es capaz de colonizar el epitelio gástrico humano y la parte superior del intestino delgado (duodeno).

Se estima que más de la mitad de la población está infectada con *H. pylori*, pero la mayoría de los individuos son asintomáticos. Las nuevas infecciones pueden deberse a la transmisión directa entre personas, ya sea a través de la vía oral-oral, fecal-oral o ambas. Sin embargo, no debe descartarse el papel de la forma cocoide de *H. pylori* como un vehículo de infección a partir de diferentes fuentes de transmisión, como los alimentos y el agua. *H. pylori* está implicado en la patogénesis de la gastritis atrófica, úlcera gastroduodenal, cáncer gástrico y linfoma gástrico de tejido linfóide asociado a la mucosa (MALT).

En la actualidad, hay varios ensayos diagnósticos disponibles para la detección de *H. pylori* agrupados como "invasivos" o "no invasivos" pero ninguno de ellos puede considerarse *gold standard* por sí solo. Los métodos invasivos incluyen histología, cultivo y test rápido de ureasa, lo que requiere muestras de biopsia gástrica obtenidas mediante una gastroscopia. Los métodos no invasivos incluyen la detección del antígeno en heces, pruebas serológicas y prueba del aliento (UBT) entre otros.

La ureasa es un factor importante para el mantenimiento y la virulencia de la bacteria en la mucosa gástrica. Se compone de dos subunidades estructurales codificadas por genes, *ureA* y *ureB*, que han sido utilizadas frecuentemente como genes diana para la detección específica de *H. pylori*.

La claritromicina es un antibiótico bacteriostático que se usa principalmente en la infancia para tratar las infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores, pero su indicación para tratar *H. pylori* es la más utilizada. El modo de acción principal de la claritromicina, como uno de los antibióticos de amplio espectro utilizados en la terapia contra *H. pylori*, es prevenir la traducción de proteínas. Después de la primera exposición a la claritromicina, las mutaciones espontáneas (en ambos operones de 23S rRNA) confieren genotipo y fenotipo de resistencia a *H. pylori*. El impacto directo de estas mutaciones es la aparición de cepas de *H. pylori* resistentes

a la claritromicina. Hasta ahora, las dos mutaciones principales son A2142G y A2143G, se consideraron como la principal causa de resistencia a los antibióticos clínicos aislados.

3. Procedimiento

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *H. pylori*, la resistencia a Claritromicina y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA en biopsias (tejido gástrico). Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *H. pylori*, la resistencia a Claritromicina y/o Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes *ureB* y 23S rRNA para *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA respectivamente.

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede adicionarse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa. Tras la amplificación, las mutaciones puntuales en el gen 23S rRNA de *H. pylori* (A2142G y A2143G), que le confieren resistencia a Claritromicina se detectan en el canal FAM, *H. pylori* se detecta en el canal ROX, Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA se detecta en el canal HEX, VIC o JOE y el control de Extracción (CE) se detecta en el canal Cy5 (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1.



Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	4 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CLA196T.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo tubos individuales, tiras de tubos y/o placas).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

- Almacenar los kits de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, excepto el tubo de Reaction-Mix rehidratado. Una vez el vial *H. pylori + Clarithromycin resistance* ha sido reconstituido puede mantenerse a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).
- El vial con la mezcla de reacción rehidratada que no se utilice, se debe cerrar y almacenar en el interior del pouch con el material desecante para protegerlo de la luz y la humedad.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.

- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

8.1. Control de extracción liofilizado

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

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

8.2. Preparación de la muestra

Las biopsias (tejido gástrico) se deben recoger en recipientes limpios y deben ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda el uso de muestras frescas.

Para conservar durante un tiempo prolongado, las muestras pueden congelarse a -20°C o -80°C . En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. No se recomiendan ciclos de congelación y descongelación. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

8.2.1. Extracción de DNA

Si el Control de Extracción se utiliza para monitorizar el proceso de aislamiento de los ácidos nucleicos y como control de la posible inhibición de la PCR, añadir 5 μ L del CE a la muestra o a la mezcla del tampón de lisis-muestra. (muestras clínicas, control positivo y/o negativo). Cerrar cada uno de los tubos y mezclar con la ayuda del vórtex durante 10 segundos.

Si el Control de Extracción se emplea sólo como control de inhibición de la PCR, añadir 1 μ L de CE a la mezcla de reacción reconstituida.

Para la extracción de DNA a partir de biopsias (tejido gástrico) puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado*.

- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- ZP02004 MagPurix Tissue DNA Extraction Kit and ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit (muestras de biopsias), utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.)
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).

*Con el fin de mejorar el rendimiento y la calidad del DNA bacteriano de las biopsias, se recomienda el tratamiento previo de la muestra con lisozima a 37°C como se describe en las "Instrucciones de uso" para el aislamiento de DNA bacteriano. Además, la utilización de pequeños volúmenes de elución puede elevar la concentración de DNA.

8.3. Control positivo liofilizado

El vial de *H. pylori* + Clarithromycin resistance Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *H. pylori* + Clarithromycin resistance Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.4. Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

8.5. Protocolo PCR

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

Añadir 15 µL de *H. pylori* + Clarithromycin resistance Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.



2) Añadir muestras y controles.

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

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

Añadir 5 µL de *H. pylori* + Clarithromycin resistance Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

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

Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	63°C

Tabla 2. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (resistencia a Claritromicina), ROX (*H. pylori*), HEX, JOE o VIC (Clarithromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA) y Cy5 (Control de extracción). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *H. pylori* + Clarithromycin resistance. Comprobar la emisión de la señal del Control de Extracción (CE) para verificar el proceso de extracción y el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para considerar que una muestra contiene *H. pylori* resistente y/o sensible a claritromicina ésta debe ser *H. pylori* positiva. Además, se recomienda verificar el nivel de fluorescencia en los canales FAM y HEX para discriminar entre resistencia a Claritromicina y/o Claritromicina con secuencia wild-type. Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

Resistencia a Claritromicina (FAM)	<i>H. pylori</i> (ROX)	Claritromicina secuencia wild-type (HEX)	Control de extracción (Cy5)	Control negativo	Control positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> positivo, Resistencia a Claritromicina positiva y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva ^a
+	+	-	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> positivo y Resistencia a Claritromicina positiva; Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA negativa ^b
-	+	+	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> positivo y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva, Resistencia a Claritromicina negativa ^c
+	-	+	+/-	-	+	<i>H. pylori</i> negativo; Resistencia a Claritromicina positiva y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva
-	-	-	+	-	+	<i>H. pylori</i> negativo, Resistencia a Claritromicina negativa y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA negativa
-	-	+	+/-	-	+	Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA positiva
+	-	-	+/-	-	+	Resistencia a Claritromicina positiva
-	+	-	+/-	-	+	Inválido
-	-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	+	Inválido

Tabla 3. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

^a Presencia de cepas resistentes a Claritromicina y con secuencia wild-type simultáneamente en la misma muestra clínica. Deben observarse niveles de fluorescencia similares en los canales HEX y FAM. Por el contrario, si se observan diferencias entre la señal fluorescente de ambos canales, observe la posibilidad de interpretación ^b o ^c.

^b Se puede observar un pequeño nivel de fluorescencia en los canales HEX.

^c Se puede observar un pequeño nivel de fluorescencia en los canales de FAM.



Figura 1 y 2. Ejecución correcta de muestra de resistencia a claritromicina y *H. pylori* positivo y pequeño nivel de fluorescencia en canales HEX (wild-type) ejecutados en Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR System (Figura 1) y ejecución correcta de *H. pylori* positivo y de secuencia wild-type la muestra y el pequeño nivel de fluorescencia en los canales de FAM (resistencia a la claritromicina) se ejecutan en Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR System (Figura 2).

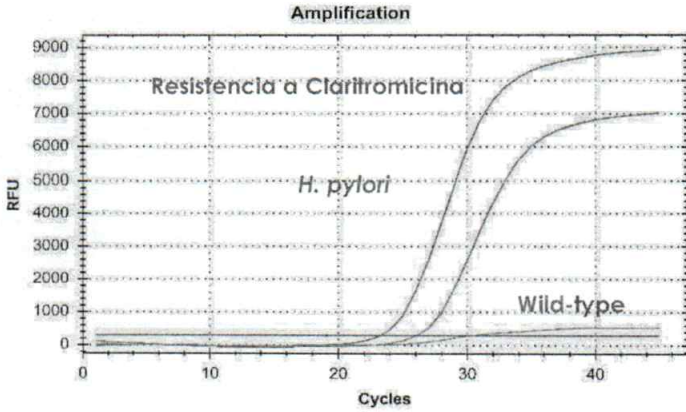


Figura 1

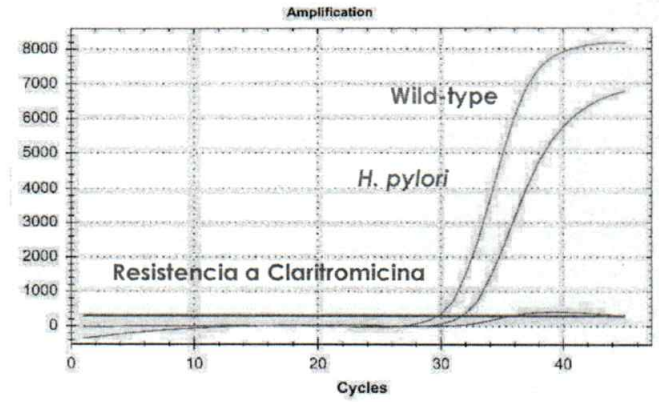
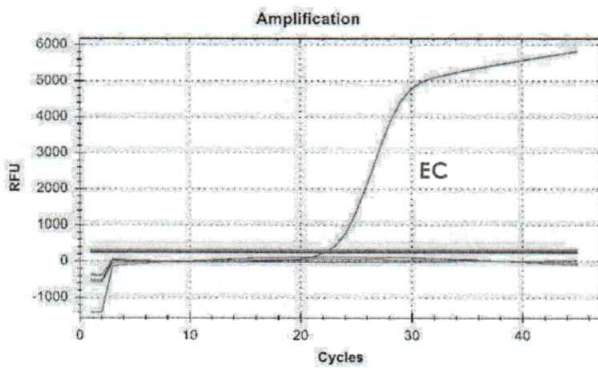


Figura 2

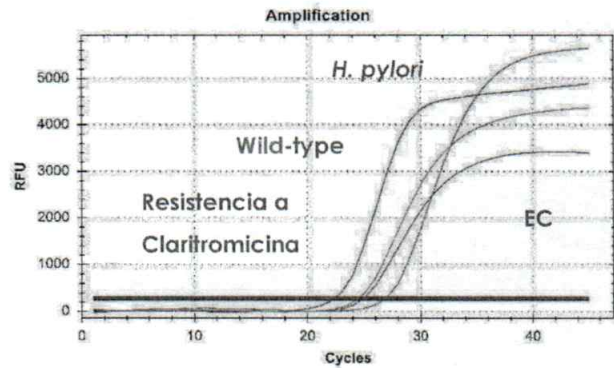
Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el Control de Extracción muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del Control Extraction no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el Control de Extracción si la presenta. Un fallo en el proceso de extracción y la inhibición de la reacción de PCR pueden ser excluidas por la amplificación del Control de Extracción

Figura 3. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR System.



Control Negativo



Control Positivo

El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de ambos, el Control de Extracción y de la muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas durante la purificación de los ácidos nucleicos de y/o inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

En los controles de extracción se pueden observar diferencias en los valores de Ct entre las muestras control (control negativo y control positivo) y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

Para muestras en el límite de detección (LOD) o muestras negativas con un valor de Ct para el control de extracción ≥ 35 , se recomienda filtrar la muestra, o diluir el extraído (1:10 and 1:100) para evitar las posibles interferencias e inhibidores en la reacción de amplificación. Conviene revisar las instrucciones de uso del proceso de extracción empleado por el usuario.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque ha sido validado solo con DNA extraído de biopsias (tejido gástrico) humanas.
- 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. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina, *H. pylori* y Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas pueden afectar la detección de nuevas variantes, lo que da como resultado un falso negativo con VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit.
- Otras especies diferentes de *H. pylori* podrían portar diferentes alelos en el gen de 23S rRNA y dar resultados positivos a las secuencias wild-type de claritromicina y / o la resistencia a la claritromicina.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *H. pylori* + Clarithromycin resistance Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el Agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos de debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.

11. Control de calidad

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control de extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron biopsias de tejido gástrico humano de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular (RIDA®GENE Helicobacter pylori (R-Biopharm)). Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE Helicobacter pylori (R-Biopharm)			Total
		+	-	
+	99	3*	102	
-	2*	102	104	
Total	101	105	206	

Tabla 4. Comparativa de resultados para *H. pylori*.

*La baja cantidad de DNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado.

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE Helicobacter pylori (R-Biopharm)			Total
		+	-	
+	23	0	23	
-	2#	77	79	
Total	25	77	102	

Tabla 5. Comparativa de resultados para Clarithromycin resistance.

Estas 2 muestras son cepas sensibles a Claritromicina según VIASURE y cepas resistentes a Claritromicina según R-biopharm. Son cepas sensibles a Claritromicina según secuenciación, confirmando nuestros resultados.

VIASURE <i>H. pylori</i> + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE Helicobacter pylori (R-Biopharm)		
		+	-
+	77	2*	79
-	0	23	23
Total	77	25	102

Tabla 6. Comparativa de resultados para Clarithromycin secuencias wild-type en el 23S rRNA.

Estas 2 muestras son cepas sensibles a Claritromicina según VIASURE y cepas resistentes a Claritromicina según R-biopharm. Son cepas sensibles a Claritromicina según secuenciación, confirmando nuestros resultados.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina; utilizando VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina. (Figura 4, 5 y 6).

Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar Clarithromycin resistance (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96TM Real-Time PCR System (canal FAM).

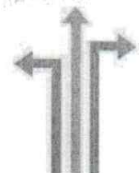
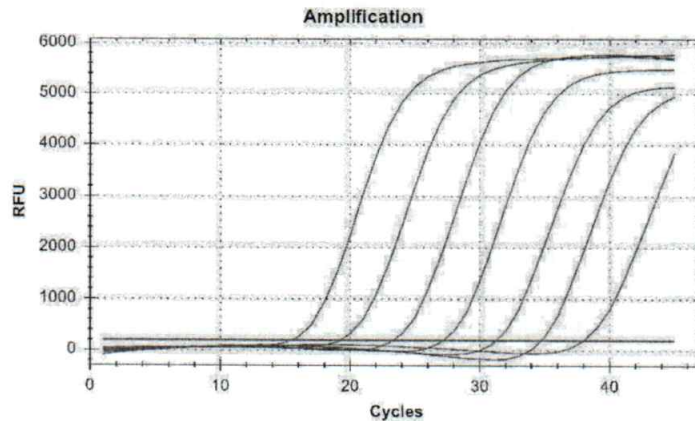


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar *H. pylori* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96TM Real-Time PCR System (canal ROX).

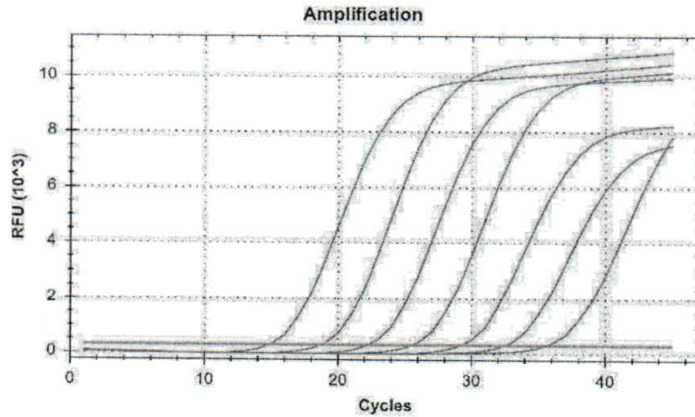
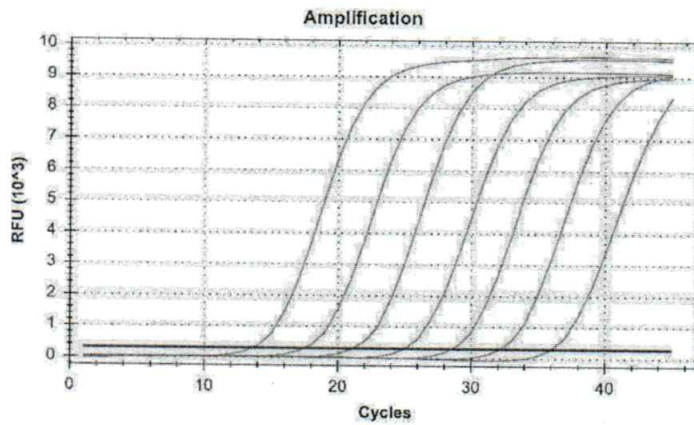
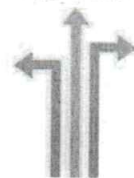


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar Clarithromycin secuencia wild-type (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo AriaMx Real-Time PCR System (canal HEX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *H. pylori* + *Clarithromycin resistance* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos entéricos más comunes o que pueden estar presentes en la flora intestinal. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, con la excepción de *H. heilmannii*, que junto con *H. pylori* puede causar gastritis crónica en humanos.

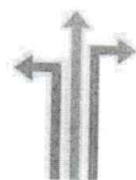


Prueba de reacción cruzada					
<i>Helicobacter felis</i> *	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
<i>Helicobacter hepaticus</i> *	-	<i>Campylobacter hyointestinalis</i> *	-	<i>Arcobacter butzleri</i>	-
<i>Helicobacter cinaedi</i> *	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Helicobacter heilmannii</i> *	-/+	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3*	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Salmonella paratyphi</i> A	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	Adenovirus serotipos 40/41	-
<i>Salmonella paratyphi</i> B	-	<i>Clostridium difficile</i> 027*	-	Adenovirus serotipos 1-5	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Adenovirus serotipos 8/15/31	-
<i>Salmonella bongori</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica	-	Rotavirus A	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica	-	Norovirus Genotipos I y II	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva	-	Astrovirus Genotype I-VIII	-
<i>Salmonella pullorum</i>	-	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena	-	Sapovirus	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> *	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> *	-	<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-
<i>Campylobacter coli</i> *	-	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i> *	-	<i>Giardia intestinalis</i> *	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Dientamoeba fragilis</i>	-

Tabla 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

*Estos organismos muestran señal de amplificación en el canal de Claritromicina con secuencia wild-type en 23S rRNA.

La especificidad del ensayo de resistencia a claritromicina fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.



Prueba de reacción cruzada			
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315 resistente a la meticilina	-	<i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ST398 resistente a la meticilina	-	Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> mecC resistente a la meticilina	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2146G)	-/+
Aislado cMRSA (oxa ⁸ , PVL-positive, spa:t 310)	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2147G)	-/+
Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48	-	<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	-
Aislado <i>Klebsiella pneumonia</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48	-	<i>Enterococcus faecium</i> cepa LMG16165 tipo VanA	-
Aislado <i>Klebsiella pneumonia</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) y KPC-2	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1 tipo VanA	-
<i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2 tipo VanB	-
<i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-	<i>E. faecalis</i> (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz tipo VanB	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142 tipos VanC y VanB	-
<i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC	-

Tabla 8. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit para *Helicobacter pylori* se evaluó frente a las cepas de *Helicobacter pylori* J99 y Sydney, mostrando un resultado positivo.











La reactividad de VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit para la resistencia a Claritromicina se evaluó frente a cepas de *H. pylori* wild-type y portadoras de las mutaciones puntuales A2142G y A2143G, mostrando un resultado negativo y positivo respectivamente.

13. Bibliography/Bibliografía

1. C. Schabereiter-Gurtner et al. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(10): 4512-4518.
2. J.G. Kusters et al. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19(3): 449-490.
3. F. Can et al. Urease activity and urea gene sequencing of coccoid forms of *Helicobacter pylori* induced by different factors. *Current Microbiology* 2008; 56(2): 150-155.
4. R.X. Tang et al. Diversity of *Helicobacter pylori* isolates in expression of antigens and induction of antibodies. *World Journal of Gastroenterology* 2008; 14(30): 4816-4822.

5. S.K. Patel *et al.* Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World Journal of Gastroenterology* 2014; 20(36): 12847-12859.
6. M. Varbanova *et al.* Chronic gastritis-an update. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology* 2014; 28(6): 1031-1042.
7. Abadi A.T.B. *et al.* Resistance to clarithromycin and gastroenterologist's persistence roles in nomination for *Helicobacter pylori* as high priority pathogen by World Health Organization. *World Journal of Gastroenterology* 2017; 23(35): 6379-6384.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

 In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico in vitro	 Keep dry Almacenar en lugar seco	 Use by Fecha de caducidad	 Manufacturer Fabricante	 Batch code Número de lote
 Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	 Temperature limitation Limitación de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	 Sample diluent Diluyente de muestra	 Catalogue number Número de referencia



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000PT™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005PT™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
 (2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.
 (3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.
 (4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.
 (5) No lectura en canal Cy5.
 (6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.

ANEXO 2

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 Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo de la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real

[Handwritten signature]

BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TÉCNICO



ANEXO 3

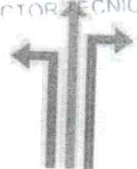
CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DPrime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.

- DLite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: September 2020

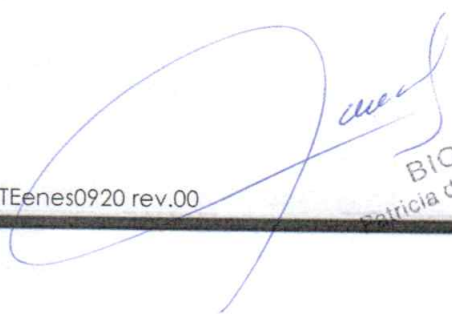
IU-CLA196TEenes0920 rev.00

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVEZ
DIRECTOR TÉCNICO



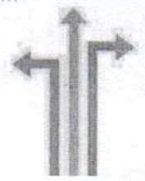
IU-CLA196TEenes0920 rev.00



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



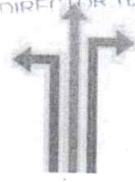
BIOARS S.A.
BIOQ CLAUDIA ETCHEVÉS
DIRECTOR TÉCNICO



IU-CLA196TEenes0920 rev.00

BIOARS S.A.
Patricia del Campo Etchev s
Presidenta

BIOARS S.A.
RIQU CLAUDIA ETCHEVE
DIRECTOR TECNICO





CerTest Blotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.cerfest.es



VIASURE online

Handwritten signature

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kit

CerTest
BIOTEC

Handwritten signature and notes

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



**Carbapenemase-producing
Enterobacteriaceae**

CE IVD

[Handwritten signature]

BIOARS S.A.
BIODIAGNOSTICA ETCHEVEZ
Santitas de los Caballeros

[Handwritten signature]

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

These instructions for use apply to the following references / Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:

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

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

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

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

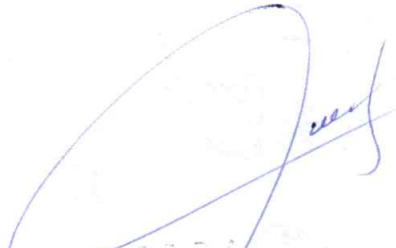
PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CPE148T

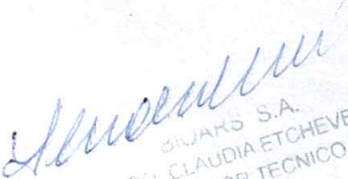
Table A 2. References for Tube format with internal control products. / Referencias para productos formato Tubo con control interno.

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

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

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


 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevès
 Presidenta


 BIOARS S.A.
 BIOG. CLAUDIA ETCHEVES
 DIRECTOR TÉCNICO

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

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

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



[Handwritten Signature]
BIOARS S.A.
BIOO CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

[Handwritten Signature]
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Echeves
Presidente

ESPAÑOL

1. Uso previsto

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

2. Introducción y explicación

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

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

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
36
BIO CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

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

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

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

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

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

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

3. Procedimiento

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

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheveas
Presidenta

37
CLAUDIA ETCHEVES
MÉDICO

VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit se basa en la actividad exonucleasa 5' de la DNA polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Dicha fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

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

4. Reactivos suministrados

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

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo, tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexos 2 y 4).
- Kit de extracción de DNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: -30°C a -10°C y / o $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20 μL , 20-200 μL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®). Solo para formato Rotor Gene (Anexos 1 y 3).

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

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta

BIOARS S.A.
BIOQ. C. A. U. D. I. A. E. T. C. H. E. V. E. S.
DIRECTOR TÉCNICO

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

Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506). Para comprobar la compatibilidad del termociclador y los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es.

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test VIASURE Real Time PCR Detection Kits. Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.

- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

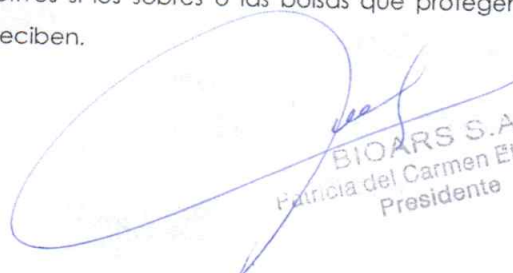
*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.
- Para kits en formato tubo: Una vez el vial *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Reaction-Mix ha sido reconstituido, puede mantenerse a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).

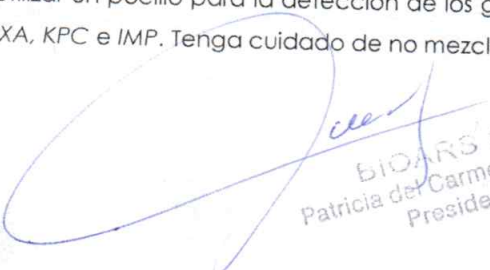
7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para las referencias VS-CPE136 y VS-CPE136E). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para VS-CPE136 y VS-CPE136E (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas, así como para evitar la contaminación.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Real Time PCR Detection Kit y cualquier otro reactivo y equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras, y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Asegúrese de utilizar un pocillo para la detección de los genes *NDM* y *VIM* y otro pocillo para la detección de los genes *OXA*, *KPC* e *IMP*. Tenga cuidado de no mezclarlos durante todo el proceso.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta


BIOARS S.A.
Claudia Etchevés
DIRECTOR TÉCNICO

- De conformidad con el Reglamento (CE) n° 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad, debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) n° 1272/2008 (CLP), o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para el "open format" y "rotor-gene format" con productos con control interno, el Anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno, el Anexo 3 para el formato open format" y "rotor-gene format" con productos con control de extracción, y el Anexo 4 para formato de tubo con productos con control de extracción.

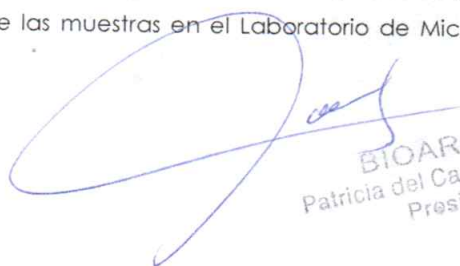
8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

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

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

En general, todas las muestras deben recolectarse y etiquetarse adecuadamente en recipientes limpios. Después de la recolección, las muestras deben colocarse en una bolsa de riesgo biológico y deben transportarse y procesarse lo antes posible para garantizar la calidad de la prueba. Las muestras deben transportarse a temperatura ambiente (TA) durante un máximo de 2 horas, o entre 2 y 8 ° C durante un máximo de 24 horas, siguiendo las normativas locales y nacionales para el transporte de material patógeno. Para el transporte a largo plazo (más de 24 horas), recomendamos el envío a -20 ° C o menos. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse entre 2 y 8 ° C hasta 24 horas o pueden congelarse a -20°C o idealmente a -80°C para su conservación durante un tiempo prolongado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con las pautas de laboratorio apropiadas. Para obtener más información, consulte la guía CDC (Specimen collection guidelines. Sitio web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>), la guía IDSA (Miller, JM, Binnicker, MJ, Campbell, S., ... y Pritt, BS (2018). Una guía para la utilización del laboratorio de microbiología para el diagnóstico de enfermedades infecciosas: actualización de 2018 del Sociedad Estadounidense de Enfermedades Infecciosas y Sociedad Estadounidense de Microbiología. *Enfermedades Infecciosas Clínicas*, 67(6), e1-e94), y García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I.,



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIO ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

(coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

8.2. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de DNA a partir de aislados bacterianos procedentes de muestras clínicas, así como de hisopos rectales, puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático o cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

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

9. Interpretación de resultados

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

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Compruebe la señal de control interno (CI) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

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

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

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

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles. CI no señal = sin curva de amplificación.

¹ En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta

BIOQ CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTORA TÉCNICA

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

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, use la siguiente tabla:

Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1			Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2			Resultado
NDM (FAM)	VIM (ROX)	Control Interno (HEX)	OXA (FAM)	KPC (ROX)	IMP (Cy5)	
\leq 40	\geq 40 o no señal	\leq 40 o no señal ¹	\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	Enterobacteriaceae que expresa NDM
\geq 40 o no señal	\leq 40	\leq 40 o no señal ¹	\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	Enterobacteriaceae que expresa VIM
\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	\leq 40 o no señal ¹	\leq 40	\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	Enterobacteriaceae que expresa OXA
\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	\leq 40 o no señal ¹	\geq 40 o no señal	\leq 40	\geq 40 o no señal	Enterobacteriaceae que expresa KPC
\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	\leq 40 o no señal ¹	\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	\leq 40	Enterobacteriaceae que expresa IMP
\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	\leq 35 ²	\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas no detectadas ²
\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	\geq 35 o no señal ¹	\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	\geq 40 o no señal	Invalído- Repita el test ²

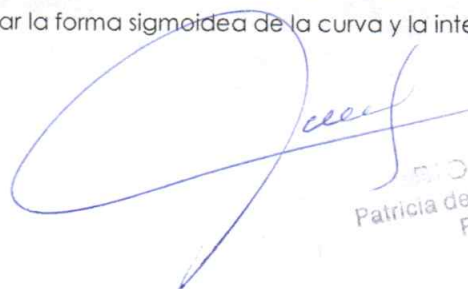
Tabla 2. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct no señal = sin curva de amplificación.

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

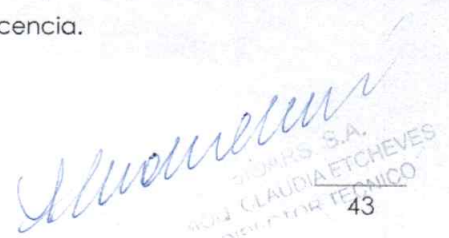
2 En el caso de que los genes diana de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas resulten negativos, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct menor de 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct \geq 35 del control interno, el resultado se considera "invalído" y se requiere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

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

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.



BIOMERS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidenta



BIOMERS S.A.
CLAUDIA ETCHEVÈS
DIRECTORA TÉCNICA

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

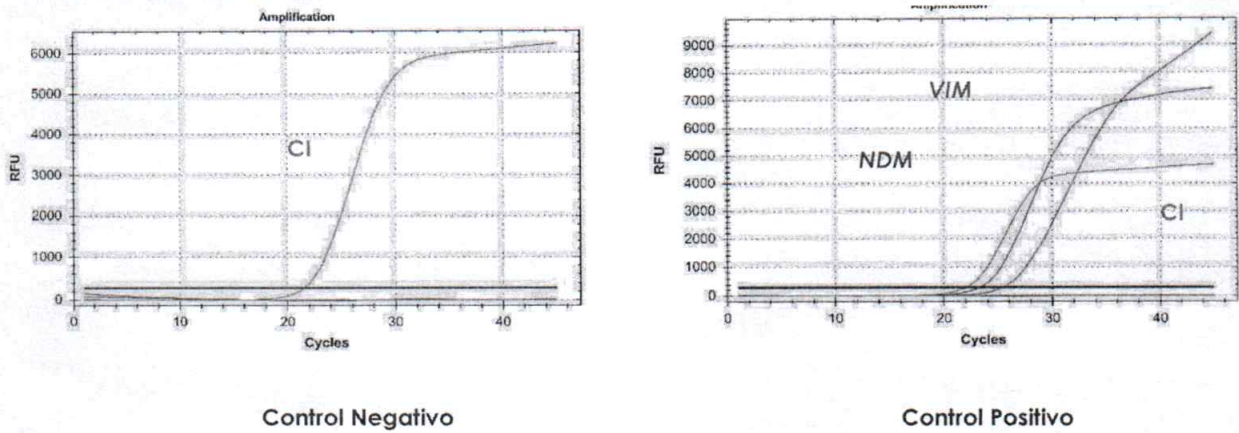
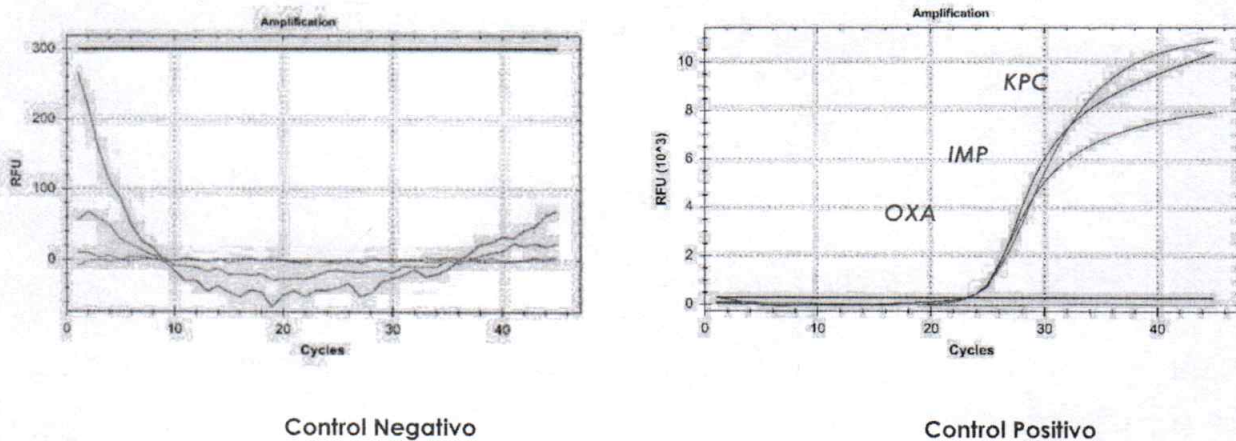


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2)



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

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Compruebe la señal del control de extracción (CE) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

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

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

[Handwritten Signature]
 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevès
 Presidente

[Handwritten Signature]
 BIOARS S.A.
 BIOQ CLAUDIA ETCHEVES
 DIRECTOR TÉCNICO

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

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles. Ct no señal = sin curva de amplificación.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

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

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, use la siguiente tabla:

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

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

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

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta

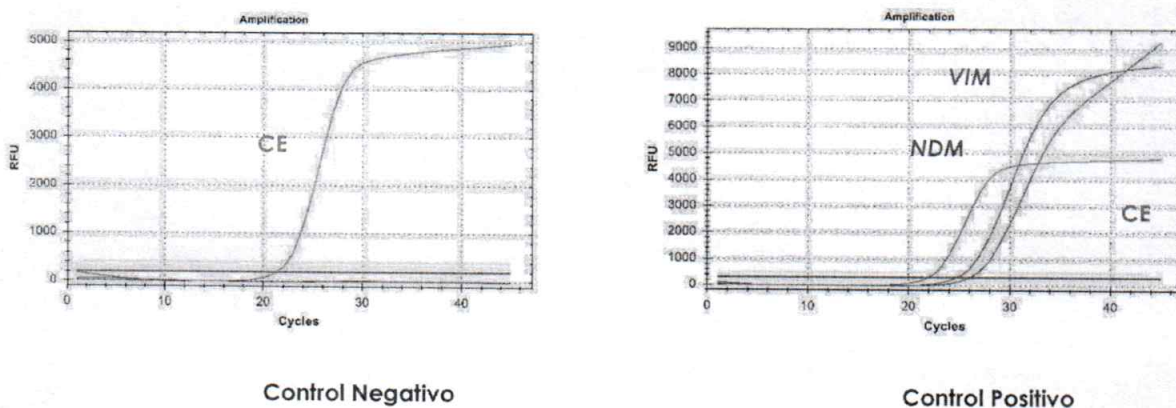
BIOARS S.A.
BIO CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTORA TÉCNICA

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

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

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

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



10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de aislados bacterianos procedentes de muestras clínicas e hisopos rectales.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es una prueba cualitativa y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.

[Handwritten signature]

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta

[Handwritten signature]

BIOARS S.A.
S.OO CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada por *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA diana o contaminación debido a productos de PCR de reacciones previas.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Degradación del DNA durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Una carga bacteriana en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir infecciones por resistencias a antibióticos o durante el tratamiento de la infección.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de patógenos viables y no implica que dichos patógenos sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias diana de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas (genes *NDM*, *VIM*, *KPC*, *OXA* e *IMP*).
- Resultados negativos no excluyen padecer infección por de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas, y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de la carga bacteriana durante las infecciones causadas por *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar los patógenos.
- Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades de resistencia a antibióticos son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado, sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.
- El análisis de la hibridación de nuestros primers con herramientas bioinformáticas (NCBI BLAST) mostró que nuestro kit detecta los siguientes miembros de cada familia de genes de carbapenemasas diana:



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



BIOARS S.A.
D.º/º CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

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

Tabla 5. Miembros de cada familia de genes de carbapenemasa detectados por VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit.

11. Control de calidad

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

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

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

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

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

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta

BIOARS S.A.
BIOO CLAUDIA FERRER
DIRECTOR TÉCNICO

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

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

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

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

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

12.2. Sensibilidad analítica

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


 Patricia del Carmen
 Presidenta


 BIOARS S.A.
 BIOQ CLAUDIA ETCHEVES
 DIRECTOR TECNICO

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

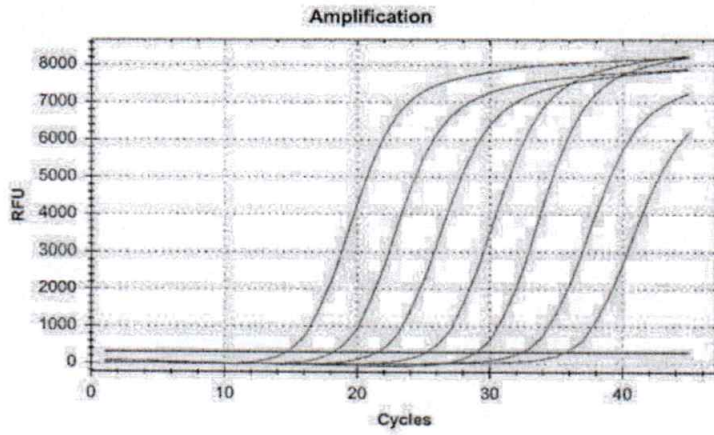


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar del gen *VIM* (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 1, canal ROX).

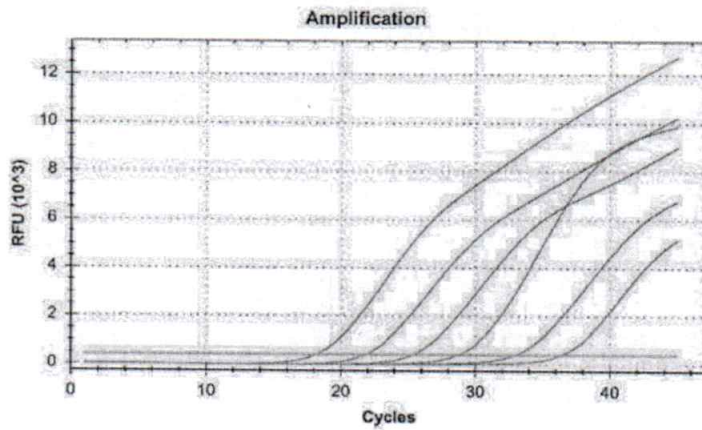
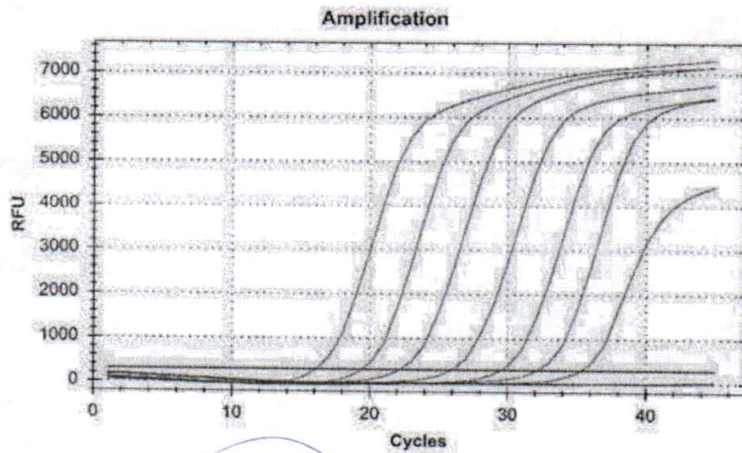


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar del gen *OXA* (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* 2, canal FAM).



ccc

BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etcheveré
 Presidente

Yanacura

BIOARS S.A.
 RÍO CLAUDIA ETCHÉVEZ
 DIRECTOR TÉCNICO

50

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

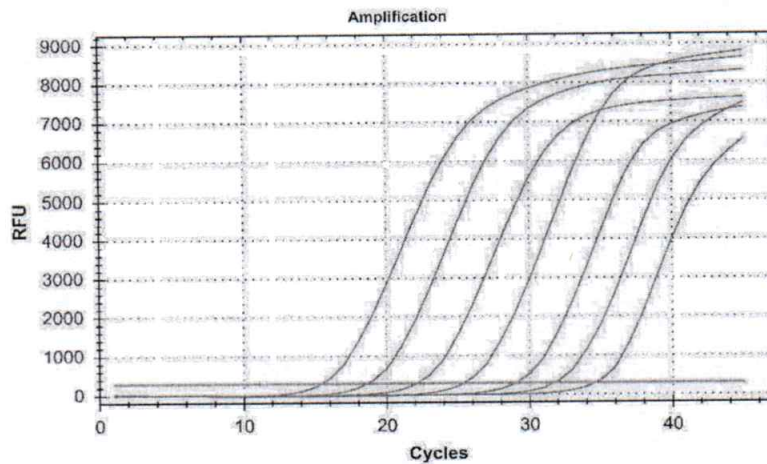
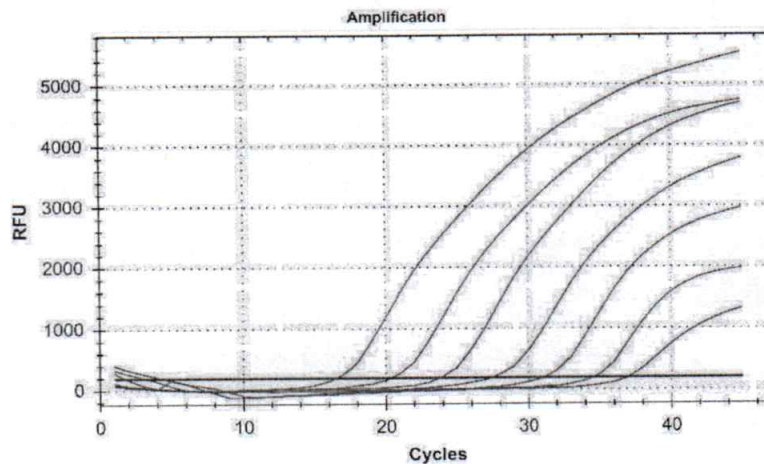


Figura 8. Diluciones seriadas de un estándar del gen IMP (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2, canal Cy5).



12.3. Especificidad analítica

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

[Handwritten signature]

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheve.
Presidente

[Handwritten signature]

BIOARS S.A.
Sra. CLAUDIA ETICHEVES
DIRECTOR TÉCNICO

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

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

12.4. Reactividad analítica

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



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchev e
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEV E
DIRECTOR TECNICO

ANEXO 1

FORMATO OPEN Y ROTOR-GENE CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

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

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

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

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

Tabla A1. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3 y A1.4. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos, y por tanto, comercializar en múltiples formatos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.4 incluye materiales y reactivos para usar con

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO


los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.cerTEST.es).

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control Interno en formato estabilizado	Blanco	1/3/6 tiras de 8 pocillos
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1/3/6 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Positive Control</i>	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/6/12 tiras de 8 tapones

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

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control Interno en formato estabilizado	Transparente	2/9 tiras de 4 pocillos
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	2/9 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Positive Control</i>	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	4/18 tiras de 4 tapones

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


 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente


 BIOARS S.A.
 CLAUDIA ETCHÉVÉS
 DIRECTOR TÉCNICO

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A1.3.2 Protocolo PCR

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

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

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

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.cerfest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

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

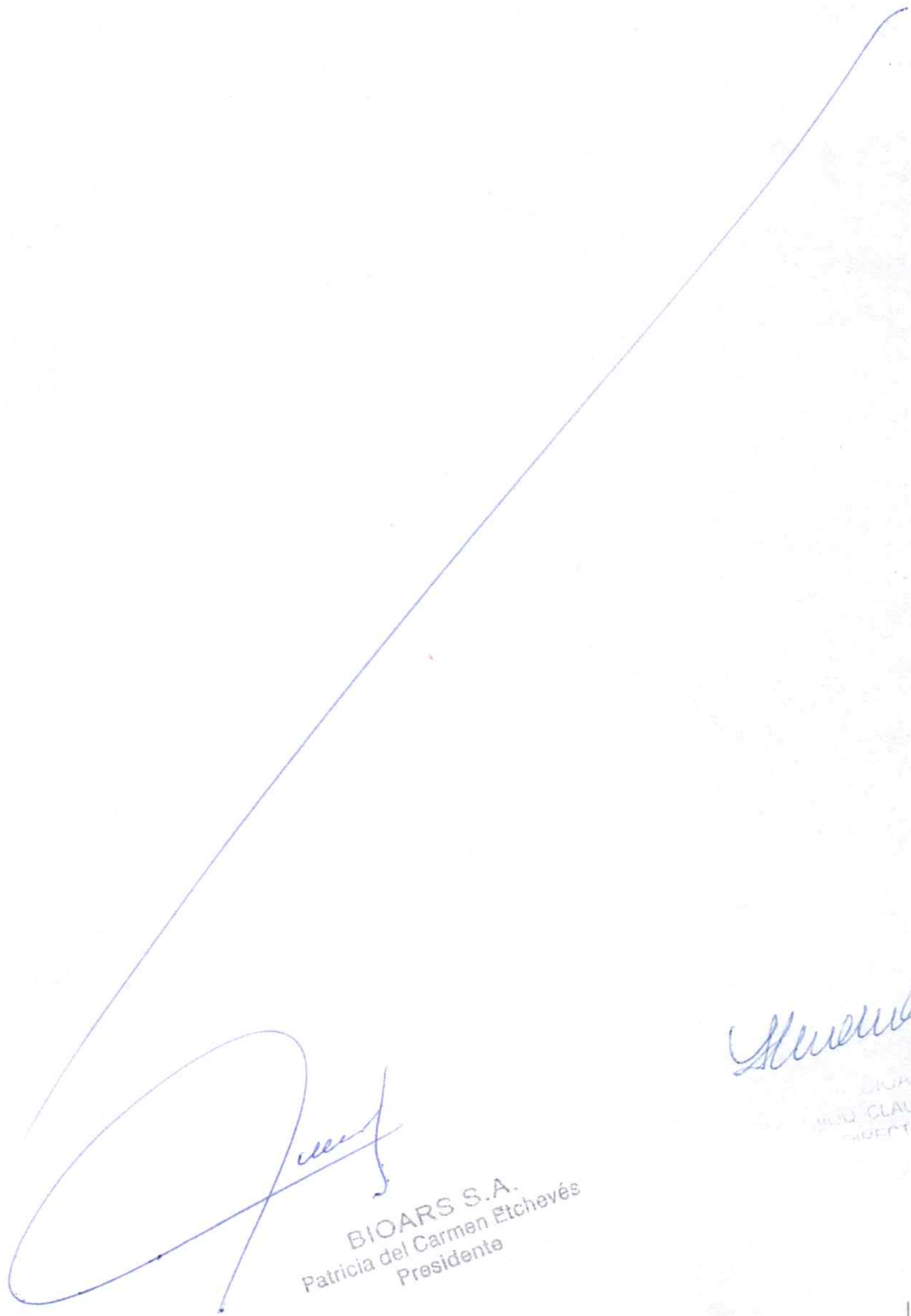
Tabla A1. 5. Protocolo PCR

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

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta

BIOARS 55
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTORA TÉCNICA

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



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta


BIOARS S.A.
MRO CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

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

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

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

Tabla A2. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.cerfest.es.

A2.2 Reactivos suministrados

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

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1 Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control Interno en formato estabilizado	Blanco	2 vials
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2 Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	2 vials
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A2. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit con Ref. Ref. VS-CPE148T.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
LAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A2.3.3 Protocolo PCR

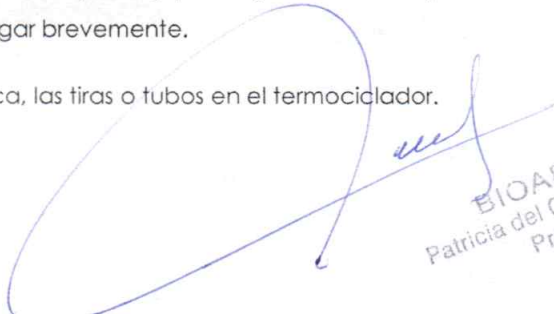
- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

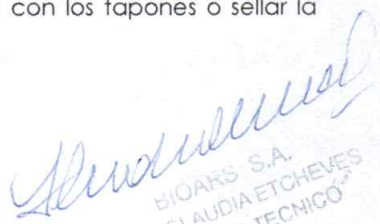
Añadir 15 µL de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los tubos con los tapones o sellar la placa. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

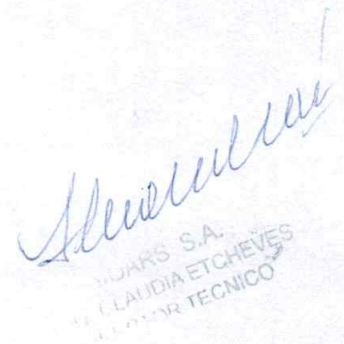
Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A2. 4. Protocolo PCR.

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



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta



BIOARS S.A.
CLAUDIA ETCHÉVÉS
COORDINADORA TÉCNICA

ANEXO 3

FORMATO OPEN Y ROTOR-GENE CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

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

Tabla A3. 1. Referencias.

A3.1 Procedimiento

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

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

Tabla A3. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A3.2 Reactivos suministrados

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A3.3 y A3.4. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos, y por tanto, comercializar en múltiples formatos. La Tabla A3.3 incluye materiales y reactivos para usar

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta

BIOARS S.A.
M. CLAUDIA ETCHÉVÉS
60
DE TÉCNICO

con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A3.4 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1/3/6 tiras de 8 pocillos
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1/3/6 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/6/12 tiras de 8 tapones

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

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	2/9 tiras de 4 pocillos
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	2/9 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	4/18 tiras de 4 tapones

Tabla A3.4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CPE101E y VS-CPE136TE. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente Técnico

A3.3 Procedimiento del test

A3.3.1 Control de extracción liofilizado

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

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

A3.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A3.3.3 Protocolo PCR

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

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

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

- 2) Añadir muestras y controles.

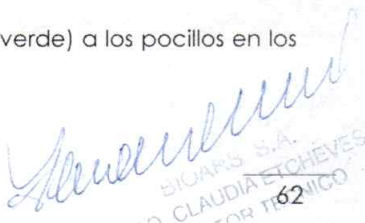
Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

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

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

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


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

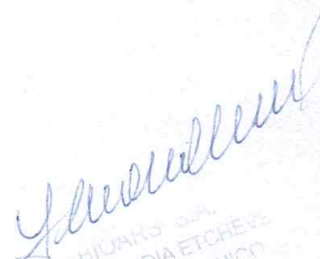
Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

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

Tabla A3. 5. Protocolo PCR.

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


 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente


 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
 DIRECTOR TÉCNICO

ANEXO 4

FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

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

Tabla A4. 1. Referencias.

A4.1 Procedimiento

VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede añadirse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.


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

Tabla A4. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A4.2 Reactivos suministrados

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



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1 Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	2 vials
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2 Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	2 vials
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A4. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CEP148TE.

A4.3 Procedimiento del test

A4.3.1 Control de extracción liofilizado

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

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

A4.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta

BIOARS S.A.
PATRICIA ETCHÉVÉS
D. TÉCNICO

A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A4.3.4 Protocolo PCR

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

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

- 2) Añadir muestras y controles.

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

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

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

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

Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



BIOARS S.A.
AUDI CLAUDIA ETCHEVÉS
DIRECTORA TÉCNICA

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

Tabla A4. 4. Protocolo PCR.

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

Bibliography/Bibliografía











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

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

4100 CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

- Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., Carroll, K. C., Chapin, K. C., Gilligan, P. H., Gonzalez, M. D., Jerris, R. C., Kehl, S. C., Patel, R., Pritt, B. S., Richter, S. S., Robinson-Dunn, B., Schwartzman, J. D., Snyder, J. W., Telford, S., Theel, E. S., Thomson, R. B., Weinstein, M. P., & Yao, J. D. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1–e94. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>
- Monteiro, J., Widen, R. H., Pignatari, A. C. C., Kubasek, C., & Silbert, S. (2012). Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4), 906–909. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr563>
- Pollett, S., Miller, S., Hindler, J., Uslan, D., Carvalho, M., & Humphries, R. M. (2014). Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a health care system in Los Angeles, California, from 2011 to 2013. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(11), 4003–4009. <https://doi.org/10.1128/JCM.01397-14>
- Singh-Moodley, A., & Perovic, O. (2016). Antimicrobial susceptibility testing in predicting the presence of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae in South Africa. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1858-7>
- Teo, J. W. P., La, M. Van, & Lin, R. T. P. (2016). Development and evaluation of a multiplex real-time PCR for the detection of IMP, VIM, and OXA-23 carbapenemase gene families on the BD MAX open system. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(4), 358–361. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.019>
- Van der Zee, A., Roorda, L., Bosman, G., Fluit, A. C., Hermans, M., Smits, P. H. M., van der Zanden, A. G. M., te Wit, R., Buijnesteijn van Coppenraet, L. E. S., Cohen Stuart, J., & Ossewaarde, J. M. (2014). Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-27>
- World Health Organization. (2017). Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in health care facilities. In WHO. <http://apps.who.int/bookorders>.

Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

 In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Keep dry Almacenar en lugar seco	 Use by Fecha de caducidad	 Manufacturer Fabricante	 Batch code Número de lote
 Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	 Temperature limitation Limitación de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	 Unique Device Identification Identificación única de dispositivo	 Catalogue number Número de referencia

BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente

[Handwritten signature]
 BIOARS S.A.
 PATRICIA ETCHÉVÉS
 JEFERA TÉCNICA
 88

Trademarks

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

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

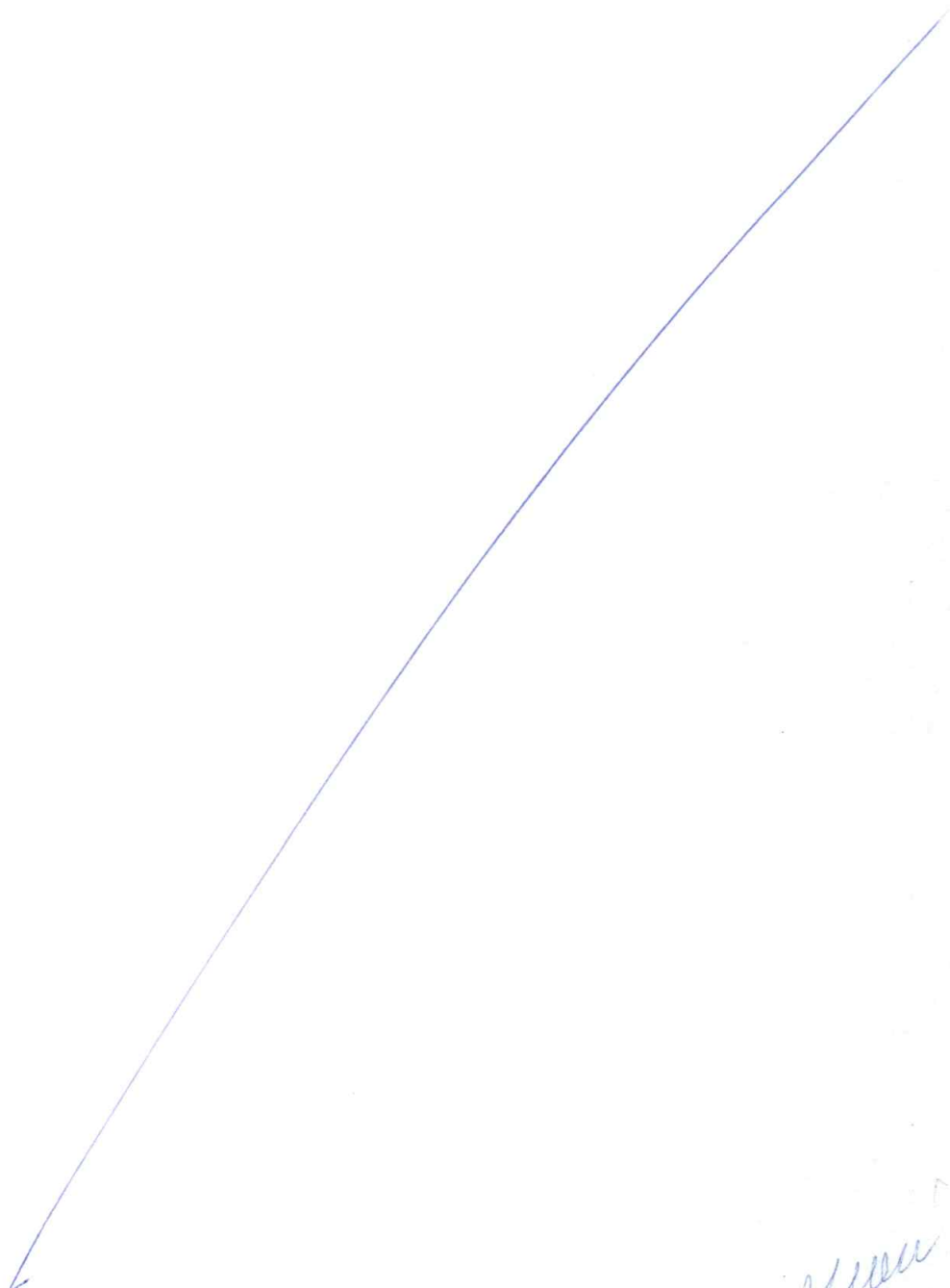
Control de Cambios / Change Control		
Versión / Version nº	Cambios / Changes	Fecha / Date
00	Versión Original / Original Version	30/04/2021

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

Revision: 30th April 2021


 BIQARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente

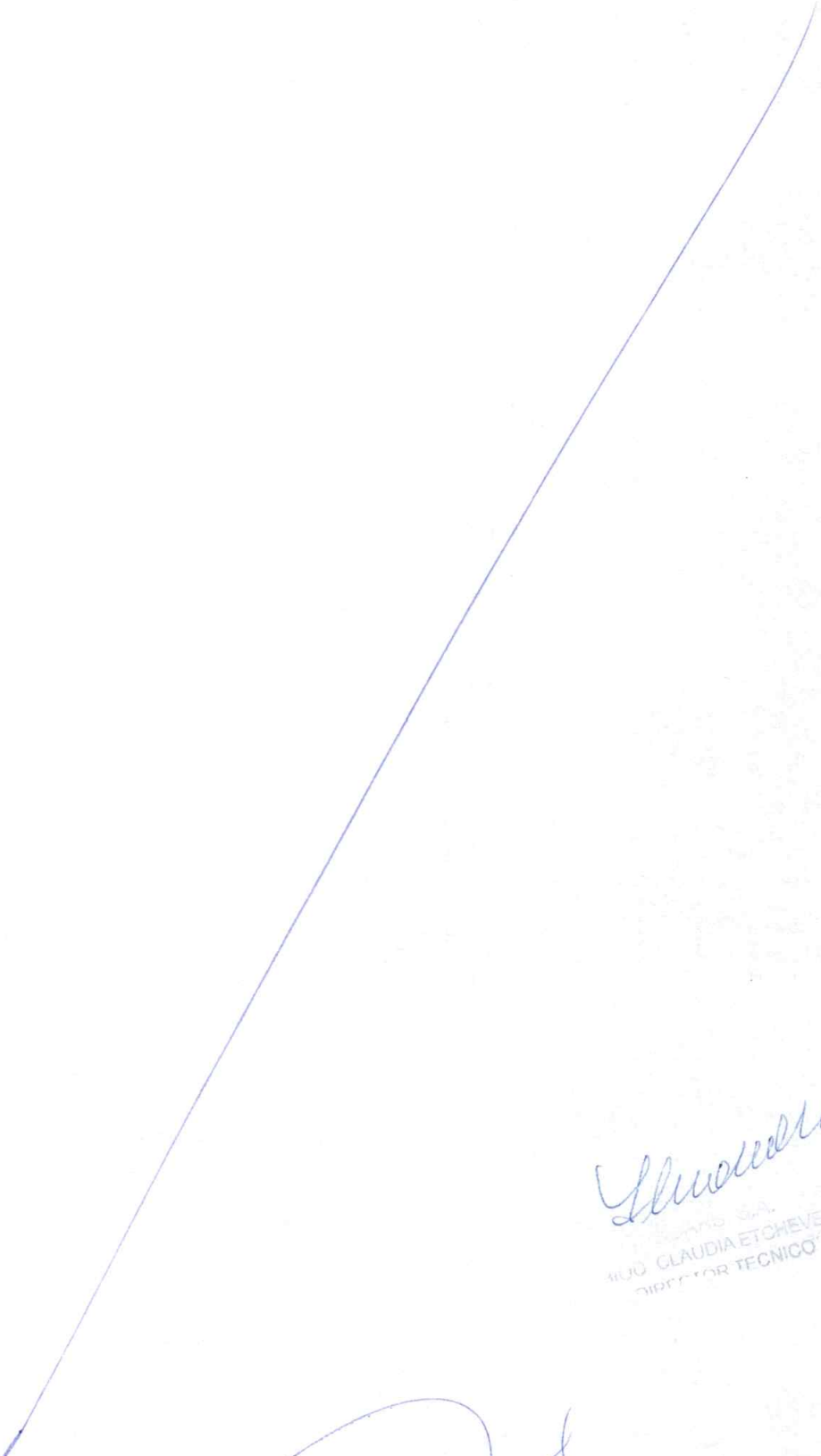

 BIQARS S.A.
 CLAUDIA ETCHÉVÉS
 COORDINADORA TÉCNICA



Claudia Etcheves
BIOD. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

Patricia del Carmen Etcheves

BIOARS S.r.l.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente



[Handwritten signature]
S.A.
ING. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TÉCNICO

[Handwritten signature]
S.A.
Patricia del Carmen Etchevós
Presidente

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVE
DIRECTOR TÉCNICO

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchever
Presidenta

F-566 rev01



VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

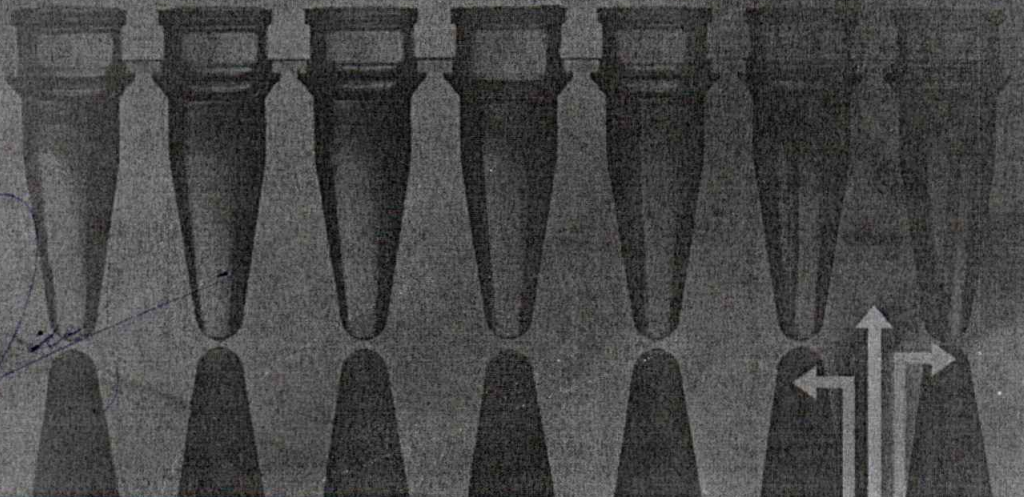
VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile VS-MSA106L

VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile VS-MSA106H

VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile VS-MSA112L

VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile VS-MSA112H

VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene® VS-MSA136



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA) y/o *Staphylococci* coagulasa negativa resistente a meticilina (MRCoNS) en colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianales humanos en medio sólido cromogénico. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por MRSA en combinación con los signos y síntomas clínicos del paciente y los factores de riesgo epidemiológico. El DNA es extraído a partir de las colonias, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para la identificación de *Staphylococcus aureus* y la determinación de la resistencia a la meticilina.

2. Introducción y explicación

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es quizás el patógeno humano más preocupante debido a su virulencia intrínseca, a su capacidad para causar una gran variedad de infecciones potencialmente mortales y a su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Hoy en día, este organismo es la principal causa global de infecciones asociadas a la atención de la salud en todo el mundo y, a medida que se trata a más pacientes fuera del ámbito hospitalario, es una preocupación creciente en la comunidad. Existen muchos medicamentos antiestafilocócicos, que incluyen meticilina, tetraciclinas, fluoroquinolonas, linezolid y daptomicina, pero pierden rápidamente su valor terapéutico debido a la capacidad de la bacteria para desarrollar mecanismos efectivos para enfrentar este agente.

Además de la creciente importancia de *S. aureus* como patógeno de las infecciones nosocomiales, su resistencia contra varios antibióticos ha empeorado cada vez más. Las cepas de *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistentes a la meticilina no solo son resistentes contra todos los antibióticos beta-lactámicos, sino que también suelen ser multiresistentes contra varias clases de antibióticos, lo que limita las opciones de tratamiento. Las infecciones por MRSA involucran la piel o áreas más profundas del cuerpo en forma de infecciones de la herida o sepsis. Las propiedades causantes de la enfermedad del MRSA no se diferencian de las de los estafilococos sensibles a los antibióticos.

Resistencia a la meticilina en *Staphylococcus* spp. se debe a la adquisición de una proteína de unión a penicilina alterada PBP2a (PBP2'), codificada por el gen *mecA*. El gen *mecA* se transporta en elementos móviles del cromosoma *mec* (SCCmec) estafilocócico de casete grande, que se encuentran en los aislamientos de MRSA y MRCoNS. Se han reconocido ocho tipos diferentes de SCCmec (I-VIII), que varían en tamaño de 21 a 67 kb, y tienen diferentes conjuntos de genes de *recombinasa ccr*. El tipo de elemento SCCmec XI contiene un nuevo homólogo de *mecA* (*mecC*). Este gen muestra solo un 70% de homología de nucleótidos con *mecA* y no es detectable por las pruebas de OCRs específicas de *mecA* y de aglutinación de PBP2a.

S. aureus y MRSA se propagan de vector a persona y de persona a persona, pero existen pocas reservas ambientales fuera del ámbito de la atención médica y las comunidades cerradas. El MRSA es un problema

creciente en instalaciones compartidas como hospitales, centros de salud y hogares de ancianos. Los estudios indican que la incidencia de MRSA en los últimos años ha aumentado considerablemente en todo el mundo. Sin embargo, hay diferencias considerables entre varios países. Mientras que en los Estados Unidos, Japón y los países del sur de Europa existe una alta prevalencia de MRSA entre 20 y 60%, la prevalencia en los países holandeses y escandinavos es inferior al tres por ciento.

Junto con el uso de antibióticos no críticos, la implementación insuficiente de medidas de higiene profiláctica y la capacitación inadecuada del personal son las razones del aumento significativo en la colonización por MRSA. La gestión insuficiente de MRSA conduce a la continua propagación de MRSA en nuestros hospitales. Las medidas urgentemente necesarias en este caso son la introducción de la higiene estándar y el manejo adecuado de brotes, así como el control del uso de antibióticos. En particular, es indispensable la introducción del examen de MRSA basado en un diagnóstico rápido y confiable durante o incluso mejor antes del ingreso hospitalario de pacientes.

Las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) están implicadas en infecciones graves y brotes nosocomiales, y muestran resistencia a una amplia gama de antibióticos, lo que limita las opciones de tratamiento. Por lo tanto, la detección rápida es clínicamente crucial tanto para el tratamiento como para las medidas de control de infecciones.

La adopción de técnicas moleculares ha permitido una detección e identificación más rápida de MRSA en muestras clínicas. Por lo tanto, proporciona la información crítica para determinar las terapias adecuadas para los pacientes con sospecha de infecciones por MRSA y controlar el brote.

3. Procedimiento

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de MRSA, MSSA y *Staphylococci* coagulasa negativa resistente a meticilina (MRCoNS) en colonias aisladas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de MRSA, MSSA y MRCoNS se lleva a cabo mediante la amplificación de los genes SA442 (si está presente) / CoA, SCCmec-orfX junction y los genes mecA/ mecC.

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *Staphylococcus aureus* y los genes mecA/mecC (MRSA 1: SAU + MEC A/C 4/8-well strips). Los genes SA442/CoA (*S. aureus*) se amplifican y detectan en el canal FAM, los genes mecA/mecC se amplifican y detectan en el canal ROX y el control interno (IC) en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado, seleccione el adecuado) canal de detección, ver

Anexo 2). La segunda tira contiene la mezcla de reacción múltiple para la detección de la unión SCCmec-orfX (MRSA 2: tiras ORFX de 4/8 pocillos). SCCmec-orfX junction se amplifica y se detecta en el canal FAM y el control interno (IC) en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado, consulte el Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
MRSA 1: SAU + MEC A/C 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
MRSA 2: ORFX 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MSA106L, VS-MSA106H, VS-MSA112L y VS-MSA112H.



Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
MRSA 1: SAU + MEC A/C 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Transparente	9 tiras de 4 pocillos
MRSA 2: ORFX 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	9 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	18 tiras de 4 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MSA136. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.



6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-MSA136). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para referencia VS-MSA136 (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

- Asegurarse de usar un pocillo para la detección de MRSA 1: SAU + MEC A/C y otro para el ensayo de MRSA 2: ORFX. Tener precaución para que no se mezclen durante el proceso.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.
- *S. aureus* se encuentra en el ambiente y además la mayoría de las personas sanas lo portan en la piel y las membranas mucosas (con mayor frecuencia en el área nasal). Cuando se lleve a cabo el test VIASURE, se debe tener especial cuidado para evitar la posible contaminación de muestras y reactivos por parte del operador.

8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA a partir de colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianal humanos en medio sólido cromogénico puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Protocolo PCR

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

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

Añadir 15 µL del Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.



Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) en diferentes pocillos y cerrar los pocillos con los tapones suministrados.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

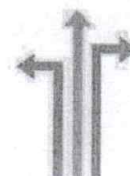
Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*S. aureus* (genes SA442/CoA) y SCCmec-orfX junction), ROX (genes mecA/mecC) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Interpretación de los resultados:



<i>S. aureus</i> (genes SA442/CoA) (FAM, strip 1)	Genes <i>mecA/mecC</i> (ROX, strip 1)	SCC <i>mec-orfX</i> junction (FAM, strip 2)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	MRSA*
+	+	-	+/-	-	+	MSSA** y MRCoNS***
+	-	+	+/-	-	+	MSSA**
+	-	-	+/-	-	+	MSSA**
-	+	-	+/-	-	+	MRCoNS*** (Resistencia meticilina/oxacilina diferente de <i>S. aureus</i>)
-	-	-	+	-	+	Negativo
-	-	-	-	-	+	Inválido

Tabla 4. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

*MRSA. *S. aureus* resistente a la meticilina.
 ** MSSA. *S. aureus* sensible a la meticilina.
 *** MRCoNS. *Staphylococci* coagulasa negativa resistente a meticilina.

Una muestra se considera positiva, si el **valor Ct obtenido es menor de 35** y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (MRSA 1: SAU + MEC A/C).

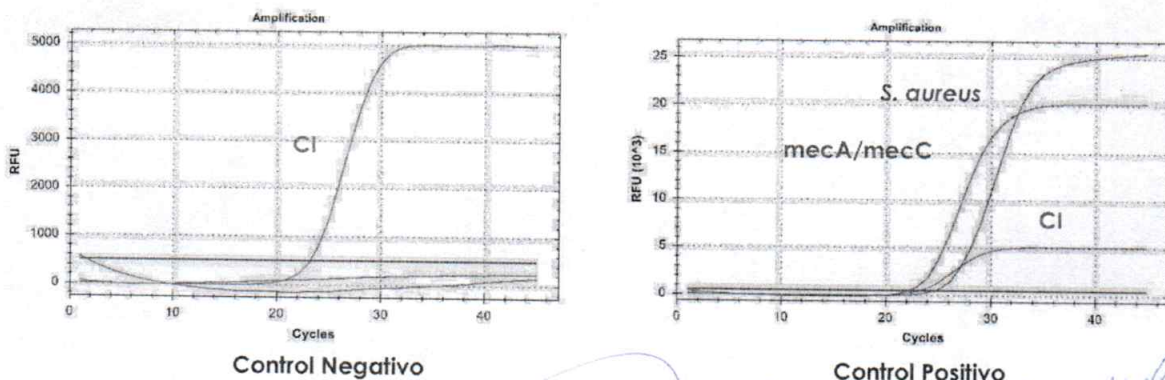
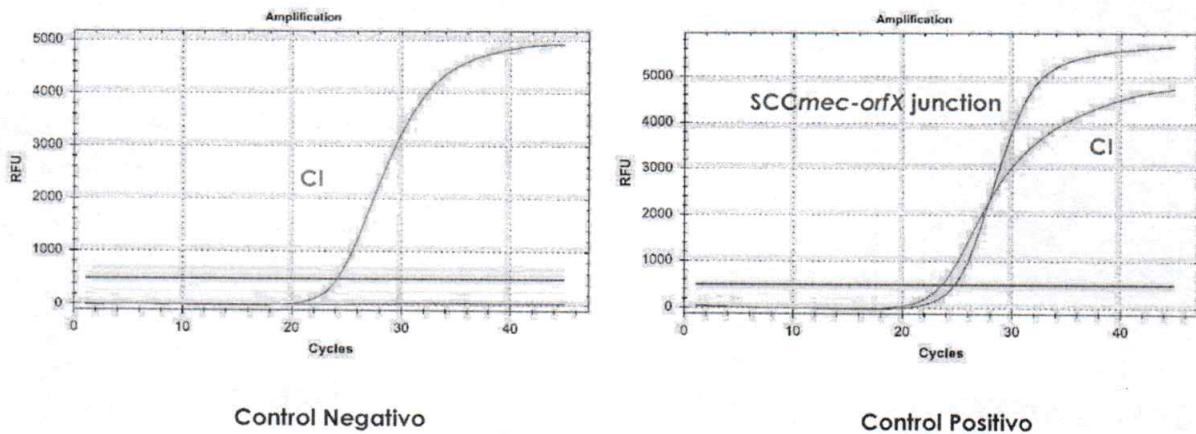


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (MRSA 2: ORFX).



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianal humanos en medio sólido cromogénico.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de MRSA, lo que da como resultado un falso negativo con VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.

- Un resultado positivo con el test VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit no indica necesariamente un fracaso del tratamiento de erradicación, ya que el DNA puede persistir. Un resultado negativo obtenido tras un resultado positivo anterior de la prueba puede indicar el éxito del tratamiento de erradicación, o puede deberse a una colonización intermitente.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de organismos viables. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de DNA de MRSA, ya que el test VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit detecta la región *SCCmec/orfX* junction, y secuencias específicas de *S. aureus* localizadas en los genes *SA442* and *CoA*, y los genes *mecA* y *mecC*.

11. Control de calidad

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit se evaluó utilizando 105 muestras positivas de MRSA mediante cultivo microbiológico convencional. En resumen, las muestras nasales / faríngeas y perineales con sospecha clínica de colonización por MRSA se sembraron en medio de agar MRSA de *S. aureus* (oxoide) y se incubaron en condiciones aeróbicas a 37°C durante 18-24 horas. Se seleccionaron las colonias y se prepararon muestras hervidas, y se analizaron con el kit de detección VIASURE. 103/105 muestras fueron positivas para MRSA de acuerdo con ambos métodos de detección. 2/105 se detectaron como positivos para MSSA (positivos para *S. aureus* y *SCCmec-orfX*), 1/105 muestra positiva para resistencia a meticilina / oxacilina diferente de *S. aureus* (positiva para *mecA* / *mecC*), 3/105 muestras positivas para MSSA y MRCoNS (positivos para *S. aureus* y *mecA* / *mecC*, pero negativos para *SCCmec-orfX*).

En conclusión, los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA) y / o estafilococos coagulasa negativos resistentes a meticilina utilizando VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 100 copias de DNA por reacción para *S. aureus* (genes *SA442* / *CoA*), ≥ 50 copias de DNA por reacción para genes *mecA* / *mecC* y ≥ 10 copias de DNA por reacción para *SCCmec-orfX* junction. (Figura 3, 4 y 5).



Figura 3. Diluciones seriadas de *S. aureus* (genes SA442/CoA) (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 1: SAU + MEC A/C, canal FAM).

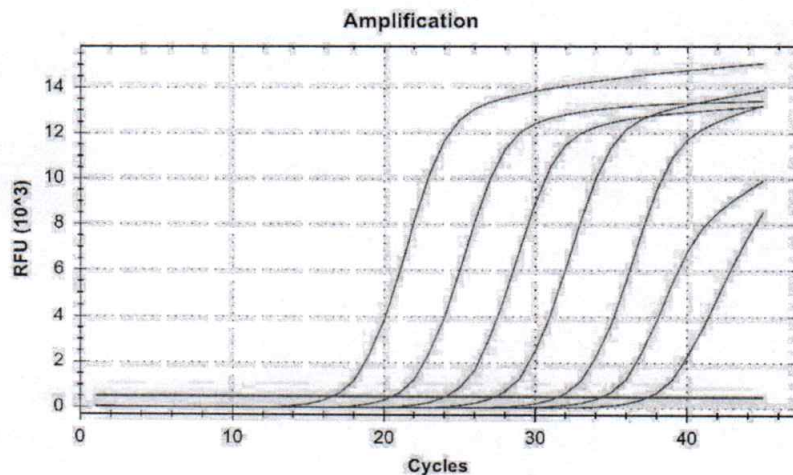


Figura 4. Diluciones seriadas de los genes *mecA/mecC* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 1: SAU + MEC A/C, canal ROX).

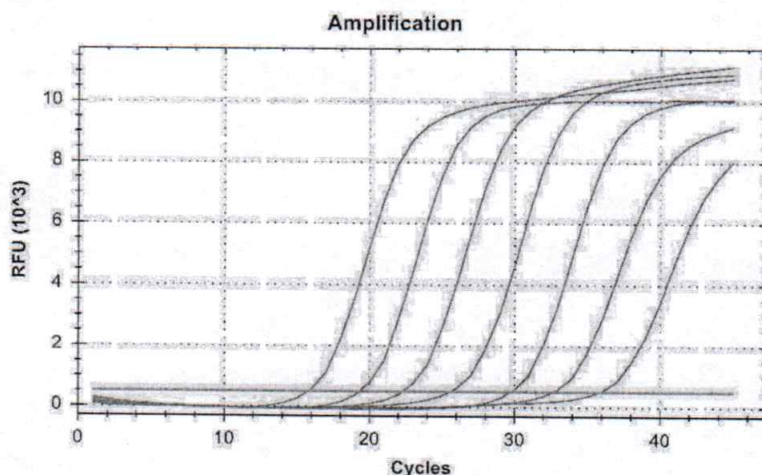
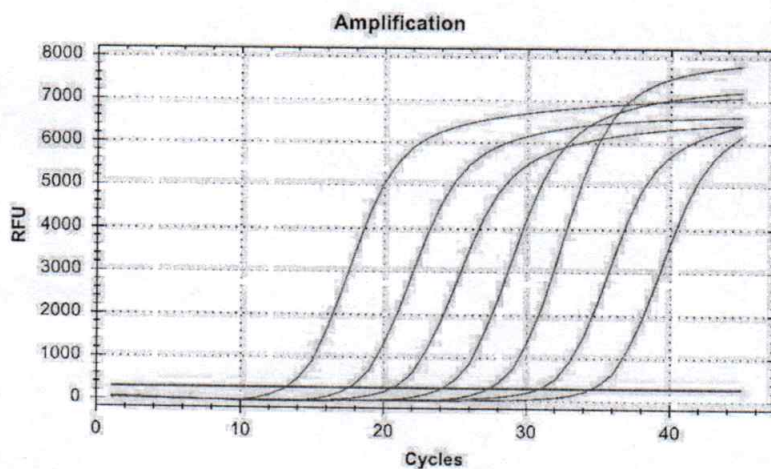


Figura 5. Diluciones seriadas de SCCmec-*orfX* junction (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 2: ORFX, canal FAM).



BIOARS S.A.
Carmen Echeverez
Presidenta

Claudia Echeverez
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHER
DIRECTOR TECNICO

12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Prueba de reacción cruzada			
Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2146G)	-
Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2147G)	-
Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) y KPC-2	-	<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	-
<i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244	-	<i>Enterococcus faecium</i> cepa LMG16165 tipo VanA	-
<i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1 tipo VanA	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2 tipo VanB	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	-
<i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7	-	<i>E. faecalis</i> (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz tipo VanB	-
<i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142 tipos VanC y VanB	-
Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC	-

Tabla 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MRSA** se evaluó frente a *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) strain N315, MRSA sequence type 398, MRSA strain (oxa^R, PVL-positive, spa type t310), MRSA strain (oxa^R, PVL-positive, spa type t008), MRSA strain (oxa^R, PVL-neg), MRSA spa type t002, MRSA spa type t020, MRSA spa type t127, MRSA spa type t4545, MRSA (mecC, spa type t7734), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MSSA + MR-CoNS** se evaluó frente a: *S. aureus* + *S. epidermidis* (oxa^R, PVL-pos); and MSSA ATCC 29213 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach) + MRCoNS 634 (Meticillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* 634), mostrando un resultado positivo.











La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MR-CoNS** se evaluó frente a MRCoNS 634 (Meticillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* 634), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MSSA** se evaluó frente a MSSA (spa type t177), mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. A. Pournajaf *et al.* PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their antibiotic resistance profiles. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2014. 4(Suppl 1): S293–S297.
2. OO. Soge *et al.* Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from US West Coast public marine beaches. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009. 64(6):1148-55.
3. R.H. Nijhuis *et al.* A rapid and high-throughput screening approach for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on the combination of two different real-time PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52(8): 2861-2867
4. H.Y. Wang *et al.* Multiplex real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant staphylococci directly from positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52(6): 1911-1920.
5. C. Seidel *et al.* Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) for reliable, simple and rapid detection of the methicillin resistance genes *mecA* and *mecC*. *Veterinary Microbiology* 2017; 200: 101-106.
6. J.U. Kim *et al.* Multiplex real-time PCR assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains suitable in regions of high MRSA endemicity. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(3): 1008-1013.
7. N.S. Sabet *et al.* Simultaneous species identification and detection of methicillin resistance in staphylococci using triplex real-time PCR assay. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2006; 56(1): 13-18.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

 In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Keep dry Almacenar en lugar seco	 Use by Fecha de caducidad	 Manufacturer Fabricante	 Batch code Número de lote
 Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	 Temperature limitation Limitación de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	 Sample diluent Diluyente de muestra	 Catalogue number Número de referencia

ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler ®480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler ®96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Topical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
 (2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.
 (3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.
 (4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.
 (5) No lectura en canal Cy5.
 (6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.

ANEXO 2

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 Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)). Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real

ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

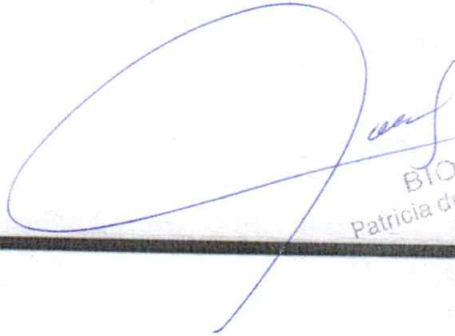
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

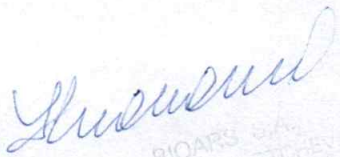
*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

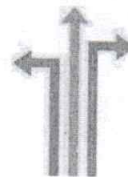


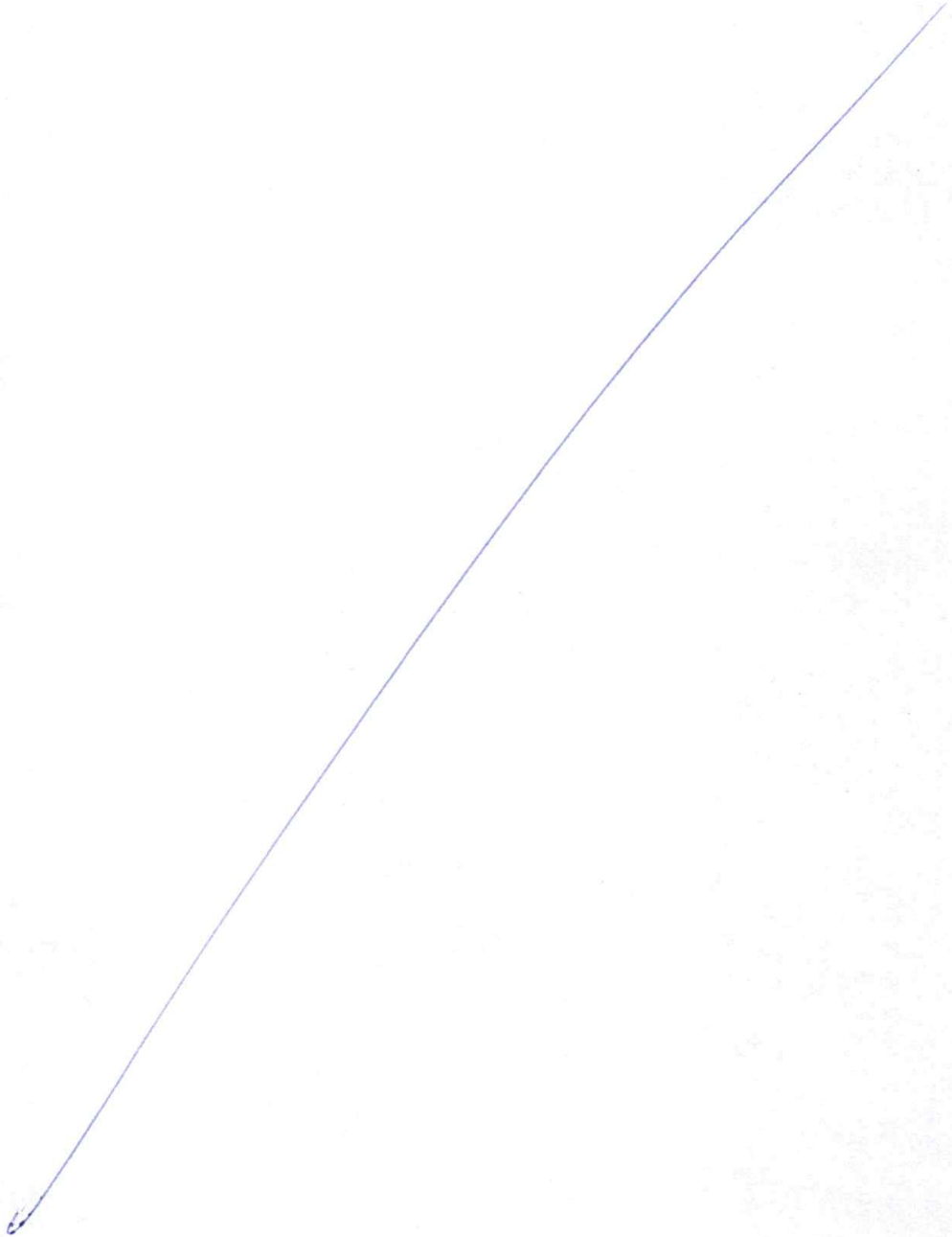
- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: September 2019


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO





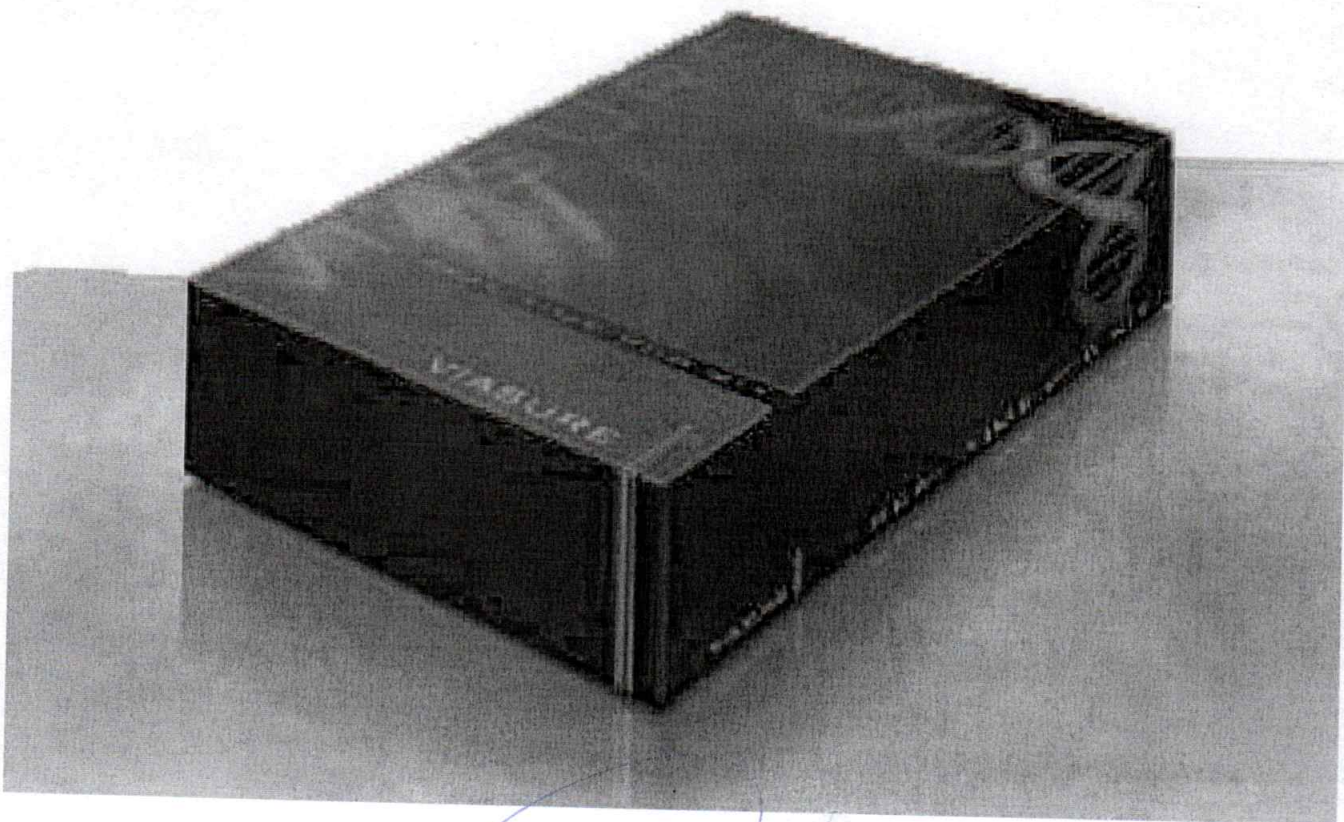
Patricia del Carmen Etchevés

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

Claudia Etchevés

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO





IU-MSA012enes0919 rev.00

[Handwritten signature]
BIODARG S.A.
Patricia del Carmen Etcheveas
Presidente

[Handwritten signature]
BIODARG S.A.
Patricia del Carmen Etcheveas
Presidente



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.cerlest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC

[Signature]
Presidente

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile VS-MSA106LE

VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile VS-MSA106HE

VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile VS-MSA112LE

VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile VS-MSA112HE

VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene® VS-MSA136E

ESPAÑOL**1. Uso previsto**

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA) y/o *Staphylococci* coagulasa negativa resistente a meticilina (MRCoNS) en colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianales humanos en medio sólido cromogénico. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por MRSA en combinación con los signos y síntomas clínicos del paciente y los factores de riesgo epidemiológico. El DNA es extraído a partir de las colonias, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para la identificación de *Staphylococcus aureus* y la determinación de la resistencia a la meticilina.

2. Introducción y explicación

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es quizás el patógeno humano más preocupante debido a su virulencia intrínseca, a su capacidad para causar una gran variedad de infecciones potencialmente mortales y a su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Hoy en día, este organismo es la principal causa global de infecciones asociadas a la atención de la salud en todo el mundo y, a medida que se trata a más pacientes fuera del ámbito hospitalario, es una preocupación creciente en la comunidad. Existen muchos medicamentos antiestafilocócicos, que incluyen meticilina, tetraciclinas, fluoroquinolonas, linezolid y daptomicina, pero pierden rápidamente su valor terapéutico debido a la capacidad de la bacteria para desarrollar mecanismos efectivos para enfrentar este agente.

Además de la creciente importancia de *S. aureus* como patógeno de las infecciones nosocomiales, su resistencia contra varios antibióticos ha empeorado cada vez más. Las cepas de *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistentes a la meticilina no solo son resistentes contra todos los antibióticos beta-lactámicos, sino que también suelen ser multiresistentes contra varias clases de antibióticos, lo que limita las opciones de tratamiento. Las infecciones por MRSA involucran la piel o áreas más profundas del cuerpo en forma de infecciones de la herida o sepsis. Las propiedades causantes de la enfermedad del MRSA no se diferencian de las de los estafilococos sensibles a los antibióticos.

Resistencia a la meticilina en *Staphylococcus* spp. se debe a la adquisición de una proteína de unión a penicilina alterada PBP2a (PBP2'), codificada por el gen *mecA*. El gen *mecA* se transporta en elementos móviles del cromosoma *mec* (SCC*mec*) estafilocócico de casete grande, que se encuentran en los aislamientos de MRSA y MRCoNS. Se han reconocido ocho tipos diferentes de SCC*mec* (I-VIII), que varían en tamaño de 21 a 67 kb, y tienen diferentes conjuntos de genes de *recombinasa ccr*. El tipo de elemento SCC*mec* XI contiene un nuevo homólogo de *mecA* (*mecC*). Este gen muestra solo un 70% de homología de nucleótidos con *mecA* y no es detectable por las pruebas de OCRs específicas de *mecA* y de aglutinación de PBP2a.

S. aureus y MRSA se propagan de vector a persona y de persona a persona, pero existen pocas reservas ambientales fuera del ámbito de la atención médica y las comunidades cerradas. El MRSA es un problema



creciente en instalaciones compartidas como hospitales, centros de salud y hogares de ancianos. Los estudios indican que la incidencia de MRSA en los últimos años ha aumentado considerablemente en todo el mundo. Sin embargo, hay diferencias considerables entre varios países. Mientras que en los Estados Unidos, Japón y los países del sur de Europa existe una alta prevalencia de MRSA entre 20 y 60%, la prevalencia en los países holandeses y escandinavos es inferior al tres por ciento.

Junto con el uso de antibióticos no críticos, la implementación insuficiente de medidas de higiene profiláctica y la capacitación inadecuada del personal son las razones del aumento significativo en la colonización por MRSA. La gestión insuficiente de MRSA conduce a la continua propagación de MRSA en nuestros hospitales. Las medidas urgentemente necesarias en este caso son la introducción de la higiene estándar y el manejo adecuado de brotes, así como el control del uso de antibióticos. En particular, es indispensable la introducción del examen de MRSA basado en un diagnóstico rápido y confiable durante o incluso mejor antes del ingreso hospitalario de pacientes.

Las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) están implicadas en infecciones graves y brotes nosocomiales, y muestran resistencia a una amplia gama de antibióticos, lo que limita las opciones de tratamiento. Por lo tanto, la detección rápida es clínicamente crucial tanto para el tratamiento como para las medidas de control de infecciones.

La adopción de técnicas moleculares ha permitido una detección e identificación más rápida de MRSA en muestras clínicas. Por lo tanto, proporciona la información crítica para determinar las terapias adecuadas para los pacientes con sospecha de infecciones por MRSA y controlar el brote.

3. Procedimiento

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de MRSA, MSSA y *Staphylococci* coagulasa negativa resistente a meticilina (MRCoNS) en colonias aisladas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de MRSA, MSSA y MRCoNS se lleva a cabo mediante la amplificación de los genes SA442 (si está presente) / CoA, SCCmec-orfX junction y los genes *mecA* / *mecC*.

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede adicionarse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa. Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *Staphylococcus aureus* y los genes *mecA*/*mecC* (MRSA 1: SAU + MEC A/C 4/8-well strips). Los genes SA442/CoA (*S. aureus*) se

amplifican y detectan en el canal FAM, los genes *mecA/mecC* se amplifican y detectan en el canal ROX y el control de extracción (EC) en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado, seleccione el adecuado) canal de detección, ver Anexo 2). La segunda tira contiene la mezcla de reacción múltiple para la detección de la unión *SCCmec-orfX* (MRSA 2: tiras ORFX de 4/8 pocillos). *SCCmec-orfX* junction se amplifica y se detecta en el canal FAM y el control de extracción (EC) en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado, consulte el Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.

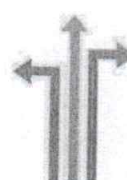
Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
MRSA 1: SAU + MEC A/C 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
MRSA 2: ORFX 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MSA106LE, VS-MSA106HE, VS-MSA112LE y VS-MSA112HE.

[Handwritten signature]

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente

[Handwritten signature]
BIOARS S.A.
BIO CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TÉCNICO



Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
MRSA 1: SAU + MEC A/C 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	9 tiras de 4 pocillos
MRSA 2: ORFX 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	9 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	18 tiras de 4 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MSA136E. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-MSA136E). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para referencia VS-MSA136E (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

- Asegurarse de usar un pocillo para la detección de MRSA 1: SAU + MEC A/C y otro para el ensayo de MRSA 2: ORFX. Tener precaución para que no se mezclen durante el proceso.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.
- *S. aureus* se encuentra en el ambiente y además la mayoría de las personas sanas lo portan en la piel y las membranas mucosas (con mayor frecuencia en el área nasal). Cuando se lleve a cabo el test VIASURE, se debe tener especial cuidado para evitar la posible contaminación de muestras y reactivos por parte del operador.

8. Procedimiento del test

8.1. Control de extracción liofilizado

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

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

8.2. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Si el Control de Extracción se utiliza para monitorizar el proceso de aislamiento de los ácidos nucleicos y como control de la posible inhibición de la PCR, añadir 5µL del CE a la muestra o a la mezcla del tampón de lisis-muestra. (muestras clínicas, control positivo y/o negativo). Cerrar cada uno de los tubos y mezclar con la ayuda del vórtex durante 10 segundos.

Si el Control de Extracción se emplea sólo como control de inhibición de la PCR, añadir 1 µL de CE a la mezcla de reacción reconstituída.

Para la extracción de DNA a partir de colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianal humanos en medio sólido cromogénico puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).

8.3. Control positivo liofilizado

El vial de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.4. Protocolo PCR

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

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

Añadir 15 µL del Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

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

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

Añadir 5 µL de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

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

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

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

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*S. aureus* (genes SA442/CoA) y SCCmec-orfX junction), ROX (genes mecA/mecC) y HEX, JOE o VIC (Control Extracción). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Comprobar la emisión de la señal del Control de Extracción (CE) para verificar el proceso de extracción y el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Con ayuda de las siguientes tablas, leer y analizar los resultados:

S. aureus (genes SA442/CoA) (FAM, strip 1)	Genes mecA/mecC (ROX, strip 1)	SCCmec-orfX junction (FAM, strip 2)	Control Extracción (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	MRSA*
+	+	-	+/-	-	+	MSSA** y MRCoNS***
+	-	+	+/-	-	+	MSSA**
+	-	-	+/-	-	+	MSSA**
-	+	-	+/-	-	+	MRCoNS*** (Resistencia metilina/oxacilina diferente de S. aureus)
-	-	-	+	-	+	Negativo
-	-	-	-	-	+	Inválido

Tabla 4. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

*MRSA. *S. aureus* resistente a la metilina.
 ** MSSA. *S. aureus* sensible a la metilina.
 *** MRCoNS. *Staphylococci* coagulasa negativa resistente a metilina.

Muestr...
 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
 DIRECTOR TÉCNICO

Una muestra se considera positiva, si el **valor Ct obtenido es menor de 35** y el Control de Extracción muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del Control Extracción no es necesaria, ya que la

BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etcheves
 Presidente



presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el Control de Extracción si la presenta. Un fallo en el proceso de extracción y la inhibición de la reacción de PCR pueden ser excluidas por la amplificación del Control de Extracción.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (MRSA 1: SAU + MEC A/C).

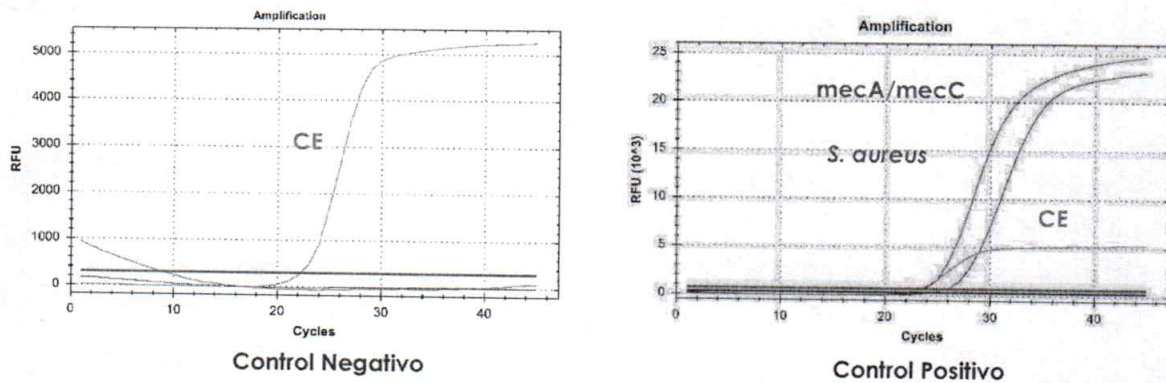
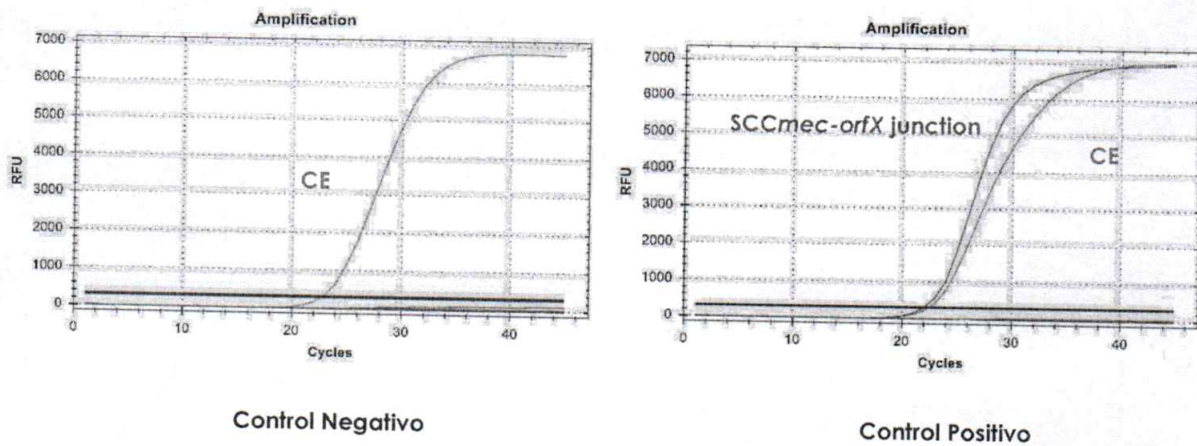


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (MRSA 2: ORFX).



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de ambos, el Control de Extracción y de la muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas durante la purificación de los ácidos nucleicos y/o de inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se

recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

En los controles de extracción se pueden observar diferencias en los valores de Ct entre las muestras control (control negativo y control positivo) y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

Para muestras en el límite de detección (LOD) o muestras negativas con un valor de Ct para el control de extracción ≥ 35 , se recomienda filtrar la muestra, o diluir el extraído (1:10 and 1:100) para evitar las posibles interferencias e inhibidores en la reacción de amplificación. Conviene revisar las instrucciones de uso del proceso de extracción empleado por el usuario.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianal humanos en medio sólido cromogénico.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de MRSA, lo que da como resultado un falso negativo con VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.
- Un resultado positivo con el test VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit no indica necesariamente un fracaso del tratamiento de erradicación, ya que el DNA puede persistir. Un resultado negativo obtenido tras un resultado positivo anterior de la prueba puede indicar el éxito del tratamiento de erradicación, o puede deberse a una colonización intermitente.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de organismos viables. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de DNA de MRSA, ya que el test VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit detecta la región *SCCmec/orfX* junction, y secuencias específicas de *S. aureus* localizadas en los genes SA442 and CoA, y los genes *mecA* y *mecC*.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el Agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos de debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.

11. Control de calidad

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control de extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit se evaluó utilizando 105 muestras positivas de MRSA mediante cultivo microbiológico convencional. En resumen, las muestras nasales / faríngeas y perineales con sospecha clínica de colonización por MRSA se sembraron en medio de agar MRSA de *S. aureus* (oxoide) y se incubaron en condiciones aeróbicas a 37°C durante 18-24 horas. Se seleccionaron las colonias y se prepararon muestras hervidas, y se analizaron con el kit de detección VIASURE. 103/105 muestras fueron positivas para MRSA de acuerdo con ambos métodos de detección. 2/105 se detectaron como positivos para MSSA (positivos para *S. aureus* y *SCCmec-orfX*), 1/105 muestra positiva para resistencia a meticilina / oxacilina diferente de *S. aureus* (positiva para *mecA / mecC*), 3/105 muestras positivas para MSSA y MRCoNS (positivos para *S. aureus* y *mecA / mecC*, pero negativos para *SCCmec-orfX*).

En conclusión, los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA) y / o estafilococos coagulasa negativos resistentes a meticilina utilizando VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 100 copias de DNA por reacción para *S. aureus* (genes *SA442 / CoA*), ≥ 50 copias de DNA por reacción para genes *mecA / mecC* y ≥ 10 copias de DNA por reacción para *SCCmec-orfX* junction. (Figura 3, 4 y 5).



Figura 3. Diluciones seriadas de *S. aureus* (genes SA442/CoA) (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 1: SAU + MEC A/C, canal FAM).

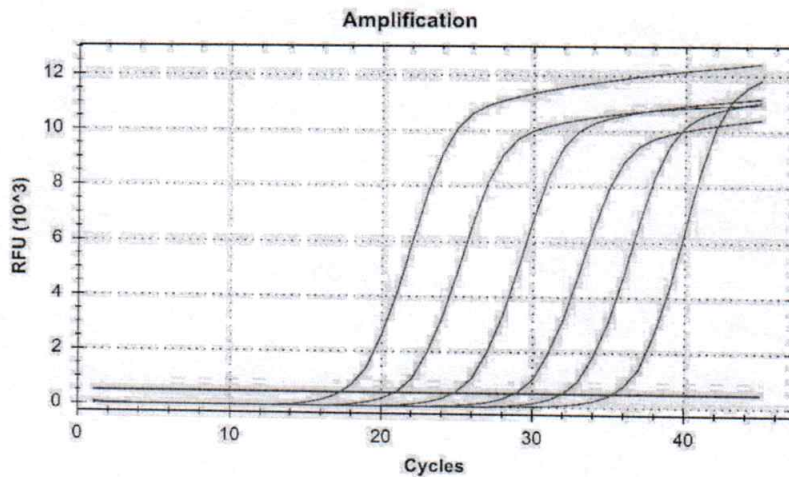


Figura 4. Diluciones seriadas de los genes *mecA/mecC* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 1: SAU + MEC A/C, canal ROX).

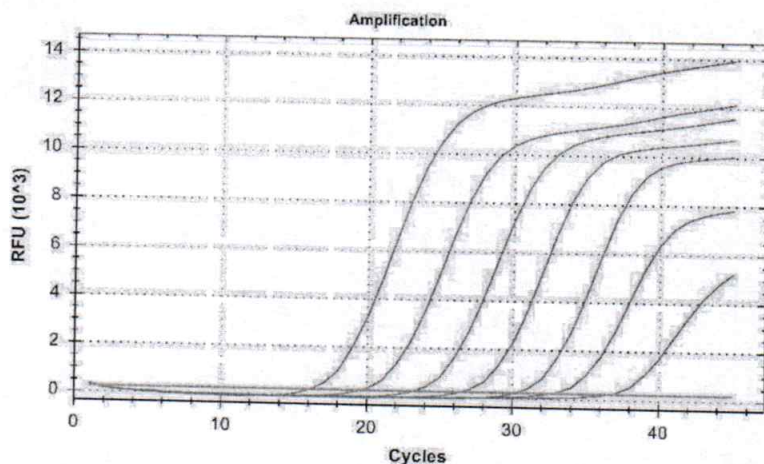
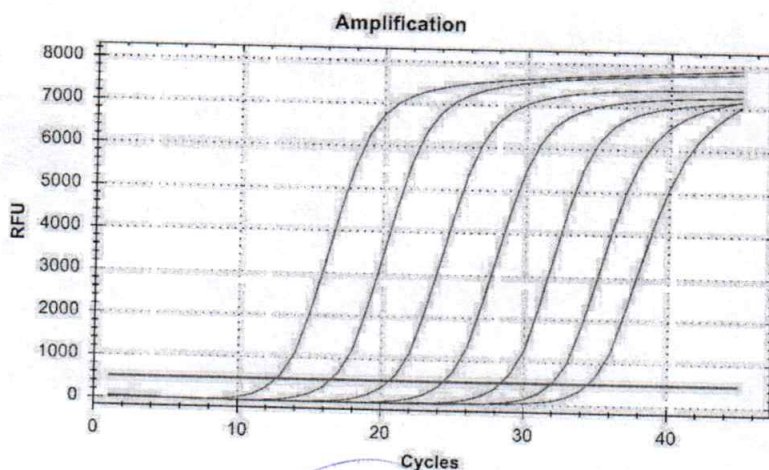


Figura 5. Diluciones seriadas de SCC*mec-orfX* junction (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 2: ORFX, canal FAM).



Stuardo
 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHEVÉS
 DIRECTOR TÉCNICO

caet
 BIOARS S.A.
 Licia del Carmen Etchevés
 Presidente



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Prueba de reacción cruzada			
Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2146G)	-
Aislado <i>Klebsiella pneumonia</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2147G)	-
Aislado <i>Klebsiella pneumonia</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) y KPC-2	-	<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	-
<i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244	-	<i>Enterococcus faecium</i> cepa LMG16165 tipo VanA	-
<i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1 tipo VanA	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2 tipo VanB	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	-
<i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7	-	<i>E. faecalis</i> (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz tipo VanB	-
<i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142 tipos VanC y VanB	-
Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC	-

Tabla 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MRSA** se evaluó frente a *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) strain N315, MRSA sequence type 398, MRSA strain (oxa^R, PVL-positive, spa type t310), MRSA strain (oxa^R, PVL-positive, spa type t008), MRSA strain (oxa^R, PVL-neg), MRSA spa type t002, MRSA spa type t020, MRSA spa type t127, MRSA spa type t4545, MRSA (mecC, spa type t7734), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MSSA + MR-CoNS** se evaluó frente a: *S. aureus* + *S. epidermidis* (oxa^R, PVL-pos); and MSSA ATCC 29213 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach) + MRCoNS 634 (Meticillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* 634), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MR-CoNS** se evaluó frente a MRCoNS 634 (Meticillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* 634), mostrando un resultado positivo.













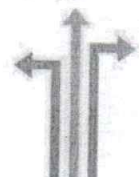
La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MSSA** se evaluó frente a MSSA (spa type t177), mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. A. Pournajaf *et al.* PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their antibiotic resistance profiles. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2014. 4(Suppl 1): S293-S297.
2. O.O. Soge *et al.* Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from US West Coast public marine beaches. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009. 64(6):1148-55.
3. R.H. Nijhuis *et al.* A rapid and high-throughput screening approach for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on the combination of two different real-time PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52(8): 2861-2867
4. H.Y. Wang *et al.* Multiplex real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant staphylococci directly from positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52(6): 1911-1920.
5. C. Seidel *et al.* Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) for reliable, simple and rapid detection of the methicillin resistance genes *mecA* and *mecC*. *Veterinary Microbiology* 2017; 200: 101-106.
6. J.U. Kim *et al.* Multiplex real-time PCR assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains suitable in regions of high MRSA endemicity. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(3): 1008-1013.
7. N.S. Sabet *et al.* Simultaneous species identification and detection of methicillin resistance in staphylococci using triplex real-time PCR assay. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2006; 56(1): 13-18.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

 In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Keep dry Almacenar en lugar seco	 Use by Fecha de caducidad	 Manufacturer Fabricante	 Batch code Número de lote
 Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	 Temperature limitation Limitación de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	 Sample diluent Diluyente de muestra	 Catalogue number Número de referencia



Handwritten signature: Susana...
BIOARS S.A.
R/O CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TÉCNICO

ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000PT™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005PT™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
 (2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.
 (3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.
 (4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.
 (5) No lectura en canal Cy5.
 (6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.

ANEXO 2

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 Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real

ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



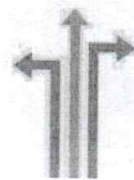
- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: February 2021



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheveas
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVEAS
DIRECTOR TECNICO





CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II - Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC

Patent / Presidente

M. García
D. CLAUDE
DIRECTOR TECNICO

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

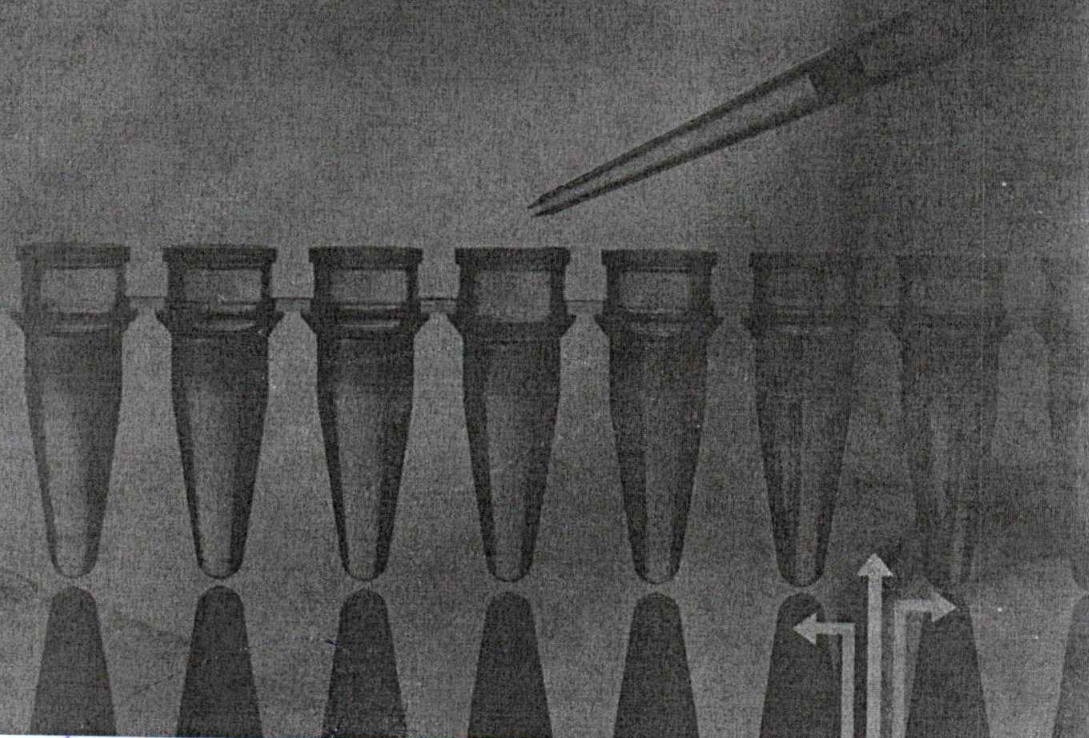
by **CerTest**
BIOTEC

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit

VS-MSA148T



[Handwritten signature]
Luis Quiñones
Luis Quiñones

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA) y/o *Staphylococci coagulasa negativa* resistente a meticilina (MRCoNS) en colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianales humanos en medio sólido cromogénico. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por MRSA en combinación con los signos y síntomas clínicos del paciente y los factores de riesgo epidemiológico. El DNA es extraído a partir de las colonias, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para la identificación de *Staphylococcus aureus* y la determinación de la resistencia a la meticilina.

2. Introducción y explicación

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es quizás el patógeno humano más preocupante debido a su virulencia intrínseca, a su capacidad para causar una gran variedad de infecciones potencialmente mortales y a su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Hoy en día, este organismo es la principal causa global de infecciones asociadas a la atención de la salud en todo el mundo y, a medida que se trata a más pacientes fuera del ámbito hospitalario, es una preocupación creciente en la comunidad. Existen muchos medicamentos antiestafilocócicos, que incluyen meticilina, tetraciclinas, fluoroquinolonas, linezolid y daptomicina, pero pierden rápidamente su valor terapéutico debido a la capacidad de la bacteria para desarrollar mecanismos efectivos para enfrentar este agente.

Además de la creciente importancia de *S. aureus* como patógeno de las infecciones nosocomiales, su resistencia contra varios antibióticos ha empeorado cada vez más. Las cepas de *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistentes a la meticilina no solo son resistentes contra todos los antibióticos beta-lactámicos, sino que también suelen ser multiresistentes contra varias clases de antibióticos, lo que limita las opciones de tratamiento. Las infecciones por MRSA involucran la piel o áreas más profundas del cuerpo en forma de infecciones de la herida o sepsis. Las propiedades causantes de la enfermedad del MRSA no se diferencian de las de los estafilococos sensibles a los antibióticos.

Resistencia a la meticilina en *Staphylococcus* spp. se debe a la adquisición de una proteína de unión a penicilina alterada PBP2a (PBP2'), codificada por el gen *mecA*. El gen *mecA* se transporta en elementos móviles del cromosoma *mec* (SCC*mec*) estafilocócico de casete grande, que se encuentran en los aislamientos de MRSA y MRCoNS. Se han reconocido ocho tipos diferentes de SCC*mec* (I-VIII), que varían en tamaño de 21 a 67 kb, y tienen diferentes conjuntos de genes de *recombinasa ccr*. El tipo de elemento SCC*mec* XI contiene un nuevo homólogo de *mecA* (*mecC*). Este gen muestra solo un 70% de homología de nucleótidos con *mecA* y no es detectable por las pruebas de OCRs específicas de *mecA* y de aglutinación de PBP2a.

S. aureus y MRSA se propagan de vector a persona y de persona a persona, pero existen pocas reservas ambientales fuera del ámbito de la atención médica y las comunidades cerradas. El MRSA es un problema

creciente en instalaciones compartidas como hospitales, centros de salud y hogares de ancianos. Los estudios indican que la incidencia de MRSA en los últimos años ha aumentado considerablemente en todo el mundo. Sin embargo, hay diferencias considerables entre varios países. Mientras que en los Estados Unidos, Japón y los países del sur de Europa existe una alta prevalencia de MRSA entre 20 y 60%, la prevalencia en los países holandeses y escandinavos es inferior al tres por ciento.

Junto con el uso de antibióticos no críticos, la implementación insuficiente de medidas de higiene profiláctica y la capacitación inadecuada del personal son las razones del aumento significativo en la colonización por MRSA. La gestión insuficiente de MRSA conduce a la continua propagación de MRSA en nuestros hospitales. Las medidas urgentemente necesarias en este caso son la introducción de la higiene estándar y el manejo adecuado de brotes, así como el control del uso de antibióticos. En particular, es indispensable la introducción del examen de MRSA basado en un diagnóstico rápido y confiable durante o incluso mejor antes del ingreso hospitalario de pacientes.

Las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) están implicadas en infecciones graves y brotes nosocomiales, y muestran resistencia a una amplia gama de antibióticos, lo que limita las opciones de tratamiento. Por lo tanto, la detección rápida es clínicamente crucial tanto para el tratamiento como para las medidas de control de infecciones.

La adopción de técnicas moleculares ha permitido una detección e identificación más rápida de MRSA en muestras clínicas. Por lo tanto, proporciona la información crítica para determinar las terapias adecuadas para los pacientes con sospecha de infecciones por MRSA y controlar el brote.

3. Procedimiento

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de MRSA, MSSA y *Staphylococci* coagulasa negativa resistente a meticilina (MRCoNS) en colonias aisladas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de MRSA, MSSA y MRCoNS se lleva a cabo mediante la amplificación de los genes SA442 (si está presente) / CoA, SCCmec-orfX junction y los genes *mecA/ mecC*.

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Cada kit incluye dos tipos de tubos y cada uno de ellos corresponde a un ensayo diferente. El primer tubo contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *Staphylococcus aureus* y los genes *mecA/mecC* (MRSA 1: SAU + MEC A/C Reaction-Mix tube). Los genes SA442/CoA (*S. aureus*) se amplifican y detectan en el canal FAM, los genes *mecA/mecC* se amplifican y detectan en el canal ROX y el control interno (IC) en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).



seleccione el adecuado) canal de detección, ver Anexo 2). El segundo tubo contiene la mezcla de reacción múltiple para la detección de la unión SCCmec-orfX (MRSA 2: tiras ORFX de Reaction-Mix tube). SCCmec-orfX junction se amplifica y se detecta en el canal FAM y el control interno (IC) en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado, consulte el Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
MRSA 1: SAU + MEC A/C Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	2 viales
MRSA 2: ORFX Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	2 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MSA148T.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo tubos individuales, tiras de tubos y/o placas).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 μ L, 20-200 μ L).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer,

VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar los kits de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, excepto el tubo de Reaction-Mix rehidratado. Una vez los viales Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Reaction-Mix han sido reconstituidos pueden mantenerse a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).
- El vial con la mezcla de reacción rehidratada que no se utilice, se debe cerrar y almacenar en el interior del pouch con el material desecante para protegerlo de la luz y la humedad.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.

- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Asegurarse de usar un pocillo para la detección de MRSA 1: SAU + MEC A/C y otro para el ensayo de MRSA 2: ORFX. Tener precaución para que no se mezclen durante el proceso.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.
- *S. aureus* se encuentra en el ambiente y además la mayoría de las personas sanas lo portan en la piel y las membranas mucosas (con mayor frecuencia en el área nasal). Cuando se lleve a cabo el test VIASURE, se debe tener especial cuidado para evitar la posible contaminación de muestras y reactivos por parte del operador.

8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA a partir de colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianal humanos en medio sólido cromogénico puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNasa/DNasa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.



8.3. Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

8.4. Protocolo PCR

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

Añadir 15 µL de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los tubos con los tapones o sellar la placa. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

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

Tabla 2. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*S. aureus* (genes SA442/CoA) y SCCmec-*orfX* junction), ROX (genes *mecA/mecC*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (MRSA 1: SAU + MEC A/C).

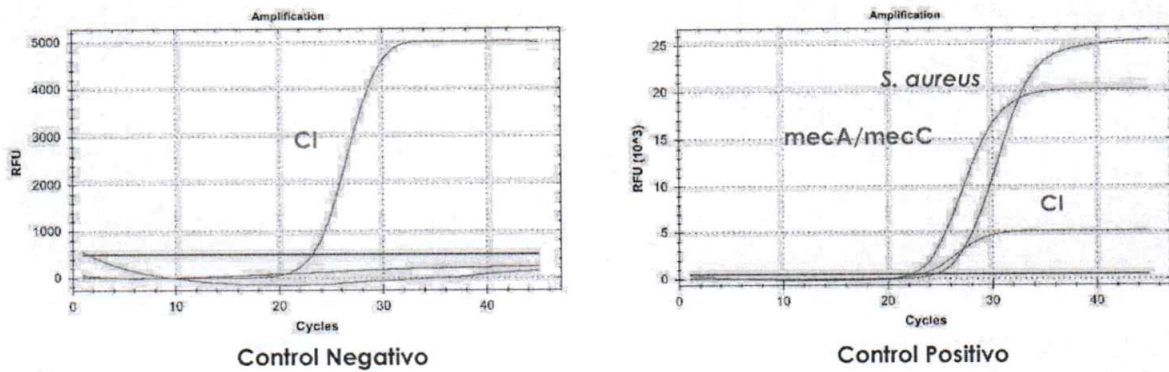
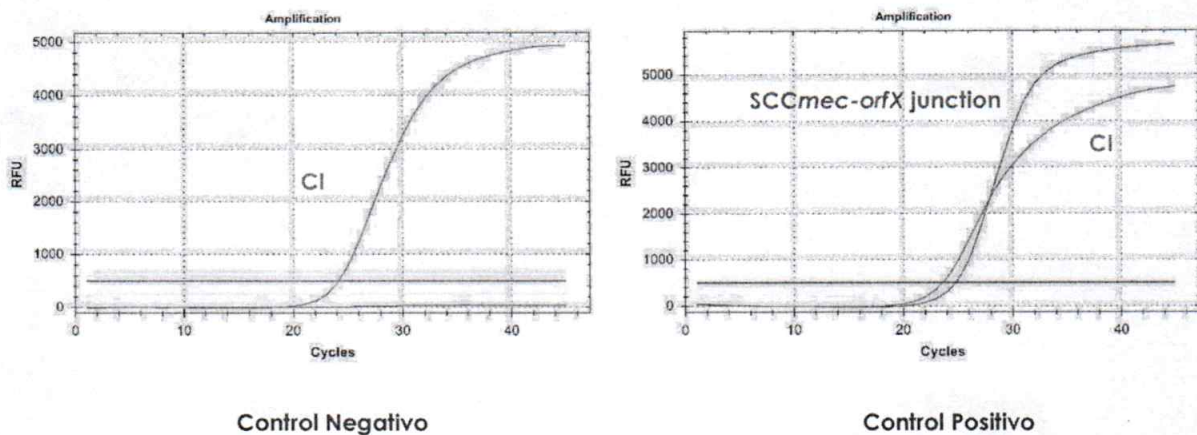


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (MRSA 2: ORFX).



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianal humanos en medio sólido cromogénico.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de MRSA, lo que da como resultado un falso negativo con VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.
- Un resultado positivo con el test VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit no indica necesariamente un fracaso del tratamiento de erradicación, ya que el DNA puede persistir. Un resultado negativo obtenido tras un resultado positivo anterior de la prueba puede indicar el éxito del tratamiento de erradicación, o puede deberse a una colonización intermitente.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de organismos viables. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de DNA de MRSA, ya que el test VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit detecta la región *SCCmec/orfX* junction, y secuencias específicas de *S. aureus* localizadas en los genes SA442 and CoA, y los genes *mecA* y *mecC*.

11. Control de calidad

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit se evaluó utilizando 105 muestras positivas de MRSA mediante cultivo microbiológico convencional. En resumen, las muestras nasales / faríngeas y perineales con sospecha clínica de colonización por MRSA se sembraron en medio de agar MRSA de *S. aureus* (oxoide) y se incubaron en condiciones aeróbicas a 37°C durante 18-24 horas. Se seleccionaron las colonias y se prepararon muestras hervidas, y se analizaron con el kit de detección VIASURE. 103/105 muestras fueron positivas para MRSA de acuerdo con ambos métodos de detección. 2/105 se detectaron como positivos para MSSA (positivos para *S. aureus* y *SCCmec-orfX*), 1/105 muestra positiva para resistencia a meticilina / oxacilina diferente de *S. aureus* (positiva para *mecA* / *mecC*), 3/105 muestras positivas para MSSA y MRCoNS (positivos para *S. aureus* y *mecA* / *mecC*, pero negativos para *SCCmec-orfX*).



En conclusión, los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA) y / o estafilococos coagulasa negativos resistentes a meticilina utilizando VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 100 copias de DNA por reacción para *S. aureus* (genes SA442 / CoA), ≥ 50 copias de DNA por reacción para genes *mecA* / *mecC* y ≥ 10 copias de DNA por reacción para SCC*mec-orfX* junction. (Figura 3, 4 y 5).

Figura 3. Diluciones seriadas de *S. aureus* (genes SA442/CoA) (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 1: SAU + MEC A/C, canal FAM).

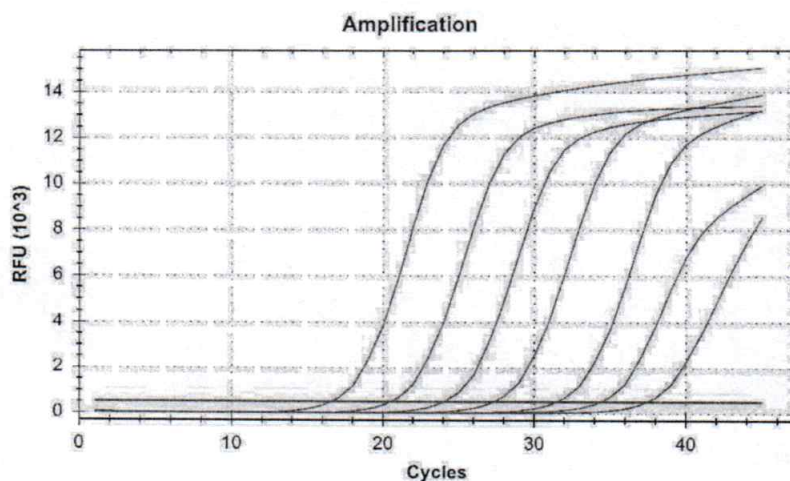
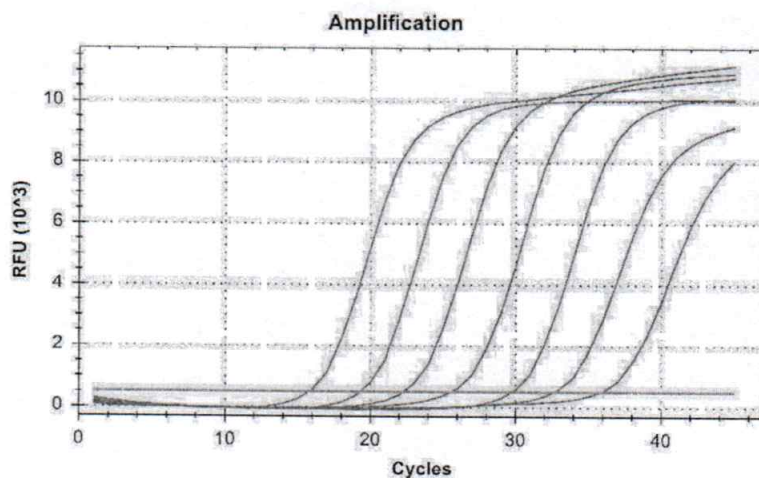


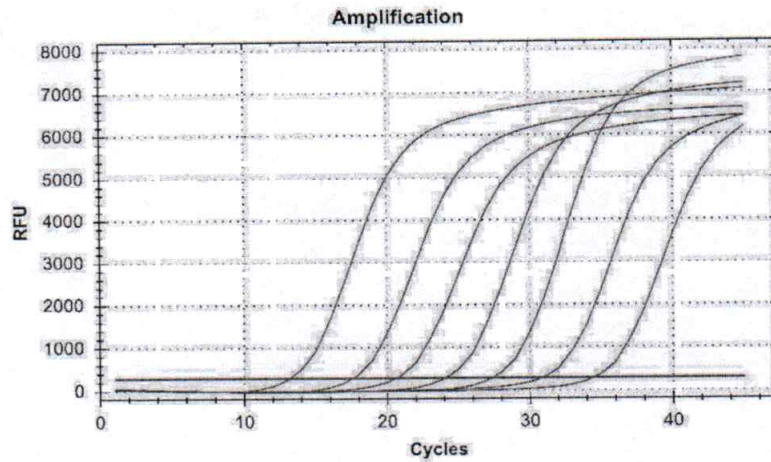
Figura 4. Diluciones seriadas de los genes *mecA*/*mecC* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 1: SAU + MEC A/C, canal ROX).



Claudia Estévez
 BIOQ. CLAUDIA ESTÉVEZ
 DIRECTOR TÉCNICO



Figura 5. Diluciones seriadas de SCCmec-orfX junction (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 2: ORFX, canal FAM).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Prueba de reacción cruzada			
Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2146G)	-
Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2147G)	-
Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) y KPC-2	-	<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	-
<i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244	-	<i>Enterococcus faecium</i> cepa LMG16165 tipo VanA	-
<i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1 tipo VanA	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2 tipo VanB	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	-
<i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7	-	<i>E. faecalis</i> (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz tipo VanB	-
<i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142 tipos VanC y VanB	-
Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC	-

Tabla 4. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.



12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MRSA** se evaluó frente a *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) strain N315, MRSA sequence type 398, MRSA strain (oxa^R, PVL-positive, spa type t310), MRSA strain (oxa^R, PVL-positive, spa type t008), MRSA strain (oxa^R, PVL-neg), MRSA spa type t002, MRSA spa type t020, MRSA spa type t127, MRSA spa type t4545, MRSA (mecC, spa type t7734), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MSSA + MR-CoNS** se evaluó frente a: *S. aureus* + *S. epidermidis* (oxa^R, PVL-pos); and MSSA ATCC 29213 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach) + MRCoNS 634 (*Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci* 634), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MR-CoNS** se evaluó frente a MRCoNS 634 (*Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci* 634), mostrando un resultado positivo.











La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MSSA** se evaluó frente a MSSA (spa type t177), mostrando un resultado positivo.



13. Bibliography/Bibliografía

1. A. Pournajaf *et al.* PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their antibiotic resistance profiles. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2014. 4(Suppl 1): S293–S297.
2. O.O. Soge *et al.* Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from US West Coast public marine beaches. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009. 64(6):1148-55.
3. R.H. Nijhuis *et al.* A rapid and high-throughput screening approach for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on the combination of two different real-time PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52(8): 2861-2867
4. H.Y. Wang *et al.* Multiplex real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant staphylococci directly from positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52(6): 1911-1920.
5. C. Seidel *et al.* Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) for reliable, simple and rapid detection of the methicillin resistance genes *mecA* and *mecC*. *Veterinary Microbiology* 2017; 200: 101-106.
6. J.U. Kim *et al.* Multiplex real-time PCR assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains suitable in regions of high MRSA endemicity. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(3): 1008-1013.
7. N.S. Sabet *et al.* Simultaneous species identification and detection of methicillin resistance in staphylococci using triplex real-time PCR assay. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2006; 56(1): 13-18.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

 <p>In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i></p>	 <p>Keep dry Almacenar en lugar seco</p>	 <p>Use by Fecha de caducidad</p>	 <p>Manufacturer Fabricante</p>	 <p>Batch code Número de lote</p>
 <p>Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso</p>	 <p>Temperature limitation Limitación de temperatura</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test</p>	 <p>Sample diluent Diluyente de muestra</p>	 <p>Catalogue number Número de referencia</p>

[Handwritten signature]
 BIOARS S.A.
 BIOD. CLAUDIA ETCHEVÉS
 DIRECTOR TÉCNICO

[Handwritten signature]

BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

- (1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.
- (3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.
- (4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.
- (5) No lectura en canal Cy5.
- (6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.



ANEXO 2

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 Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)). Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real

Handwritten signature and stamp



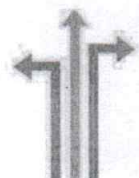
ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

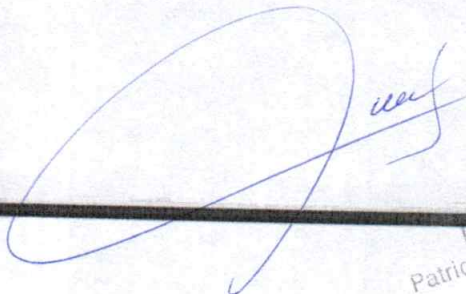
*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: February 2021

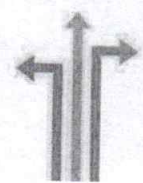
IU-MSA148Tenes0221 rev.00



BIOMARS S.A.
Patricia del Campillo Michavés
Presidente



BIOMARS S.A.
Patricia del Campillo Michavés
DIRECTOR TÉCNICO





CerTest Biotec, S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II - Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC

Patricia del Carmen Etche
Presidente

[Signature]
DIRECTOR GENERAL

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

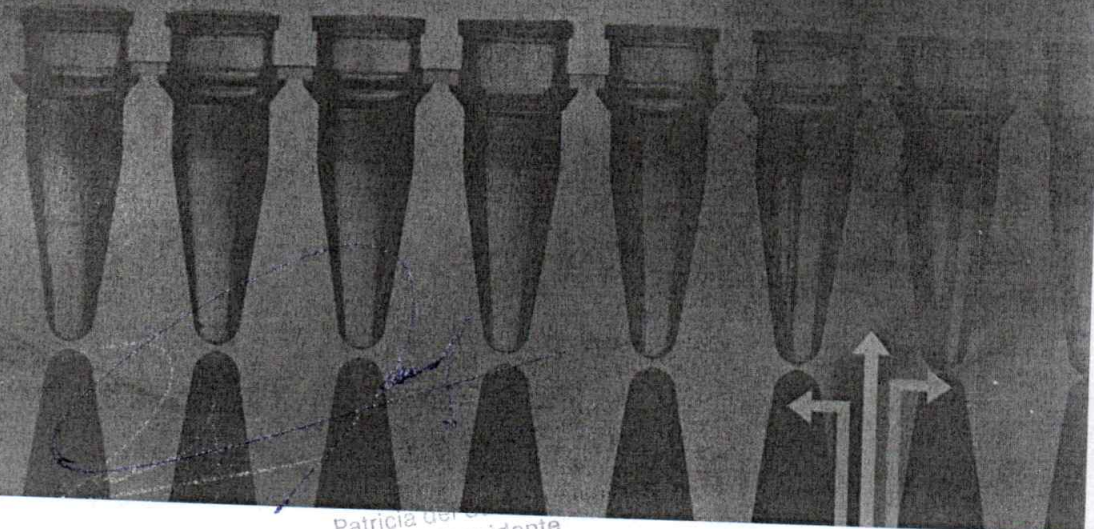
by CerTest
BIOTEC

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit

VS-MSA148TE



Patricia del
Presidente

ESPAÑOL**1. Uso previsto**

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA) y/o *Staphylococci* coagulasa negativa resistente a meticilina (MRCONS) en colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianales humanos en medio sólido cromogénico. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por MRSA en combinación con los signos y síntomas clínicos del paciente y los factores de riesgo epidemiológico. El DNA es extraído a partir de las colonias, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para la identificación de *Staphylococcus aureus* y la determinación de la resistencia a la meticilina.

2. Introducción y explicación

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es quizás el patógeno humano más preocupante debido a su virulencia intrínseca, a su capacidad para causar una gran variedad de infecciones potencialmente mortales y a su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Hoy en día, este organismo es la principal causa global de infecciones asociadas a la atención de la salud en todo el mundo y, a medida que se trata a más pacientes fuera del ámbito hospitalario, es una preocupación creciente en la comunidad. Existen muchos medicamentos antiestafilocócicos, que incluyen meticilina, tetraciclinas, fluoroquinolonas, linezolid y daptomicina, pero pierden rápidamente su valor terapéutico debido a la capacidad de la bacteria para desarrollar mecanismos efectivos para enfrentar este agente.

Además de la creciente importancia de *S. aureus* como patógeno de las infecciones nosocomiales, su resistencia contra varios antibióticos ha empeorado cada vez más. Las cepas de *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistentes a la meticilina no solo son resistentes contra todos los antibióticos beta-lactámicos, sino que también suelen ser multiresistentes contra varias clases de antibióticos, lo que limita las opciones de tratamiento. Las infecciones por MRSA involucran la piel o áreas más profundas del cuerpo en forma de infecciones de la herida o sepsis. Las propiedades causantes de la enfermedad del MRSA no se diferencian de las de los estafilococos sensibles a los antibióticos.

Resistencia a la meticilina en *Staphylococcus* spp. se debe a la adquisición de una proteína de unión a penicilina alterada PBP2a (PBP2'), codificada por el gen *mecA*. El gen *mecA* se transporta en elementos móviles del cromosoma *mec* (SCCmec) estafilocócico de casete grande, que se encuentran en los aislamientos de MRSA y MRCONS. Se han reconocido ocho tipos diferentes de SCCmec (I-VIII), que varían en tamaño de 21 a 67 kb, y tienen diferentes conjuntos de genes de *recombinasa ccr*. El tipo de elemento SCCmec XI contiene un nuevo homólogo de *mecA* (*mecC*). Este gen muestra solo un 70% de homología de nucleótidos con *mecA* y no es detectable por las pruebas de OCRs específicas de *mecA* y de aglutinación de PBP2a.

S. aureus y MRSA se propagan de vector a persona y de persona a persona, pero existen pocas reservas ambientales fuera del ámbito de la atención médica y las comunidades cerradas. El MRSA es un problema

creciente en instalaciones compartidas como hospitales, centros de salud y hogares de ancianos. Los estudios indican que la incidencia de MRSA en los últimos años ha aumentado considerablemente en todo el mundo. Sin embargo, hay diferencias considerables entre varios países. Mientras que en los Estados Unidos, Japón y los países del sur de Europa existe una alta prevalencia de MRSA entre 20 y 60%, la prevalencia en los países holandeses y escandinavos es inferior al tres por ciento.

Junto con el uso de antibióticos no críticos, la implementación insuficiente de medidas de higiene profiláctica y la capacitación inadecuada del personal son las razones del aumento significativo en la colonización por MRSA. La gestión insuficiente de MRSA conduce a la continua propagación de MRSA en nuestros hospitales. Las medidas urgentemente necesarias en este caso son la introducción de la higiene estándar y el manejo adecuado de brotes, así como el control del uso de antibióticos. En particular, es indispensable la introducción del examen de MRSA basado en un diagnóstico rápido y confiable durante o incluso mejor antes del ingreso hospitalario de pacientes.

Las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) están implicadas en infecciones graves y brotes nosocomiales, y muestran resistencia a una amplia gama de antibióticos, lo que limita las opciones de tratamiento. Por lo tanto, la detección rápida es clínicamente crucial tanto para el tratamiento como para las medidas de control de infecciones.

La adopción de técnicas moleculares ha permitido una detección e identificación más rápida de MRSA en muestras clínicas. Por lo tanto, proporciona la información crítica para determinar las terapias adecuadas para los pacientes con sospecha de infecciones por MRSA y controlar el brote.

3. Procedimiento

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de MRSA, MSSA y *Staphylococci* coagulasa negativa resistente a meticilina (MRCoNS) en colonias aisladas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de MRSA, MSSA y MRCoNS se lleva a cabo mediante la amplificación de los genes SA442 (si está presente) / CoA, SCCmec-orfX junction y los genes mecA/ mecC.

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede adicionarse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa. Cada kit incluye dos tipos de tubos y cada uno de ellos corresponde a un ensayo diferente. El primer tubo contiene la mezcla de reacción multiplex para *Staphylococcus aureus* y los genes mecA/mecC (MRSA 1: SAU + MEC A/C Reaction-Mix tube). Los genes

SA442/CoA (*S. aureus*) se amplifican y detectan en el canal FAM, los genes *mecA/mecC* se amplifican y detectan en el canal ROX y el control de extracción (CE) en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado, seleccione el adecuado) canal de detección, ver Anexo 2). El segundo tubo contiene la mezcla de reacción múltiple para la detección de la unión SCC*mec-orfX* (MRSA 2: ORFX Reaction-Mix tube). SCC*mec-orfX* junction se amplifica y se detecta en el canal FAM y el control de extracción (CE) en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado, consulte el Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
MRSA 1: SAU + MEC A/C Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	2 viales
MRSA 2: ORFX Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	2 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MSA148TE.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo tubos individuales, tiras de tubos y/o placas).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time



PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte de los kits puede realizarse de 2-40°C.
- Almacenar los kits de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, excepto el tubo de Reaction-Mix rehidratado. Una vez los viales *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Reaction-Mix han sido reconstituidos pueden mantenerse a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).
- El vial con la mezcla de reacción rehidratada que no se utilice, se debe cerrar y almacenar en el interior del pouch con el material desecante para protegerlo de la luz y la humedad.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.



- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Asegurarse de usar un pocillo para la detección de MRSA 1: SAU + MEC A/C y otro para el ensayo de MRSA 2: ORFX. Tener precaución para que no se mezclen durante el proceso.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.
- *S. aureus* se encuentra en el ambiente y además la mayoría de las personas sanas lo portan en la piel y las membranas mucosas (con mayor frecuencia en el área nasal). Cuando se lleve a cabo el test VIASURE, se debe tener especial cuidado para evitar la posible contaminación de muestras y reactivos por parte del operador.

8. Procedimiento del test

8.1. Control de extracción liofilizado

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

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

8.2. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Si el Control de Extracción se utiliza para monitorizar el proceso de aislamiento de los ácidos nucleicos y como control de la posible inhibición de la PCR, añadir 5µL del CE a la muestra o a la mezcla del tampón de lisis-muestra. (muestras clínicas, control positivo y/o negativo). Cerrar cada uno de los tubos y mezclar con la ayuda del vórtex durante 10 segundos.

Si el Control de Extracción se emplea sólo como control de inhibición de la PCR, añadir 1 µl de CE a la mezcla de reacción reconstituida.

Para la extracción de DNA a partir de colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianal humanos en medio sólido cromogénico puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).

8.3. Control positivo liofilizado

El vial de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.4. Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).



8.5. Protocolo PCR

1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

2) Añadir muestras y controles.

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

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

Añadir 5 µL de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

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

Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

3) Configurar el termociclador. (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

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

Tabla 2. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*S. aureus* (genes SA442/CoA) y SCCmec-orfX junction), ROX (genes mecA/mecC) y HEX, JOE o VIC (Control de Extracción (CE)). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Comprobar la emisión de la señal del Control de Extracción (CE) para verificar el proceso de extracción y el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de

acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

S. aureus (genes SA442/CoA) (FAM, strip 1)	Genes mecA/mecC (ROX, strip 1)	SCCmec-orfX junction (FAM, strip 2)	Control de extracción (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	MRSA*
+	+	-	+/-	-	+	MSSA** y MRCoNS***
+	-	+	+/-	-	+	MSSA**
+	-	-	+/-	-	+	MSSA**
-	+	-	+/-	-	+	MRCoNS*** (Resistencia meticilina/oxacilina diferente de S. aureus)
-	-	-	+	-	+	Negativo
-	-	-	-	-	+	Inválido

Tabla 3. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

*MRSA. S. aureus resistente a la meticilina.

**MSSA. S-aureus sensible a la meticilina.

*** MRCoNS. Staphylococci coagulasa negativa resistente a meticilina.

Una muestra se considera positiva, si el **valor Ct obtenido es menor de 35** y el Control de Extracción muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del Control Extraction 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.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el Control de Extracción si la presenta. Un fallo en el proceso de extracción y la inhibición de la reacción de PCR pueden ser excluidas por la amplificación del Control de Extracción.



Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (MRSA 1: SAU + MEC A/C).

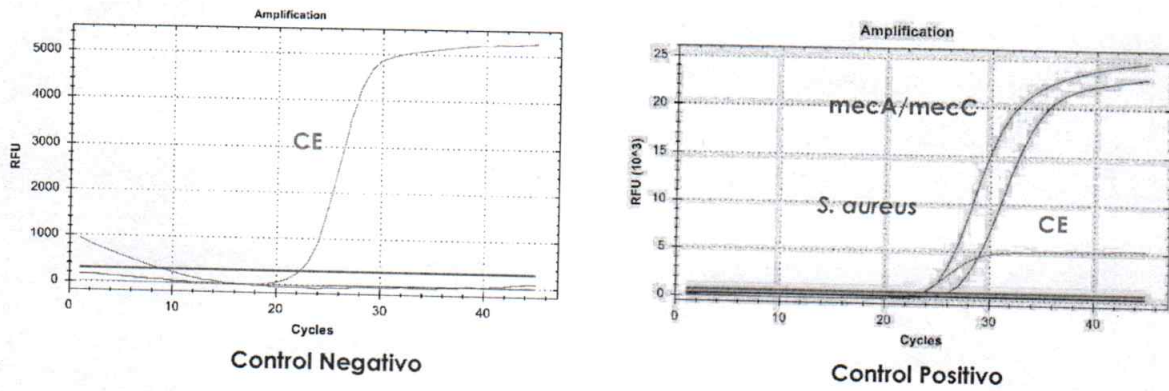
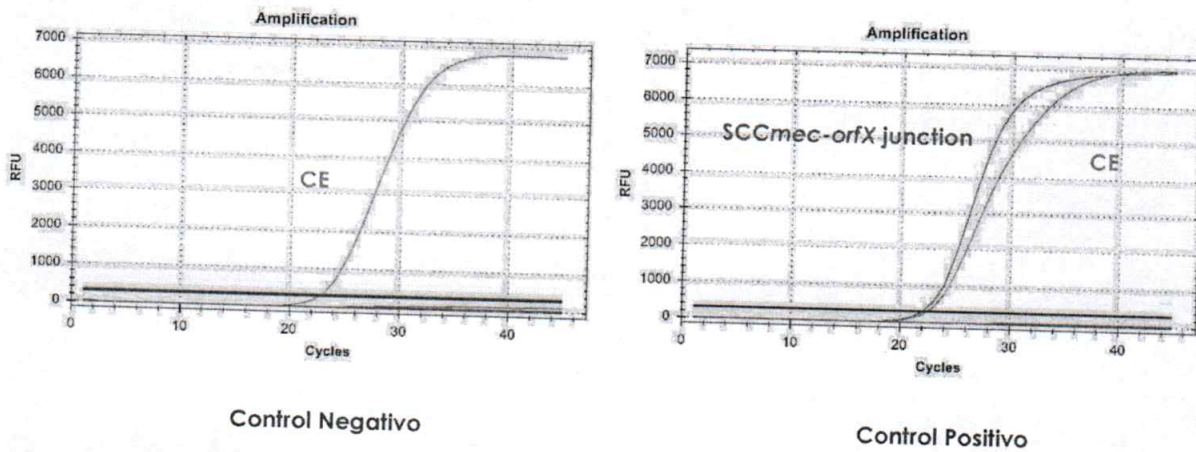


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (MRSA 2: ORFX).



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de ambos, el Control de Extracción y de la muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas durante la purificación de los ácidos nucleicos de y/o inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

En los controles de extracción se pueden observar diferencias en los valores de Ct entre las muestras control (control negativo y control positivo) y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

Para muestras en el límite de detección (LOD) o muestras negativas con un valor de Ct para el control de extracción ≥ 35 , se recomienda filtrar la muestra, o diluir el extraído (1:10 and 1:100) para evitar las posibles interferencias e inhibidores en la reacción de amplificación. Conviene revisar las instrucciones de uso del proceso de extracción empleado por el usuario.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianal humanos en medio sólido cromogénico.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de MRSA, lo que da como resultado un falso negativo con VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.
- Un resultado positivo con el test VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit no indica necesariamente un fracaso del tratamiento de erradicación, ya que el DNA puede persistir. Un resultado negativo obtenido tras un resultado positivo anterior de la prueba puede indicar el éxito del tratamiento de erradicación, o puede deberse a una colonización intermitente.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de organismos viables. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de DNA de MRSA, ya que el test VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit detecta la región *SCCmec/orfX* junction, y secuencias específicas de *S. aureus* localizadas en los genes SA442 and CoA, y los genes *mecA* y *mecC*.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el Agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos de debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.

11. Control de calidad

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control de extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit se evaluó utilizando 105 muestras positivas de MRSA mediante cultivo microbiológico convencional. En resumen, las muestras nasales / faríngeas y perineales con sospecha clínica de colonización por MRSA se sembraron en medio de agar MRSA de *S. aureus* (oxoide) y se incubaron en condiciones aeróbicas a 37°C durante 18-24 horas. Se seleccionaron las colonias y se prepararon muestras hervidas, y se analizaron con el kit de detección VIASURE. 103/105 muestras fueron positivas para MRSA de acuerdo con ambos métodos de detección. 2/105 se detectaron como positivos para MSSA (positivos para *S. aureus* y SCCmec-orfX), 1/105 muestra positiva para resistencia a meticilina / oxacilina diferente de *S. aureus* (positiva para *mecA* / *mecC*), 3/105 muestras positivas para MSSA y MRCoNS (positivos para *S. aureus* y *mecA* / *mecC*, pero negativos para SCCmec-orfX).

En conclusión, los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA) y / o estafilococos coagulasa negativos resistentes a meticilina utilizando VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 100 copias de DNA por reacción para *S. aureus* (genes SA442 / CoA), ≥ 50 copias de DNA por reacción para genes *mecA* / *mecC* y ≥ 10 copias de DNA por reacción para SCCmec-orfX junction. (Figura 3, 4 y 5).

Figura 3. Diluciones seriadas de *S. aureus* (genes SA442/CoA) (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 1: SAU + MEC A/C, canal FAM).

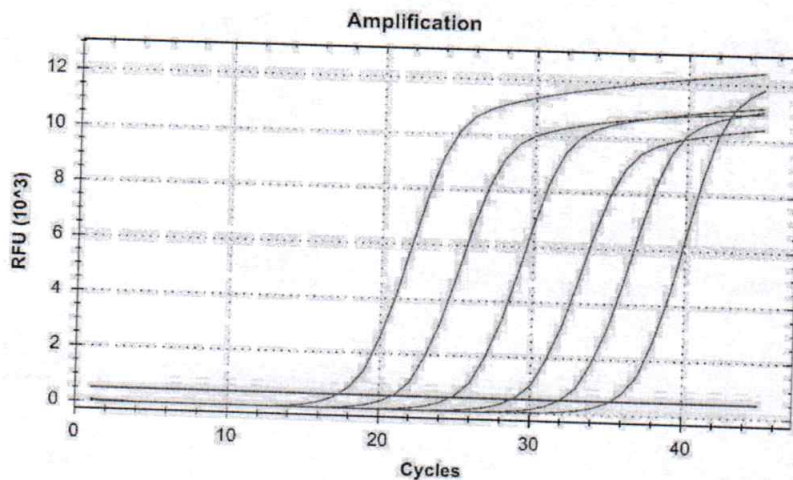


Figura 4. Diluciones seriadas de los genes *mecA/mecC* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 1: SAU + MEC A/C, canal ROX).

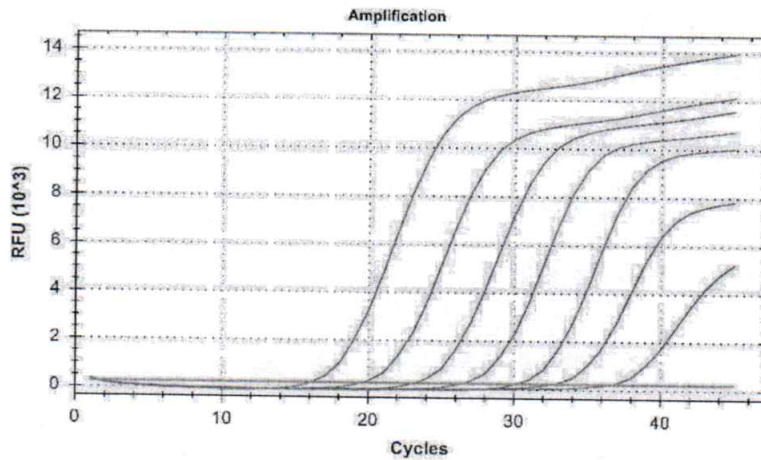
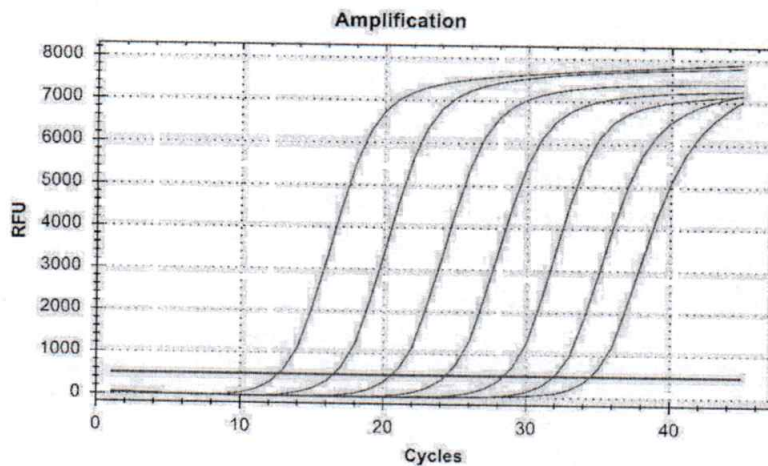


Figura 5. Diluciones seriadas de SCC*mec-orfX* junction (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 2: ORFX, canal FAM).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.



Prueba de reacción cruzada			
Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2146G)	-
Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2147G)	-
Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) y KPC-2	-	<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	-
<i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244	-	<i>Enterococcus faecium</i> cepa LMG16165 tipo VanA	-
<i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1 tipo VanA	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2 tipo VanB	-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	-
<i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7	-	<i>E. faecalis</i> (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz tipo VanB	-
<i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142 tipos VanC y VanB	-
Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC	-

Tabla 4. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MRSA** se evaluó frente a *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) strain N315, MRSA sequence type 398, MRSA strain (oxa^R, PVL-positive, spa type t310), MRSA strain (oxa^R, PVL-positive, spa type t008), MRSA strain (oxa^R, PVL-neg), MRSA spa type t002, MRSA spa type t020, MRSA spa type t127, MRSA spa type t4545, MRSA (mecC, spa type t7734), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MSSA + MR-CoNS** se evaluó frente a: *S. aureus* + *S. epidermidis* (oxa^R, PVL-pos); and MSSA ATCC 29213 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach) + MRCoNS 634 (Meticillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* 634), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MR-CoNS** se evaluó frente a MRCoNS 634 (Meticillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* 634), mostrando un resultado positivo.











La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MSSA** se evaluó frente a MSSA (spa type t177), mostrando un resultado positivo.



13. Bibliography/Bibliografía

1. A. Pournajaf *et al.* PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their antibiotic resistance profiles. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2014. 4(Suppl 1): S293–S297.
2. O.O. Soge *et al.* Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from US West Coast public marine beaches. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009. 64(6):1148-55.
3. R.H. Nijhuis *et al.* A rapid and high-throughput screening approach for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on the combination of two different real-time PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52(8): 2861-2867
4. H.Y. Wang *et al.* Multiplex real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant staphylococci directly from positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52(6): 1911-1920.
5. C. Seidel *et al.* Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) for reliable, simple and rapid detection of the methicillin resistance genes *mecA* and *mecC*. *Veterinary Microbiology* 2017; 200: 101-106.
6. J.U. Kim *et al.* Multiplex real-time PCR assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains suitable in regions of high MRSA endemicity. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(3): 1008-1013.
7. N.S. Sabet *et al.* Simultaneous species identification and detection of methicillin resistance in staphylococci using triplex real-time PCR assay. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2006; 56(1): 13-18.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

 <p>In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i></p>	 <p>Keep dry Almacenar en lugar seco</p>	 <p>Use by Fecha de caducidad</p>	 <p>Manufacturer Fabricante</p>	 <p>Batch code Número de lote</p>
 <p>Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso</p>	 <p>Temperature limitation Limitación de temperatura</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test</p>	 <p>Sample diluent Diluyente de muestra</p>	 <p>Catalogue number Número de referencia</p>

ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbot	Abbot m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
 (2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.
 (3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.
 (4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.
 (5) No lectura en canal Cy5.
 (6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.



ANEXO 2

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 Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: June 2020

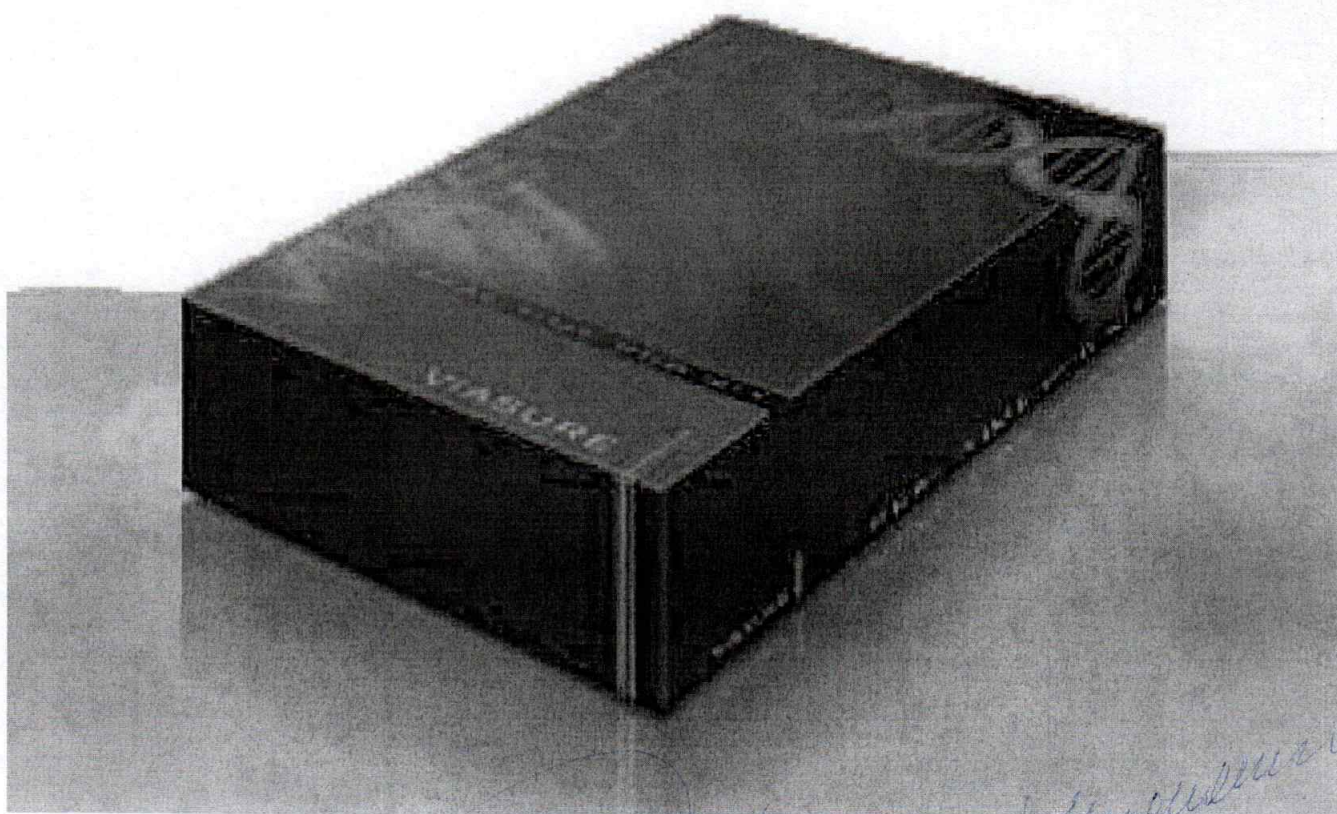


VIASURE S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta



VIASURE S.A.
Claudio Etchevés
DIRECTOR TÉCNICO





Handwritten signature
DARS S.A.
Patricia del Carmen Echevés
Presidenta





CerTest Biotec, S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II - Calle J, Nº1
50840. San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC

Handwritten signature
www.certest.es

VIASURE

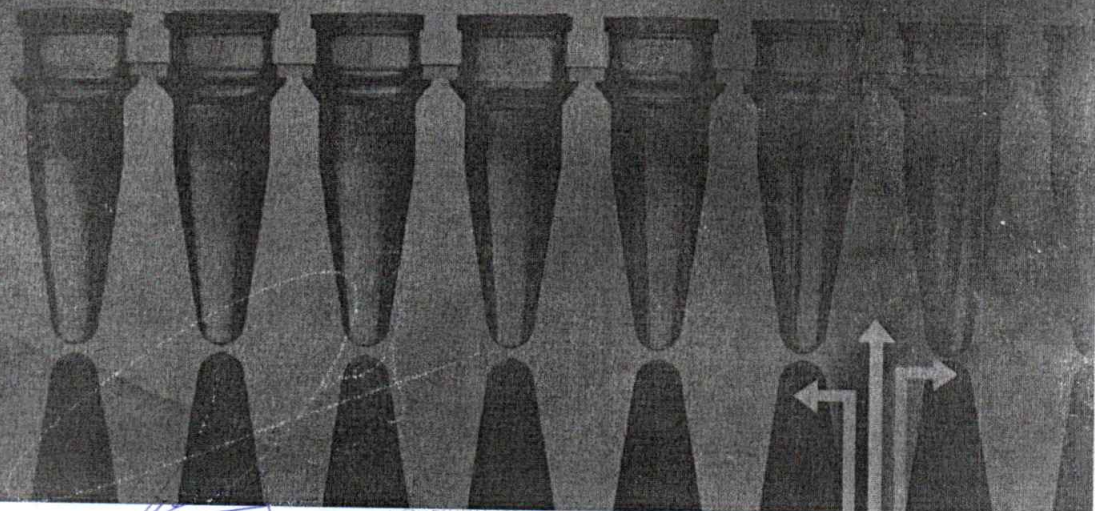
Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Vancomycin resistance

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-VAN106L
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-VAN106H
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-VAN112L
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-VAN112H
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-VAN113L
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-VAN113H
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-VAN136
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-VAN172



ESPAÑOL**1. Uso previsto**

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a vancomicina (ERV) en muestras clínicas de pacientes con signos y síntomas de infección bacteriana. El uso previsto del test es facilitar la identificación de organismos resistentes a la vancomicina en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de muestras clínicas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar los genes *vanA* y *vanB*.

2. Introducción y explicación

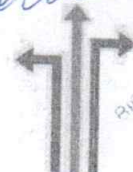
Los enterococos son organismos comensales comunes que se encuentran en el tracto gastrointestinal y en los genitales femeninos. Recientemente se les reconoce como patógenos oportunistas que causan infecciones nosocomiales como infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel, infecciones respiratorias, endocarditis y sepsis en individuos inmunocomprometidos.

La vancomicina es un antibiótico glucopéptido que inhibe la síntesis de la pared celular y se usa para tratar infecciones graves por bacterianas gram-positivas. Los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) se describieron por primera vez en Inglaterra y Francia en 1986, habiéndose extendido en la actualidad a través de los hospitales de todo el mundo.

La resistencia a la vancomicina es un proceso complejo y necesita la presencia de diferentes clusters de genes. Principalmente, se pueden dividir en dos tipos dependiendo atendiendo a los precursores pentapéptidos producidos por genes de resistencia a la vancomicina; el precursor que termina en D-Alanina-D-Serina (VanC-, VanE-, VanG-, VanL- y VanN-type) o el que termina en D-Alanine-D-Lactate (VanA-, VanB-, VanD- y VanM- tipo). Estos precursores pentapéptidos muestran una baja afinidad por los glucopéptidos, confiriendo así la resistencia a la vancomicina en los enterococos.

El primer tipo de resistencia a la vancomicina en los enterococos se considera resistencia intrínseca (ej. asociada con el gen *vanC*). Aislados de *Enterococcus gallinarum* y *E. casseliflavus* / *E. flavescens* muestran esta resistencia inherente a la vancomicina de bajo nivel. Mientras que, el segundo tipo es la resistencia adquirida (ej. relacionada con los genes *vanA* o *vanB*). En este caso, los enterococos pueden volverse resistentes mediante la adquisición de elementos genéticos móviles (transposones y plásmidos) de otra especie de *Enterococcus* u organismo. Más comúnmente, esta resistencia se observa en *E. faecium* y *E. faecalis*, pero también se ha reconocido en *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* y otras especies de enterococos. Los genes *vanA* y *vanB* son responsables de una resistencia a la vancomicina alta o moderada.

La transmisión de enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) puede ocurrir por contacto directo con fluidos corporales de pacientes colonizados o infectados (sangre, drenaje de heridas, orina, heces, esputo y otros) o por contacto indirecto a través de las manos de los trabajadores de la salud, o a través de equipos de cuidado de pacientes o superficies ambientales contaminadas.



Inicialmente, el método de detección más comúnmente aplicado se basó en técnicas de cultivo, que conllevan mucho tiempo y generalmente toman de uno a cinco días para completarse. Para acortar el tiempo de detección y mejorar la sensibilidad, los ensayos de PCR en Tiempo Real han demostrado ser una herramienta para la detección de genes clínicamente relevantes asociados con la resistencia a la vancomicina.

3. Procedimiento

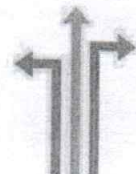
VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección y diferenciación de los genes *vanA* y *vanB* asociados con *eneterococos* resistentes a la vancomicina (ERV) en muestras clínicas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de la resistencia a vancomicina se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes *vanA* y *vanB*.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la amplificación, el gen *vanA* se detecta en el canal FAM, el gen *vanB* se detecta en el canal ROX y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1, 2 y 3. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 3 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.



Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Vancomycin resistance 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Vancomycin resistance Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-VAN106L, VS-VAN106H, VS-VAN112L y VS-VAN112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Vancomycin resistance 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Vancomycin resistance Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

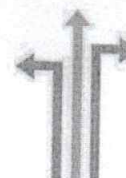
Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-VAN113L y VS-VAN113H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Vancomycin resistance 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Vancomycin resistance Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	9/18 tiras de 4 tapones

Tabla 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-VAN136 y VS-VAN172. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit.



[Handwritten signature]
BIOARS S.A.
BIO CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrifuga para tubos de 1.5 mL. y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después



de cada uso (si está disponible, Ref. VS-VAN113L, VS-VAN113H, VS-VAN136 y VS-VAN172). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.

- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para referencias VS-VAN136 y VS-VAN172 (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

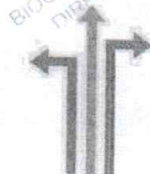
8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de DNA a partir de muestras clínicas puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).



8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Vancomycin resistance* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Vancomycin resistance* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Protocolo PCR

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

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

Añadir 15 µL del Rehydration Buffer (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra de *Vancomycin resistance* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

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

Tabla 4. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (gen *vanA*), ROX (gen *vanB*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500

Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Vancomycin resistance*. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

gen vanA (FAM)	gen vanB (ROX)	Control interno (HEX)	Control negativo	Control positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	gen vanA y gen vanB Positivos
-	-	+	-	+	gen vanA y gen vanB Negativos
+	-	+/-	-	+	gen vanA Positivo y gen vanB Negativo
-	+	+/-	-	+	gen vanA Negativo y gen vanB Positivo
-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	Inválido

Tabla 5. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

Handwritten signature
 BIOARS S.A.
 BIODIAGNÓSTICA
 DIRECTOR TÉCNICO

BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente

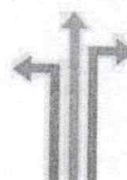
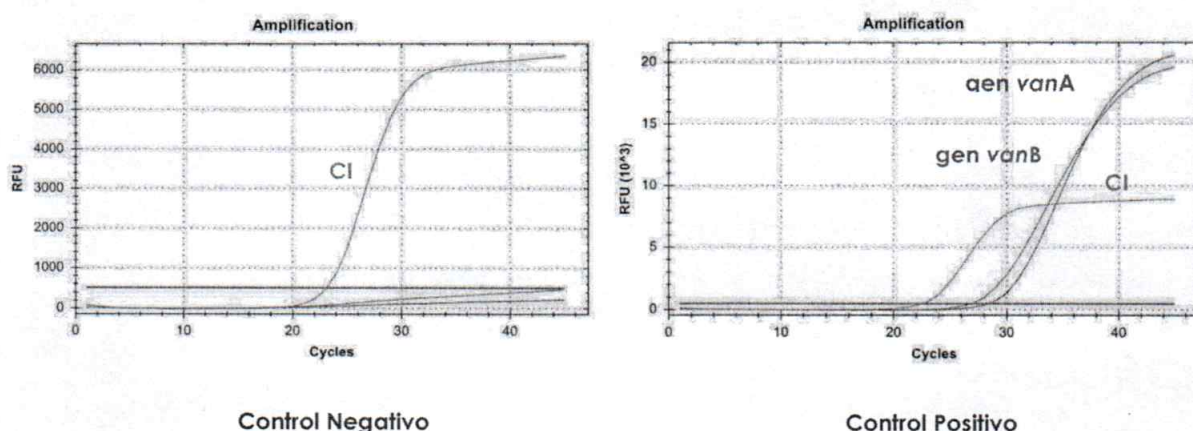


Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras fecales humanas y especímenes aislados de enterococos de origen humano.
- 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. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Vancomycin resistance* Positive Control ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit se evaluó mediante 3 paneles EQA diferentes (QCMD 2017 *Vancomycin Resistant Enterococci* EQA Pilot Study e INSTAND Bacterial Genome Detection - VRE (*Vancomycin Resistant Enterococci*)). Estos paneles constan de 20 muestras clínicas disueltas en medio de transporte. Los resultados obtenidos se compararon con los informes finales de los programas. Estas muestras incluyen 6 aislados positivos para el gen *vanA* los cuales contienen *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. avium* y 7 muestras positivas para el gen *vanB* las cuales contienen aislados de *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. gallinarum*. Además, las especies *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, las cuales no albergan los genes *vanA* y *vanB*, se confirmaron como negativos.

Además, se probó el ensayo VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit utilizando 23 aislados de enterococos procedentes de pacientes sintomáticos. 21 de las muestras fueron positivas para el gen *vanA* y 1 muestra positiva para el gen *vanB*. Estos resultados se confirmaron con los obtenidos con la técnica de diagnóstico de rutina

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar los genes *vanA* y *vanB* utilizando VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para los genes *vanA* y *vanB*. (Figura 2 y 3).

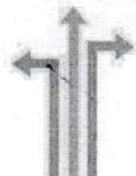


Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar gen *vanA* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).

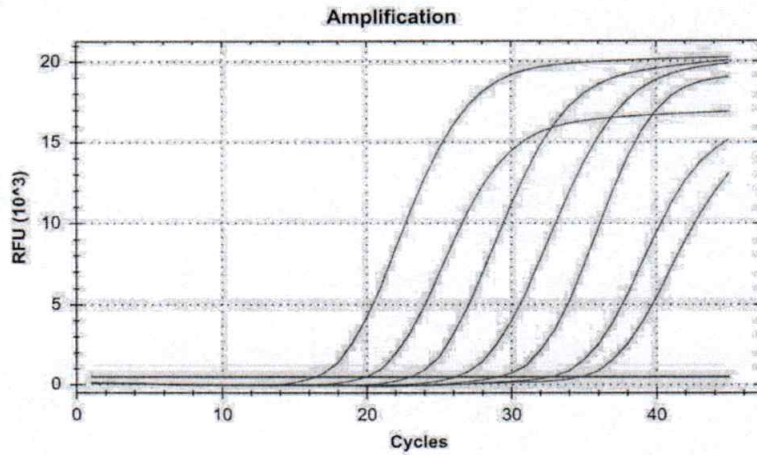
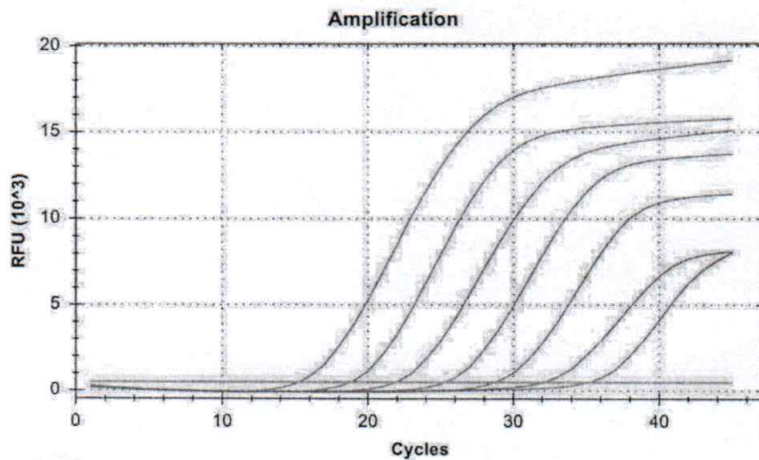


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar gen *vanB* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de resistencia a vancomicina fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.



Prueba de reacción cruzada			
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315 resistente a la metilicina	-	<i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ST398 resistente a la metilicina	-	Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> mecC resistente a la metilicina	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rDNA A2146G)	-
Aislado cMRSA (oxa ^R , PVL-positive, spa:t 310)	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rDNA A2147G)	-
Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48	-	<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	+/-
Aislado <i>Klebsiella pneumonia</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48	-	<i>Enterococcus faecium</i> cepa LMG16165 tipo VanA	+/-
Aislado <i>Klebsiella pneumonia</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) y KPC-2	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1 tipo VanA	+/-
<i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2 tipo VanB	-/+
<i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	+/-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-	<i>E. faecalis</i> (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz tipo VanB	-/+
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142 tipos VanC y VanB	-/+
<i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Snéath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC	-

Tabla 6. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit para *vanA* se evaluó frente a las cepas de *Enterococcus faecium* LMG16165, *Enterococcus faecium* IOWA 1, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus avium*, mostrando resultados positivos.

La reactividad de VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit para *vanB* se evaluó frente a cepas de *Enterococcus faecalis* (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz, *Enterococcus faecium* IOWA 2 y *Enterococcus gallinarum* ENT20120142, mostrando resultados positivos.







13. Bibliography/Bibliografía

1. B. Mirzaei et al. Detection of both *vanA* & *vanB* genes in *vanA* phenotypes of *Enterococci* by Taq Man RT-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology* 2015; 46, 1, 161-165.
2. J C.G. Marshall et al. D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; Vol. 94, pp. 6480-6483.
3. G. Werner et al. Comparison of direct cultivation on a selective solid medium, polymerase chain reaction from an enrichment broth, and the BD GeneOhm™ VanR Assay for identification of vancomycin-resistant enterococci in screening specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; Volume 70, Issue 4, Pages 512-521.



4. Centers for Disease Control and Prevention. VRE in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/HAI/organisms/vre/vre.html>
5. T.Nomura *et al.* New colony multiplex PCR assays for the detection and discrimination of vancomycin-resistant enterococcal species. *Journal of Microbiological Methods* 2018; 69-72.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

<p>IVD</p> <p>In vitro diagnostic device</p> <p>Producto para diagnóstico <i>in vitro</i></p>		<p>Keep dry</p> <p>Almacenar en lugar seco</p>		<p>Use by</p> <p>Fecha de caducidad</p>		<p>Manufacturer</p> <p>Fabricante</p>	<p>LOT</p>	<p>Batch code</p> <p>Número de lote</p>
<p></p> <p>Consult instructions for use</p> <p>Consultar las instrucciones de uso</p>		<p>Temperature limitation</p> <p>Limitación de temperatura</p>		<p>Contains sufficient for <n> test</p> <p>Contiene <n> test</p>	<p>DIL</p>	<p>Sample diluent</p> <p>Diluyente de muestra</p>	<p>REF</p>	<p>Catalogue number</p> <p>Número de referencia</p>

Patricia del Carmen Etchevés
 BIOARS S.A.
 Presidenta

Claudia Etchevés
 BIOARS S.A.
 BIOCLAUDIA ETCHÉVÉS
 DIRECTOR TÉCNICO



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiATM™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiATM™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
 (2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.
 (3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.
 (4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.
 (5) No lectura en canal Cy5.
 (6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.

BIQARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidenta

BIQARS S.A.
 BIOO. CLAUDIA ETCHÉVÉS
 DIRECTOR TÉCNICO

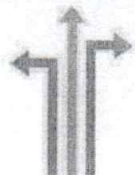
ANEXO 2

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 Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

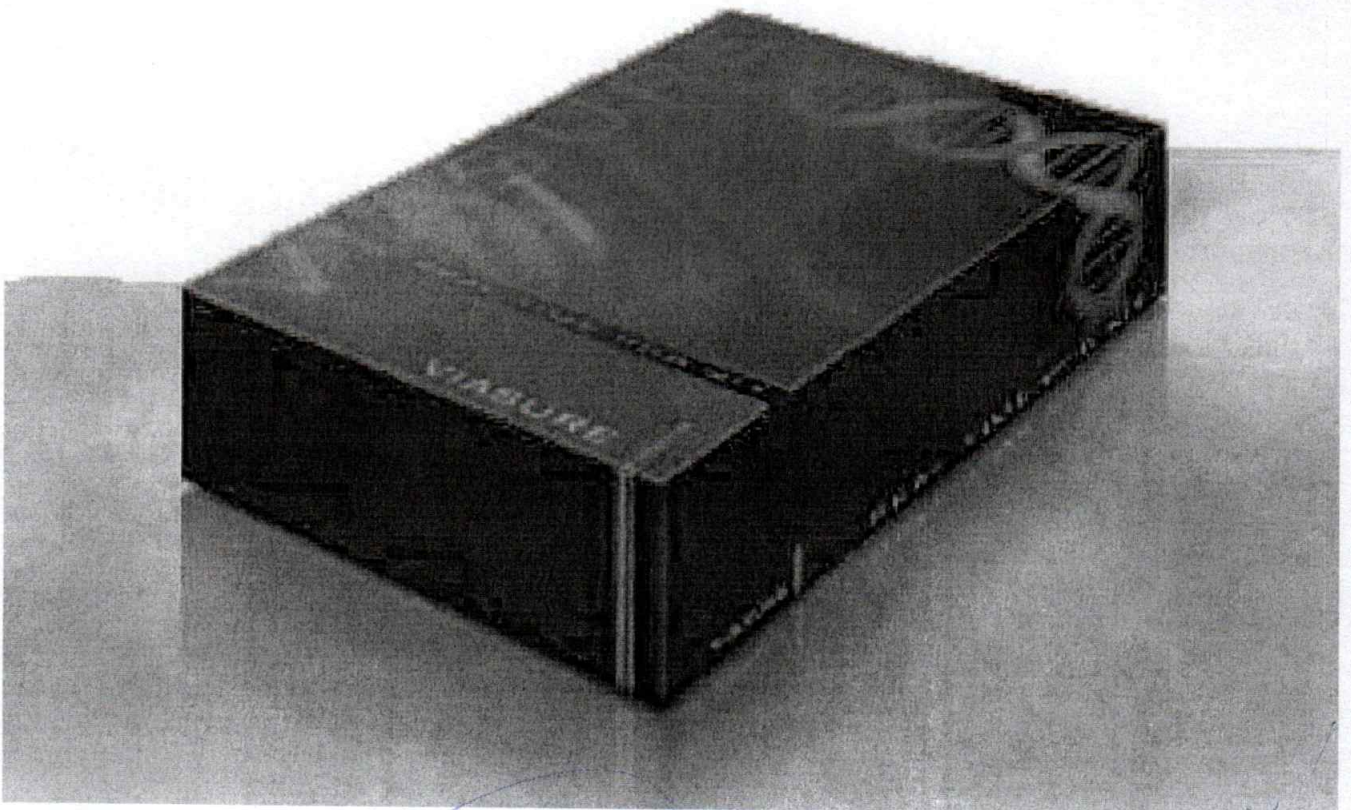
*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: June 2019





IU-VAN012enes0619 rev.01

[Handwritten signature]
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Echeverría
Presidenta



[Handwritten signature]
IUNTEC
INSTITUTO URuguayo de
NORMAS TÉCNICAS
INSPECTOR TÉCNICO



CerTest Biotec, S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.cerfest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC

Patricia del Carmen
Presidente

[Handwritten signature]

VIASURE

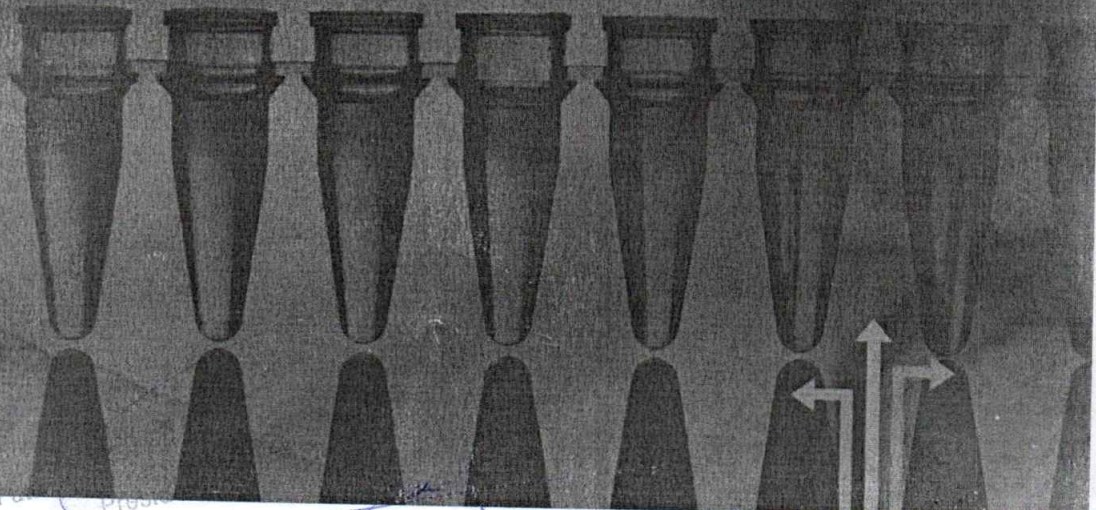
Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Vancomycin resistance

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-VAN106LE
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-VAN106HE
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-VAN112LE
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-VAN112HE
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-VAN113LE
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-VAN113HE
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-VAN136E
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-VAN172E



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a vancomicina (ERV) en muestras clínicas de pacientes con signos y síntomas de infección bacteriana. El uso previsto del test es facilitar la identificación de organismos resistentes a la vancomicina en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de muestras clínicas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar los genes *vanA* y *vanB*.

2. Introducción y explicación

Los enterococos son organismos comensales comunes que se encuentran en el tracto gastrointestinal y en los genitales femeninos. Recientemente se les reconoce como patógenos oportunistas que causan infecciones nosocomiales como infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel, infecciones respiratorias, endocarditis y sepsis en individuos inmunocomprometidos.

La vancomicina es un antibiótico glucopéptido que inhibe la síntesis de la pared celular y se usa para tratar infecciones graves por bacterianas gram-positivas. Los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) se describieron por primera vez en Inglaterra y Francia en 1986, habiéndose extendido en la actualidad a través de los hospitales de todo el mundo.

La resistencia a la vancomicina es un proceso complejo y necesita la presencia de diferentes clusters de genes. Principalmente, se pueden dividir en dos tipos dependiendo atendiendo a los precursores pentapéptidos producidos por genes de resistencia a la vancomicina; el precursor que termina en D-Alanina-D-Serina (VanC-, VanE-, VanG-, VanL- y VanN-type) o el que termina en D-Alanine-D-Lactate (VanA-, VanB-, VanD- y VanM- tipo). Estos precursores pentapéptidos muestran una baja afinidad por los glucopéptidos, confiriendo así la resistencia a la vancomicina en los enterococos.

El primer tipo de resistencia a la vancomicina en los enterococos se considera resistencia intrínseca (ej. asociada con el gen *vanC*). Aislados de *Enterococcus gallinarum* y *E. casseliflavus* / *E. flavescens* muestran esta resistencia inherente a la vancomicina de bajo nivel. Mientras que, el segundo tipo es la resistencia adquirida (ej. relacionada con los genes *vanA* o *vanB*). En este caso, los enterococos pueden volverse resistentes mediante la adquisición de elementos genéticos móviles (transposones y plásmidos) de otra especie de *Enterococcus* u organismo. Más comúnmente, esta resistencia se observa en *E. faecium* y *E. faecalis*, pero también se ha reconocido en *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* y otras especies de enterococos. Los genes *vanA* y *vanB* son responsables de una resistencia a la vancomicina alta o moderada.

La transmisión de enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) puede ocurrir por contacto directo con fluidos corporales de pacientes colonizados o infectados (sangre, drenaje de heridas, orina, heces, esputo y otros) o por contacto indirecto a través de las manos de los trabajadores de la salud, o a través de equipos de cuidado de pacientes o superficies ambientales contaminadas.

Inicialmente, el método de detección más comúnmente aplicado se basó en técnicas de cultivo, que conllevan mucho tiempo y generalmente toman de uno a cinco días para completarse. Para acortar el tiempo de detección y mejorar la sensibilidad, los ensayos de PCR en Tiempo Real han demostrado ser una herramienta para la detección de genes clínicamente relevantes asociados con la resistencia a la vancomicina.

3. Procedimiento

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección y diferenciación de los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) en muestras clínicas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de la resistencia a vancomicina se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes *vanA* y *vanB*.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede adicionarse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa. Tras la amplificación, el gen *vanA* se detecta en el canal FAM, el gen *vanB* se detecta en el canal ROX y el control de extracción (CE) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1, 2 y 3. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 3 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.



Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Vancomycin resistance 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Vancomycin resistance Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-VAN106LE, VS-VAN106HE, VS-VAN112LE y VS-VAN112HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Vancomycin resistance 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Vancomycin resistance Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-VAN113LE y VS-VAN113HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Vancomycin resistance 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Vancomycin resistance Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	9/18 tiras de 4 tapones

Tabla 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-VAN136E y VS-VAN172E. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).



BIORANG S.A.
DIRECTOR TÉCNICO

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

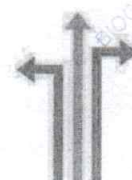
Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.



- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-VAN113LE, VS-VAN113HE, VS-VAN136E y VS-VAN172E). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para referencias VS-VAN136E y VS-VAN172E (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

8.1. Control de extracción liofilizado

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



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

8.2. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Si el Control de Extracción se utiliza para monitorizar el proceso de aislamiento de los ácidos nucleicos y como control de la posible inhibición de la PCR, añadir 5 µL del CE a la muestra o a la mezcla del tampón de lisis-muestra. (muestras clínicas, control positivo y/o negativo). Cerrar cada uno de los tubos y mezclar con la ayuda del vórtex durante 10 segundos.

Si el Control de Extracción se emplea sólo como control de inhibición de la PCR, añadir 1 µL de CE a la mezcla de reacción reconstituida.

Para la extracción de DNA a partir de muestras clínicas puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).

8.3. Control positivo liofilizado

El vial de *Vancomycin resistance* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Vancomycin resistance* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.4. Protocolo PCR

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

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

Añadir 15 µL del Rehydration Buffer (vial azul) en cada pocillo.



2) Añadir muestras y controles.

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

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

Añadir 5 µL de *Vancomycin resistance* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

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

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

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

Tabla 4. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (gen *vanA*), ROX (gen *vanB*) y HEX, JOE o VIC (Control Extracción). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005PTM Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Vancomycin resistance*. Comprobar la emisión de la señal del Control de Extracción (CE) para verificar el proceso de extracción y el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:



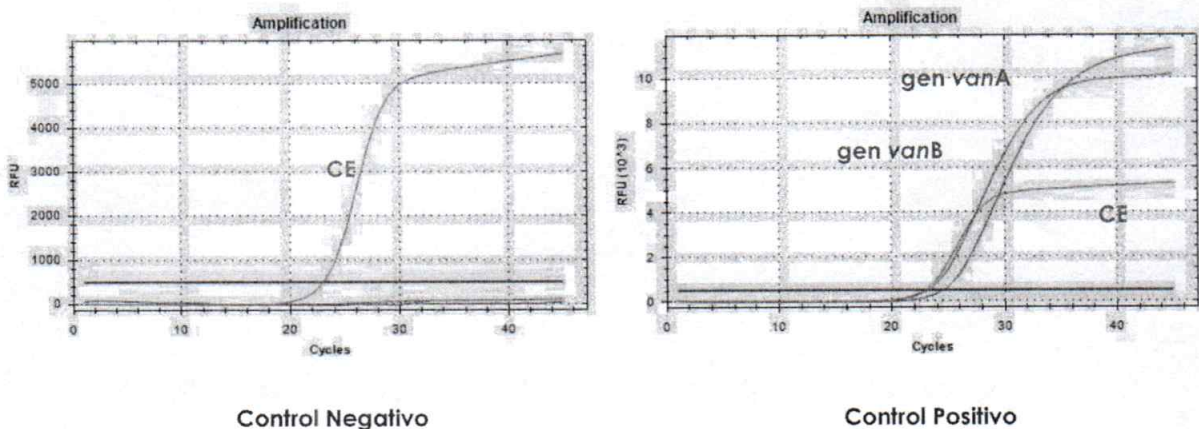
gen vanA (FAM)	gen vanB (ROX)	Control Extracción (HEX)	Control negativo	Control positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	gen vanA y gen vanB Positivos
-	-	+	-	+	gen vanA y gen vanB Negativos
+	-	+/-	-	+	gen vanA Positivo y gen vanB Negativo
-	+	+/-	-	+	gen vanA Negativo y gen vanB Positivo
-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	Inválido

Tabla 5. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el Control de Extracción muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del Control de Extracción no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el Control de Extracción si la presenta. Un fallo en el proceso de extracción y la inhibición de la reacción de PCR pueden ser excluidas por la amplificación del Control de Extracción.

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



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de ambos, el Control de Extracción y de la muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas durante la purificación de los ácidos nucleicos y/o de inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

En los controles de extracción se pueden observar diferencias en los valores de Ct entre las muestras control (control negativo y control positivo) y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

Para muestras en el límite de detección (LOD) o muestras negativas con un valor de Ct para el control de extracción ≥ 35 , se recomienda filtrar la muestra, o diluir el extraído (1:10 and 1:100) para evitar las posibles interferencias e inhibidores en la reacción de amplificación. Conviene revisar las instrucciones de uso del proceso de extracción empleado por el usuario.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras fecales humanas y especímenes aislados de enterococos de origen humano.
- 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. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Vancomycin resistance* Positive Control ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *Vancomycin resistance* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el Agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos de debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.

11. Control de calidad

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control de extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.



12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit se evaluó mediante 3 paneles EQA diferentes (QCMD 2017 Vancomycin Resistant Enterococci EQA Pilot Study e INSTAND Bacterial Genome Detection - VRE (Vancomycin Resistant Enterococci)). Estos paneles constan de 20 muestras clínicas disueltas en medio de transporte. Los resultados obtenidos se compararon con los informes finales de los programas. Estas muestras incluyen 6 aislados positivos para el gen *vanA* los cuales contienen *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. avium* y 7 muestras positivas para el gen *vanB* las cuales contienen aislados de *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. gallinarum*. Además, las especies *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, las cuales no albergan los genes *vanA* y *vanB*, se confirmaron como negativos.

Además, se probó el ensayo VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit utilizando 23 aislados de enterococos procedentes de pacientes sintomáticos. 21 de las muestras fueron positivas para el gen *vanA* y 1 muestra positiva para el gen *vanB*. Estos resultados se confirmaron con los obtenidos con la técnica de diagnóstico de rutina

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar los genes *vanA* y *vanB* utilizando VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para los genes *vanA* y *vanB*. (Figura 2 y 3).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar gen *vanA* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).

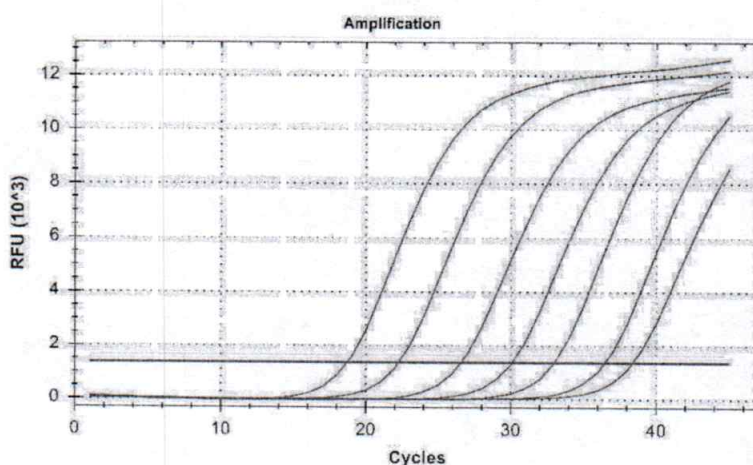
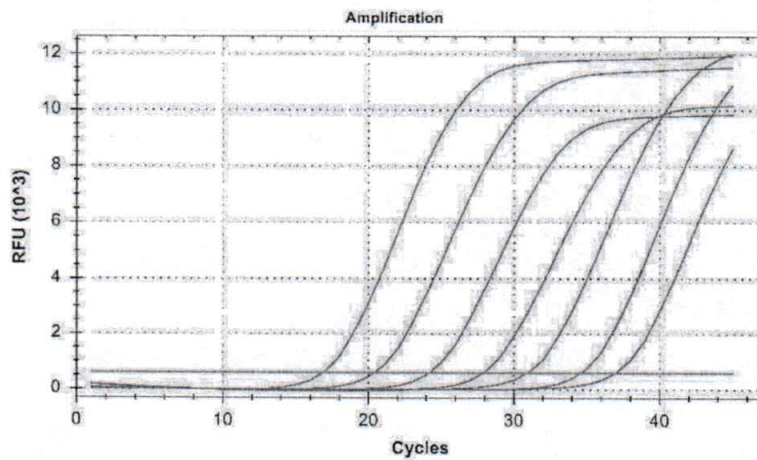


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar gen *vanB* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).

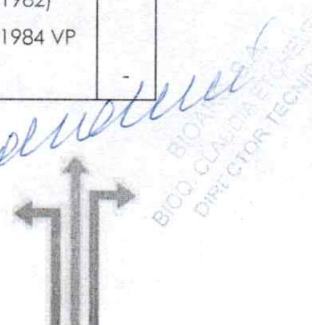


12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de resistencia a vancomicina fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Prueba de reacción cruzada			
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315 resistente a la meticilina	-	<i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ST398 resistente a la meticilina	-	Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> mecC resistente a la meticilina	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rDNA A2146G)	-
Aislado cMRSA (<i>oxa^P</i> , PVL-positive, <i>spa:t</i> 310)	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rDNA A2147G)	-
Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48	-	<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	+/-
Aislado <i>Klebsiella pneumonia</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48	-	<i>Enterococcus faecium</i> cepa LMG16165 tipo VanA	+/-
Aislado <i>Klebsiella pneumonia</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) y KPC-2	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1 tipo VanA	+/-
<i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2 tipo VanB	-/+
<i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	+/-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-	<i>E. faecalis</i> (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz tipo VanB	-/+
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142 tipos VanC y VanB	-/+
<i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC	-

Tabla 6. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.



12.4. Reactividad analítica











La reactividad de VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit para vanA se evaluó frente a las cepas de *Enterococcus faecium* LMG16165, *Enterococcus faecium* IOWA 1, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus avium*, mostrando resultados positivos.

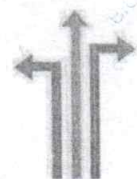
La reactividad de VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit para vanB se evaluó frente a cepas de *Enterococcus faecalis* (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz, *Enterococcus faecium* IOWA 2 y *Enterococcus gallinarum* ENT20120142, mostrando resultados positivos.

13. Bibliography/Bibliografía

1. B. Mirzaei *et al.* Detection of both vanA & vanB genes in vanA phenotypes of *Enterococci* by Taq Man RT-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology* 2015; 46, 1, 161-165.
2. J C.G. Marshall *et al.* D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; Vol. 94, pp. 6480-6483.
3. G. Werner *et al.* Comparison of direct cultivation on a selective solid medium, polymerase chain reaction from an enrichment broth, and the BD GeneOhm™ VanR Assay for identification of vancomycin-resistant enterococci in screening specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; Volume 70, Issue 4, Pages 512-521.
4. Centers for Disease Control and Prevention. VRE in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/HAI/organisms/vre/vre.html>
5. T.Nomura *et al.* New colony multiplex PCR assays for the detection and discrimination of vancomycin-resistant enterococcal species. *Journal of Microbiological Methods* 2018; 69-72.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

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



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

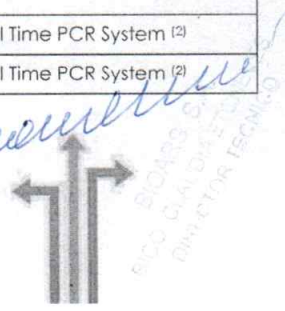
Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Optical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

- (1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.
- (3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.
- (4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.
- (5) No lectura en canal Cy5.
- (6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.



ANEXO 2

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 Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquaring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

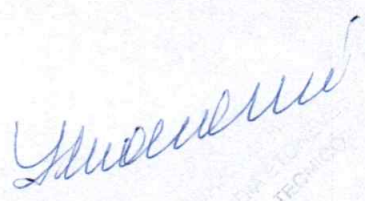
CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.

- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.


BIOARTE SPA
BIOQ. CLAUDIO ETCHES
DIRECTOR TÉCNICO

- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: February 2021

Yvan...
BIOAR S.A.
DIRECTOR TÉCNICO

Patricia del Carmen Etchevés
BIOAR S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidenta





CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC

Patricia B. President

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

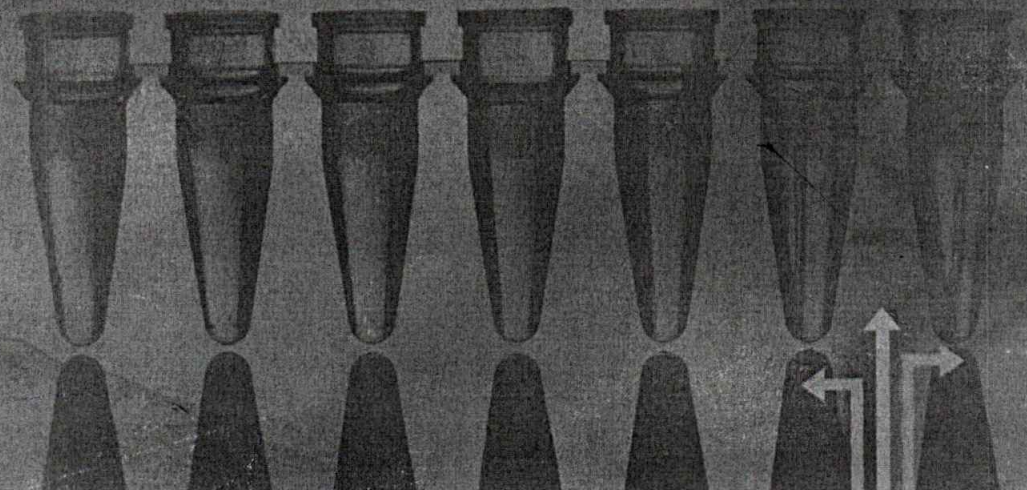
Vancomycin resistance

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

VS-VAN196T

Handbook



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a vancomicina (ERV) en muestras clínicas de pacientes con signos y síntomas de infección bacteriana. El uso previsto del test es facilitar la identificación de organismos resistentes a la vancomicina en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de muestras clínicas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar los genes *vanA* y *vanB*.

2. Introducción y explicación

Los enterococos son organismos comensales comunes que se encuentran en el tracto gastrointestinal y en los genitales femeninos. Recientemente se les reconoce como patógenos oportunistas que causan infecciones nosocomiales como infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel, infecciones respiratorias, endocarditis y sepsis en individuos inmunocomprometidos.

La vancomicina es un antibiótico glucopéptido que inhibe la síntesis de la pared celular y se usa para tratar infecciones graves por bacterianas gram-positivas. Los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) se describieron por primera vez en Inglaterra y Francia en 1986, habiéndose extendido en la actualidad a través de los hospitales de todo el mundo.

La resistencia a la vancomicina es un proceso complejo y necesita la presencia de diferentes clusters de genes. Principalmente, se pueden dividir en dos tipos dependiendo atendiendo a los precursores pentapéptidos producidos por genes de resistencia a la vancomicina; el precursor que termina en D-Alanina-D-Serina (VanC-, VanE-, VanG-, VanL- y VanN-type) o el que termina en D-Alanine-D-Lactate (VanA-, VanB-, VanD- y VanM- tipo). Estos precursores pentapéptidos muestran una baja afinidad por los glucopéptidos, confiriendo así la resistencia a la vancomicina en los enterococos.

El primer tipo de resistencia a la vancomicina en los enterococos se considera resistencia intrínseca (ej. asociada con el gen *vanC*). Aislados de *Enterococcus gallinarum* y *E. casseliflavus* / *E. flavescens* muestran esta resistencia inherente a la vancomicina de bajo nivel. Mientras que, el segundo tipo es la resistencia adquirida (ej. relacionada con los genes *vanA* o *vanB*). En este caso, los enterococos pueden volverse resistentes mediante la adquisición de elementos genéticos móviles (transposones y plásmidos) de otra especie de *Enterococcus* u organismo. Más comúnmente, esta resistencia se observa en *E. faecium* y *E. faecalis*, pero también se ha reconocido en *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* y otras especies de enterococos. Los genes *vanA* y *vanB* son responsables de una resistencia a la vancomicina alta o moderada.

La transmisión de enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) puede ocurrir por contacto directo con fluidos corporales de pacientes colonizados o infectados (sangre, drenaje de heridas, orina, heces, esputo y otros) o por contacto indirecto a través de las manos de los trabajadores de la salud, o a través de equipos de cuidado de pacientes o superficies ambientales contaminadas.



Inicialmente, el método de detección más comúnmente aplicado se basó en técnicas de cultivo, que conllevan mucho tiempo y generalmente toman de uno a cinco días para completarse. Para acortar el tiempo de detección y mejorar la sensibilidad, los ensayos de PCR en Tiempo Real han demostrado ser una herramienta para la detección de genes clínicamente relevantes asociados con la resistencia a la vancomicina.

3. Procedimiento

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección y diferenciación de los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) en muestras clínicas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de la resistencia a vancomicina se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes *vanA* y *vanB*.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

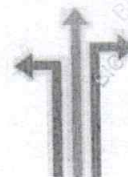
VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la amplificación, el gen *vanA* se detecta en el canal FAM, el gen *vanB* se detecta en el canal ROX y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Vancomycin resistance</i> Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	4 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Vancomycin resistance</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-VAN196T.



5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo tubos individuales, tiras de tubos y/o placas).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar los kits de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, excepto el tubo de Reaction-Mix rehidratado. Una vez el vial *Vancomycin resistance* ha sido reconstituido puede mantenerse a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).
- El vial con la mezcla de reacción rehidratada que no se utilice, se debe cerrar y almacenar en el interior del pouch con el material desecante para protegerlo de la luz y la humedad.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.



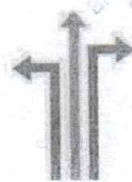
7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.



Para la extracción de DNA a partir de muestras clínicas puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Vancomycin resistance* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Vancomycin resistance* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

8.4. Protocolo PCR

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

Añadir 15 µL de *Vancomycin resistance* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra de *Vancomycin resistance* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los tubos con los tapones o sellar la placa. Centrifugar brevemente.



Manuel...
DGO CLAUDIA ESCOBAR
DIRECTOR TÉCNICO

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

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

Tabla 2. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (gen *vanA*), ROX (gen *vanB*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Vancomycin resistance*. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

gen <i>vanA</i> (FAM)	gen <i>vanB</i> (ROX)	Control interno (HEX)	Control negativo	Control positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	gen <i>vanA</i> y gen <i>vanB</i> Positivos
-	-	+	-	+	gen <i>vanA</i> y gen <i>vanB</i> Negativos
+	-	+/-	-	+	gen <i>vanA</i> Positivo y gen <i>vanB</i> Negativo
-	+	+/-	-	+	gen <i>vanA</i> Negativo y gen <i>vanB</i> Positivo
-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	Inválido

Tabla 3. Interpretación

+: curva de amplificación

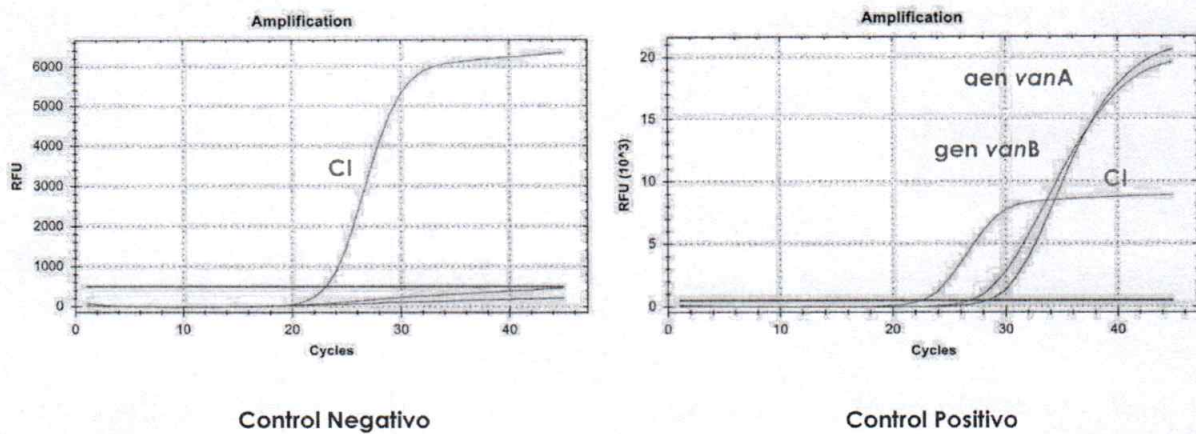
-: sin curva de amplificación



Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

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



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras fecales humanas y especímenes aislados de enterococos de origen humano.
- 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. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.

- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Vancomycin resistance* Positive Control ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit se evaluó mediante 3 paneles EQA diferentes (QCMD 2017 *Vancomycin Resistant Enterococci* EQA Pilot Study e INSTAND Bacterial Genome Detection - VRE (*Vancomycin Resistant Enterococci*)). Estos paneles constan de 20 muestras clínicas disueltas en medio de transporte. Los resultados obtenidos se compararon con los informes finales de los programas. Estas muestras incluyen 6 aislados positivos para el gen *vanA* los cuales contienen *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. avium* y 7 muestras positivas para el gen *vanB* las cuales contienen aislados de *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. gallinarum*. Además, las especies *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, las cuales no albergan los genes *vanA* y *vanB*, se confirmaron como negativos.

Además, se probó el ensayo VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit utilizando 23 aislados de enterococos procedentes de pacientes sintomáticos. 21 de las muestras fueron positivas para el gen *vanA* y 1 muestra positiva para el gen *vanB*. Estos resultados se confirmaron con los obtenidos con la técnica de diagnóstico de rutina

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar los genes *vanA* y *vanB* utilizando VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para los genes *vanA* y *vanB*. (Figura 2 y 3).



Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar gen vanA (10⁷-10¹ copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).

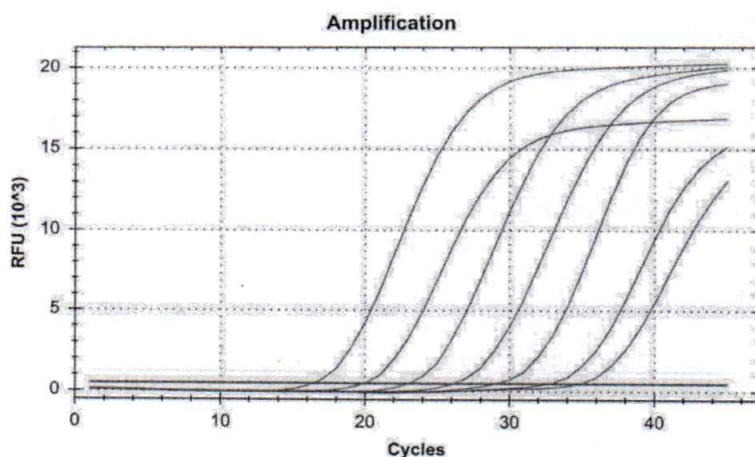
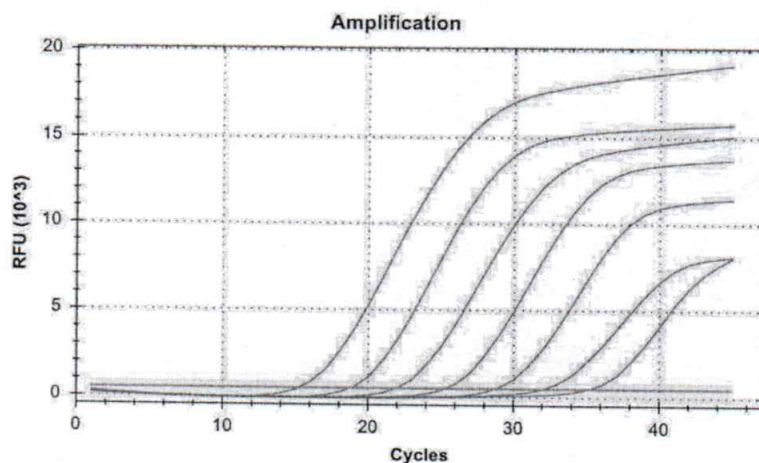


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar gen vanB (10⁷-10¹ copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de resistencia a vancomicina fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

[Handwritten Signature]
 BIOAKS
 BIOG. CLAUDIA ESTEBAN
 DIRECTOR TÉCNICO



Prueba de reacción cruzada			
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315 resistente a la meticilina	-	<i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ST398 resistente a la meticilina	-	Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> mecC resistente a la meticilina	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rDNA A2146G)	-
Aislado cMRSA (oxaP, PVL-positive, spa:t 310)	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rDNA A2147G)	-
Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48	-	<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	+/-
Aislado <i>Klebsiella pneumonia</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48	-	<i>Enterococcus faecium</i> cepa LMG16165 tipo VanA	+/-
Aislado <i>Klebsiella pneumonia</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) y KPC-2	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1 tipo VanA	+/-
<i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2 tipo VanB	-/+
<i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	+/-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-	<i>E. faecalis</i> (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz tipo VanB	-/+
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142 tipos VanC y VanB	-/+
<i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC	-

Tabla 4. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit para *vanA* se evaluó frente a las cepas de *Enterococcus faecium* LMG16165, *Enterococcus faecium* IOWA 1, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus avium*, mostrando resultados positivos.










La reactividad de VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit para *vanB* se evaluó frente a cepas de *Enterococcus faecalis* (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz, *Enterococcus faecium* IOWA 2 y *Enterococcus gallinarum* ENT20120142, mostrando resultados positivos.

13. Bibliography/Bibliografía

1. B. Mirzaei et al. Detection of both *vanA* & *vanB* genes in *vanA* phenotypes of *Enterococci* by Taq Man RT-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology* 2015; 46, 1, 161-165.
2. J C.G. Marshall et al. D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; Vol. 94, pp. 6480-6483.
3. G. Werner et al. Comparison of direct cultivation on a selective solid medium, polymerase chain reaction from an enrichment broth, and the BD GeneOhm™ VanR Assay for identification of vancomycin-resistant enterococci in screening specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; Volume 70, Issue 4, Pages 512-521.

4. Centers for Disease Control and Prevention. VRE in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/HAI/organisms/vre/vre.html>
5. T.Nomura *et al.* New colony multiplex PCR assays for the detection and discrimination of vancomycin-resistant enterococcal species. *Journal of Microbiological Methods* 2018; 69-72.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

 <p>In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i></p>	 <p>Keep dry Almacenar en lugar seco</p>	 <p>Use by Fecha de caducidad</p>	 <p>Manufacturer Fabricante</p>	 <p>Batch code Número de lote.</p>
 <p>Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso</p>	 <p>Temperature limitation Limitación de temperatura</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test</p>	<p>DIL</p> <p>Sample diluent Diluyente de muestra</p>	 <p>Catalogue number Número de referencia</p>



[Handwritten signature]
CARMEN ETICHEVÉS
PRESIDENTE TÉCNICO

ANEXO 2

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 Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquaring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:


- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

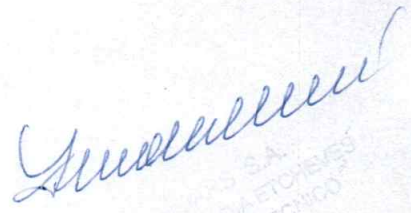
*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: February 2021


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
PATRICIA ETCHEVÉS
PRESIDENTE TÉCNICO





CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



CE



IVD

Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC

Dr. Carmen
Martín del Carmen
Presidente

[Handwritten signature]

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

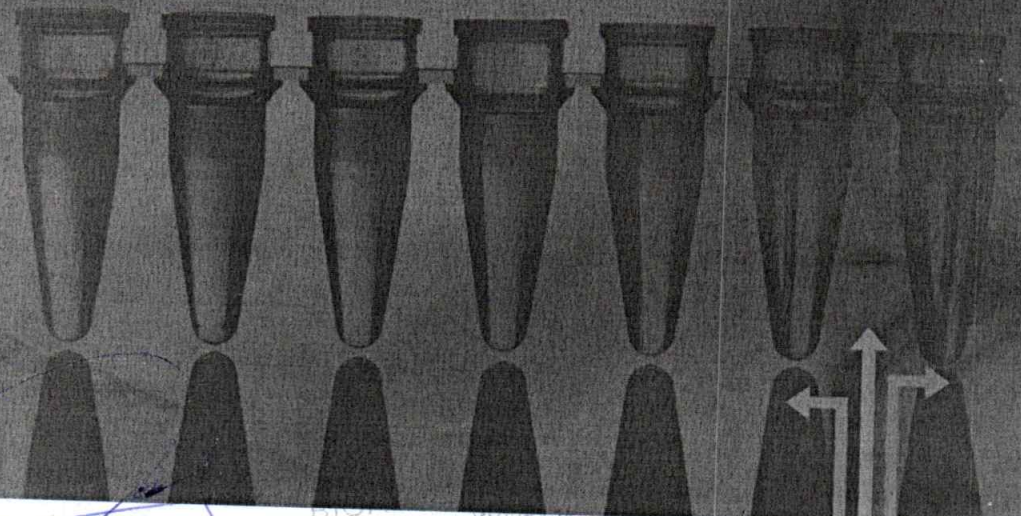
by **CerTest**
BIOTEC

Vancomycin resistance

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

VS-VAN196TE



Patricia del Carmen Etcheberry
Presidente

Handwritten signature

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a vancomicina (ERV) en muestras clínicas de pacientes con signos y síntomas de infección bacteriana. El uso previsto del test es facilitar la identificación de organismos resistentes a la vancomicina en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de muestras clínicas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar los genes *vanA* y *vanB*.

2. Introducción y explicación

Los enterococos son organismos comensales comunes que se encuentran en el tracto gastrointestinal y en los genitales femeninos. Recientemente se les reconoce como patógenos oportunistas que causan infecciones nosocomiales como infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel, infecciones respiratorias, endocarditis y sepsis en individuos inmunocomprometidos.

La vancomicina es un antibiótico glucopéptido que inhibe la síntesis de la pared celular y se usa para tratar infecciones graves por bacterianas gram-positivas. Los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) se describieron por primera vez en Inglaterra y Francia en 1986, habiéndose extendido en la actualidad a través de los hospitales de todo el mundo.

La resistencia a la vancomicina es un proceso complejo y necesita la presencia de diferentes clusters de genes. Principalmente, se pueden dividir en dos tipos dependiendo de los precursores pentapéptidos producidos por genes de resistencia a la vancomicina; el precursor que termina en D-Alanina-D-Serina (VanC-, VanE-, VanG-, VanL- y VanN-type) o el que termina en D-Alanine-D-Lactate (VanA-, VanB-, VanD- y VanM- tipo). Estos precursores pentapéptidos muestran una baja afinidad por los glucopéptidos, confiriendo así la resistencia a la vancomicina en los enterococos.

El primer tipo de resistencia a la vancomicina en los enterococos se considera resistencia intrínseca (ej. asociada con el gen *vanC*). Aislados de *Enterococcus gallinarum* y *E. casseliflavus* / *E. flavescens* muestran esta resistencia inherente a la vancomicina de bajo nivel. Mientras que, el segundo tipo es la resistencia adquirida (ej. relacionada con los genes *vanA* o *vanB*). En este caso, los enterococos pueden volverse resistentes mediante la adquisición de elementos genéticos móviles (transposones y plásmidos) de otra especie de *Enterococcus* u organismo. Más comúnmente, esta resistencia se observa en *E. faecium* y *E. faecalis*, pero también se ha reconocido en *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* y otras especies de enterococos. Los genes *vanA* y *vanB* son responsables de una resistencia a la vancomicina alta o moderada.

La transmisión de enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) puede ocurrir por contacto directo con fluidos corporales de pacientes colonizados o infectados (sangre, drenaje de heridas, orina, heces, esputo y otros) o por contacto indirecto a través de las manos de los trabajadores de la salud, o a través de equipos de cuidado de pacientes o superficies ambientales contaminadas.



Inicialmente, el método de detección más comúnmente aplicado se basó en técnicas de cultivo, que conllevan mucho tiempo y generalmente toman de uno a cinco días para completarse. Para acortar el tiempo de detección y mejorar la sensibilidad, los ensayos de PCR en Tiempo Real han demostrado ser una herramienta para la detección de genes clínicamente relevantes asociados con la resistencia a la vancomicina.

3. Procedimiento

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección y diferenciación de los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) en muestras clínicas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de la resistencia a vancomicina se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes *vanA* y *vanB*.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede adicionarse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa. Tras la amplificación, el gen *vanA* se detecta en el canal FAM, el gen *vanB* se detecta en el canal ROX y el control de extracción (CE) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Vancomycin resistance</i> Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	4 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Vancomycin resistance</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-VAN196T.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

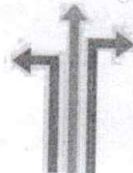
- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo tubos individuales, tiras de tubos y/o placas).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL. y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 μ L, 20-200 μ L).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar los kits de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, excepto el tubo de Reaction-Mix rehidratado. Una vez el vial *Vancomycin resistance* ha sido reconstituido puede mantenerse a 25°C \pm 5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).
- El vial con la mezcla de reacción rehidratada que no se utilice, se debe cerrar y almacenar en el interior del pouch con el material desecante para protegerlo de la luz y la humedad.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.



7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

8.1. Control de extracción liofilizado

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



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

8.2. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Si el Control de Extracción se utiliza para monitorizar el proceso de aislamiento de los ácidos nucleicos y como control de la posible inhibición de la PCR, añadir 5µL del CE a la muestra o a la mezcla del tampón de lisis-muestra. (muestras clínicas, control positivo y/o negativo). Cerrar cada uno de los tubos y mezclar con la ayuda del vórtex durante 10 segundos.

Si el Control de Extracción se emplea sólo como control de inhibición de la PCR, añadir 1 µl de CE a la mezcla de reacción reconstituida.

Para la extracción de DNA a partir de muestras clínicas puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).

8.3. Control positivo liofilizado

El vial de *Vancomycin resistance* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Vancomycin resistance* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.4. Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.



Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

8.5. Protocolo PCR

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

Añadir 15 µL de *Vancomycin resistance* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

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

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *Vancomycin resistance* Positive Control reconstituido (vial rojo) en los pocillos reservados para el control positivo.

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

Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

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

Tabla 2. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (gen *vanA*), ROX (gen *vanB*) y HEX, JOE o VIC (Control de extracción (CE)). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005PTM Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.



9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Vancomycin resistance*. Comprobar la emisión de la señal del Control de Extracción (CE) para verificar el proceso de extracción y el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

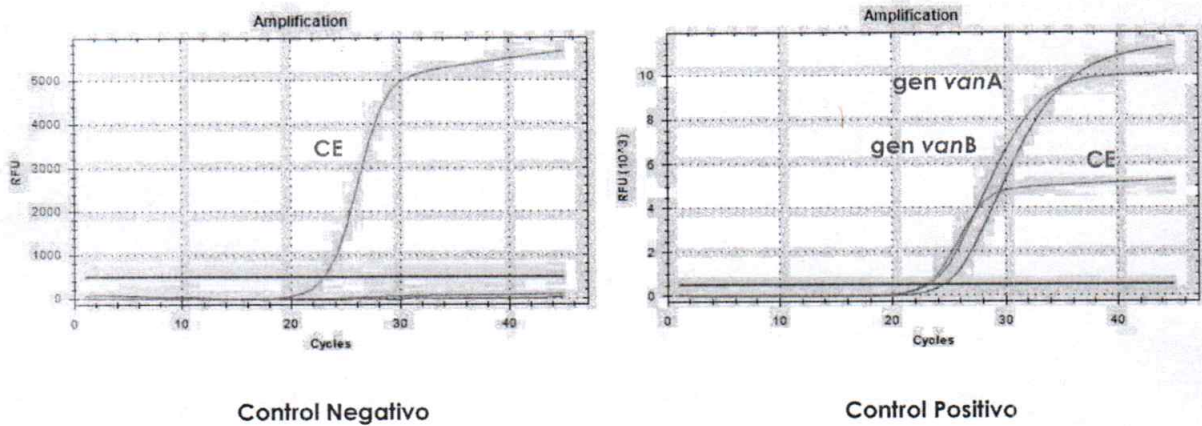
gen <i>vanA</i> (FAM)	gen <i>vanB</i> (ROX)	Control Extracción (HEX)	Control negativo	Control positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	gen <i>vanA</i> y gen <i>vanB</i> Positivos
-	-	+	-	+	gen <i>vanA</i> y gen <i>vanB</i> Negativos
+	-	+/-	-	+	gen <i>vanA</i> Positivo y gen <i>vanB</i> Negativo
-	+	+/-	-	+	gen <i>vanA</i> Negativo y gen <i>vanB</i> Positivo
-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	Inválido

Tabla 3. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el Control de Extracción muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del Control de Extracción no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el Control de Extracción si la presenta. Un fallo en el proceso de extracción y la inhibición de la reacción de PCR pueden ser excluidas por la amplificación del Control de Extracción.

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



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de ambos, el Control de Extracción y de la muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas durante la purificación de los ácidos nucleicos de y/o inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

En los controles de extracción se pueden observar diferencias en los valores de Ct entre las muestras control (control negativo y control positivo) y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

Para muestras en el límite de detección (LOD) o muestras negativas con un valor de Ct para el control de extracción ≥ 35 , se recomienda filtrar la muestra, o diluir el extraído (1:10 and 1:100) para evitar las posibles interferencias e inhibidores en la reacción de amplificación. Conviene revisar las instrucciones de uso del proceso de extracción empleado por el usuario.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras fecales humanas y especímenes aislados de enterococos de origen humano.
- 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. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.

- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Vancomycin resistance* Positive Control ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *Vancomycin resistance* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el Agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.

11. Control de calidad

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control de extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit se evaluó mediante 3 paneles EQA diferentes (QCMD 2017 *Vancomycin Resistant Enterococci* EQA Pilot Study e INSTAND Bacterial Genome Detection - VRE (*Vancomycin Resistant Enterococci*)). Estos paneles constan de 20 muestras clínicas disueltas en medio de transporte. Los resultados obtenidos se compararon con los informes finales de los programas. Estas muestras incluyen 6 aislados positivos para el gen *vanA* los cuales contienen *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. avium* y 7 muestras positivas para el gen *vanB* las cuales contienen aislados de *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. gallinarum*. Además, las especies *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, las cuales no albergan los genes *vanA* y *vanB*, se confirmaron como negativos.

Además, se probó el ensayo VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit utilizando 23 aislados de enterococos procedentes de pacientes sintomáticos. 21 de las muestras fueron positivas para el gen *vanA* y 1 muestra positiva para el gen *vanB*. Estos resultados se confirmaron con los obtenidos con la técnica de diagnóstico de rutina

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar los genes *vanA* y *vanB* utilizando VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para los genes *vanA* y *vanB*. (Figura 2 y 3).

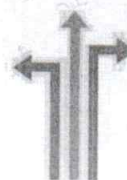


Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar gen *vanA* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).

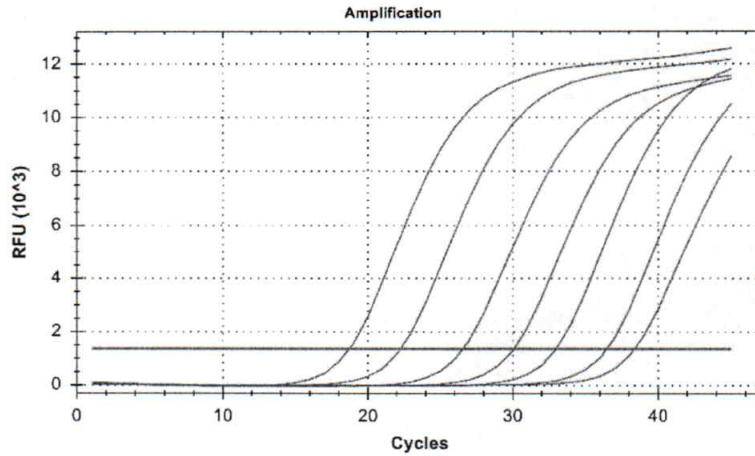
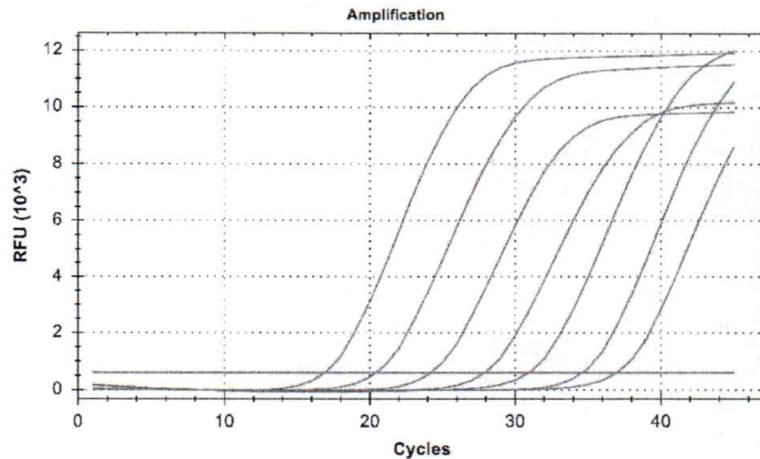


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar gen *vanB* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de resistencia a vancomicina fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.



Prueba de reacción cruzada			
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315 resistente a la meticilina	-	<i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ST398 resistente a la meticilina	-	Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> mecC resistente a la meticilina	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rDNA A2146G)	-
Aislado cMRSA (oxa ^P , PVL-positive, spa:t 310)	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rDNA A2147G)	-
Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48	-	<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	+/-
Aislado <i>Klebsiella pneumonia</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48	-	<i>Enterococcus faecium</i> cepa LMG16165 tipo VanA	+/-
Aislado <i>Klebsiella pneumonia</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) y KPC-2	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1 tipo VanA	+/-
<i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244	-	<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2 tipo VanB	-/+
<i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	+/-
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-	<i>E. faecalis</i> (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz tipo VanB	-/+
<i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142 tipos VanC y VanB	-/+
<i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC	-

Tabla 4. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit para vanA se evaluó frente a las cepas de *Enterococcus faecium* LMG16165, *Enterococcus faecium* IOWA 1, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus avium*, mostrando resultados positivos.











La reactividad de VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit para vanB se evaluó frente a cepas de *Enterococcus faecalis* (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz, *Enterococcus faecium* IOWA 2 y *Enterococcus gallinarum* ENT20120142, mostrando resultados positivos.



13. Bibliography/Bibliografía

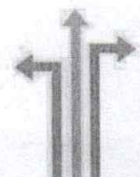
1. B. Mirzaei *et al.* Detection of both *vanA* & *vanB* genes in *vanA* phenotypes of *Enterococci* by Taq Man RT-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology* 2015; 46, 1, 161-165.
2. J C.G. Marshall *et al.* D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; Vol. 94, pp. 6480–6483.
3. G. Werner *et al.* Comparison of direct cultivation on a selective solid medium, polymerase chain reaction from an enrichment broth, and the BD GeneOhm™ VanR Assay for identification of vancomycin-resistant enterococci in screening specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; Volume 70, Issue 4, Pages 512–521.
4. Centers for Disease Control and Prevention. VRE in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/HAI/organisms/vre/vre.html>
5. T.Nomura *et al.* New colony multiplex PCR assays for the detection and discrimination of vancomycin-resistant enterococcal species. *Journal of Microbiological Methods* 2018; 69-72.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

 <p>In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i></p>	 <p>Keep dry Almacenar en lugar seco</p>	 <p>Use by Fecha de caducidad</p>	 <p>Manufacturer Fabricante</p>	 <p>Batch code Número de lote</p>
 <p>Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso</p>	 <p>Temperature limitation Limitación de temperatura</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test</p>	 <p>Sample diluent Diluyente de muestra</p>	 <p>Catalogue number Número de referencia</p>

Handwritten signature

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
 (2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.
 (3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.
 (4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.
 (5) No lectura en canal Cy5.
 (6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.

BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etcheve
 Presidente
 27

ANEXO 2

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 Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

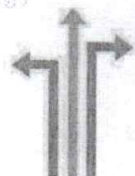
- DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: March 2021





CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J. Nº1
50840 · San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



CE



IVD

Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC

Handwritten signature

Patricia del Carmen
Presidente



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Hoja Adicional de Firmas
Informe gráfico

Número:

Referencia: Rótulos e Ifus EX-2022-16386269- -APN-DGA#ANMAT

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 310 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2022.07.13 15:04:40 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.07.13 15:04:52 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: EX-2022-16386269-APN-DGA#ANMAT

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN

PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

Nº EX-2022-16386269-APN-DGA#ANMAT

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que, de acuerdo con lo solicitado por la firma **BIOARS S.A.**, se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de los nuevos productos médicos para diagnóstico in vitro con los siguientes datos identificatorios característicos:

NOMBRE COMERCIAL: 1) **VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit.** 2) **VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit.** 3) **VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit.** 4) **VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit.**

INDICACION DE USO: 1) **VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit** esta diseñado para la identificación y diferenciación específica de *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina (CLR) en biopsias (tejido gástrico) procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección gastrointestinal. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *H. pylori* y la resistencia a Claritromicina en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos.

2) **VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit** es una prueba de PCR en tiempo real diseñada para la detección cualitativa y diferenciación simultánea de los principales genes que codifican las carbapenemasas (NDM, VIM, OXA, KPC y/o IMP) a partir de aislados bacterianos de muestras clínicas, y directamente de hisopos rectales procedentes de individuos con sospecha de infección por patógenos

resistentes a los carbapenemicos, por parte de su profesional de la salud (PS). El uso previsto de este test es facilitar el diagnostico de infeccion causada por enterobacterias resistentes a carbapenemicos en combinacion con factores de riesgo clinicos y epidemiologicos.

3) VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit: esta diseñado para la identificación y diferenciación específica de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA) y/o *Staphylococci* coagulasa negativa resistente a meticilina (MRCoNS) en colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianales humanos en medio solido cromogenico. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por MRSA en combinación con los signos y síntomas clínicos del paciente y los factores de riesgo epidemiológico. Exclusivamente para uso en diagnóstico de in vitro.

4) VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit esta diseñado para la identificación y diferenciación específica de los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a vancomicina (ERV) en muestras clínicas de pacientes con signos y síntomas de infección bacteriana. El uso previsto del test es facilitar la identificación de organismos resistentes a la vancomicina en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. Exclusivamente para uso en diagnóstico de in vitro.

FORMA DE PRESENTACIÓN:

1) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit. Los kits contienen reactivos suficientes para realizar 36, 48, 72 o 96 pruebas según el formato o el equipamiento a utilizar. Además, por cada una de las presentaciones se encuentra la versión con control interno (CI) o con control de extracción (CE). Son en total 18 formas de presentación diferentes.

Formas de presentación: CI) Con control interno y CE) Con control de extracción.

Para CI y CE):

- 1) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile
- 2) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile
- 3) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile
- 4) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile
- 5) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile
- 6) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile
- 7) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®
- 8) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®
- 9) VIASURE *H. pylori* + Clarithromycin resistance Real Time PCR Detection Kit (96 determinaciones)

Composición: Todos los productos contienen los mismos componentes, difiriendo solo el soporte de reacción que

contiene el reactivo de PCR; pudiendo ser tiras o placa de perfil bajo o alto dependiendo del termociclador (*1: Perfil bajo-Low profile-, 2: perfil alto-High profile-, 3: Rotor-Gene®) o tubos para alicuotar las reacciones en otro soporte.

Forma de Presentación	de Formato Final	Cantidad de reactivo	Número de determinaciones	de Formato Perfil*	del
1) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	48		
3) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	96	Bajo	
5) CI/CE	Placa de pocillos	1 placa de 96 pocillos	96		
2) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	48		
4) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	96	Alto	
6) CI/CE	Placa de pocillos	1 placa de 96 pocillos	96		
7) CI/CE	Tira de pocillos	9 tiras de 4 pocillos	36	Rotor-Gene®	
8) CI/CE	Tira de pocillos	18 tiras de 4 pocillos	72	Rotor-Gene®	
9) CI/CE	Viales (sin soporte)	4 viales para 24 determinaciones cada uno	96	-	

Composición de kits CI:

- *H. pylori* + *Clarithromycin resistance*: Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado.

Composición de kits CE:

- *H. pylori* + *Clarithromycin resistance*: Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado.

- **Extraction Control:** Acido nucleico liofilizado no infeccioso

1 vial

El formato de ***H. pylori* + Clarithromycin resistance** tanto para CI como para CE son:

1); 2); 3); 4) 8-well strips: 6 o 12 tiras de 8 pocillos según sean 48 o 96 determinaciones.

5); 6) 96-well plate: 1 placa

7); 8) 4-well strips: 9 o 18 tiras de 4 pocillos según sean 36 o 72 determinaciones

9) Reaction-Mix tube: 4 viales

Los kits CI y CE contienen, además:

-**Rehydration Buffer:** Solución para la reconstitución del producto estabilizado.

1) a 9) 1 vial x 1,8 mL

- ***H. pylori* + Clarithromycin resistance Positive Control:** DNA sintético liofilizado no infeccioso.

1) a 9) 1 vial

- **Negative control:** Control negativo

1) a 9) 1 vial x 1 mL

- **Water RNase/DNase free:** Agua libre de RNAsa/DNAsa

1) a 9) 1 vial x 1 mL

- **Tear-off 8-cap strips:**

1); 2) 6 tiras de 8 tapones

3); 4); 5); 6) 12 tiras de 8 tapones

- **4-cap strips:**

7) 9 tiras de 4 tapones

8) 18 tiras de 4 tapones

2) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit: Los kits contienen reactivos suficientes para realizar 8, 24, 36 o 48 pruebas según el formato o el equipamiento a utilizar. Además, por cada una de las presentaciones se encuentra la versión con control interno (CI) o con control de extracción (CE). Son en total 18 formas de presentación diferentes.

Formas de presentación: CI) Con control interno y CE) Con control de extracción.

Para CI y CE):

- 1) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile
- 2) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile
- 3) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile
- 4) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile
- 5) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile
- 6) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile
- 7) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®
- 8) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®
- 9) VIASURE Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions

Composición: Todos los productos contienen los mismos componentes, difiriendo solo el soporte de reacción que contiene el reactivo de PCR; pudiendo ser tiras de perfil bajo o alto dependiendo del termociclador (*Perfil 1: bajo-Low profile-, 2: perfil alto-High profile-, 3: Rotor-Gene®) o tubos para alicuotar las reacciones en otro soporte.

Forma de Presentación	de Formato Final	Cantidad de reactivo	Número de determinaciones	de Formato Perfil*	del
1) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	24	Bajo	

3) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	48	
5) CI/CE	Tira de pocillos	1 tira de 8 pocillos	8	
2) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	24	
4) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	48	Alto
6) CI/CE	Tira de pocillos	1 tira de 8 pocillos	8	
7) CI/CE	Tira de pocillos	9 tiras de 4 pocillos	36	Rotor-Gene®
8) CI/CE	Tira de pocillos	2 tiras de 4 pocillos	8	Rotor-Gene®
9) CI/CE	Viales (sin soporte)	4 viales para 24 determinaciones cada uno	48	-

*Dependiendo de las especificaciones del termociclador (1: Perfil bajo, 2: perfil alto, 3: Rotor-Gene®) (Ver Anexo Termocicladores)

Composición de kits CI:

- ***Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1:*** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado.

- ***Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2:*** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado.

Composición de kits CE:

- ***Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1:*** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado.

- ***Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2:*** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado.

- ***Extraction Control:*** Acido nucleico liofilizado no infeccioso

Cantidad: 1 vial

El formato de *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1 y 2 tanto* para CI como para CE son:

- *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 1*

5); 6); 1); 2), 3); 4): 8-well strips: 1, 3 o 6 tiras de 8 pocillos según sean 8, 24 o 48 determinaciones.

7); 8) 4-well strips: 2 o 9 tiras de 4 pocillos según sean 8 o 36 determinaciones.

9) Reaction-Mix tube: 2 viales

- *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae 2*

5); 6); 1); 2), 3); 4): 8-well strips: 1, 3 o 6 tiras de 8 pocillos según sean 8, 24 o 48 determinaciones.

7); 8) 4-well strips: 2 o 9 tiras de 4 pocillos según sean 8 o 36 determinaciones.

9) Reaction-Mix tube: 2 viales

Los kits CI y CE contienen, además:

- *Rehydration Buffer*: Solución para la reconstitución del producto estabilizado.

1) a 9): 1 vial x 1,8 mL

- *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Positive Control*: DNA sintético liofilizado no infeccioso.

1) a 9): 1 vial

- *Negative control*: Control negativo

1) a 9): 1 vial x 1 mL

- *Water RNase/DNase free*: Agua libre de RNAsa/DNAsa

1) a 9): 1 vial x 1 mL

- *Tear-off 8-cap strips*:

1); 2): 6 tiras de 8 tapones

3); 4): 12 tiras de 8 tapones

5); 6): 2 tiras de 8 tapones

- 4-cap strips:

7): 18 tiras de 4 tapones

8): 4 tiras de 4 tapones

3) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit: Los kits contiene reactivos suficientes para realizar 24, 36, 48 o pruebas según el formato o el equipamiento a utilizar. Además, por cada una de las presentaciones se encuentra la versión con control interno (CI) o con control de extracción (CE). Son en total 18 formas de presentación diferentes.

Formas de presentación: CI) Con control interno y CE) Con control de extracción

Para CI y CE):

- 1). VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile
- 2) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile
- 3) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile
- 4) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile
- 5) VIASURE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®
- 6) VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit

Composición: Todos los productos contienen los mismos componentes, difiriendo solo el soporte de reacción que contiene el reactivo de PCR; pudiendo ser tiras de perfil bajo o alto dependiendo del termociclador (*Perfil 1: bajo-Low profile-, 2: perfil alto-High profile-, 3: Rotor-Gene®) o tubos para alicuotar las reacciones en otro soporte.

Forma de Presentación	de Formato Final	Cantidad de reactivo	Número de determinaciones	de Formato del Perfil*
1) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	24	Bajo
3) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	48	

2) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	24	Alto
4) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	48	
5) CI/CE	Tira de pocillos	18 tiras de 4 pocillos	36	Rotor-Gene®
6) CI/CE	Viales soporte)	(sin 4 viales para 24 determinaciones cada uno	48	-

*Dependiendo de las especificaciones del termociclador (1: Perfil bajo, 2: perfil alto, 3: Rotor-Gene®) (Ver Anexo Termocicladores)

Composición de kits CI:

- ***MRSA 1: SAU + MEC A/C:*** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado.
- ***MRSA 2: ORFX:*** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado.

Composición de kits CE:

- ***MRSA 1: SAU + MEC A/C:*** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado.
- ***MRSA 2: ORFX:*** Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado.
- ***Extraction Control:*** Acido nucleico liofilizado no infeccioso

Cantidad: 1 vial

El formato de ***MRSA 1: SAU + MEC A/C*** y ***MRSA 2: ORFX*** tanto para CI como para CE son:

- ***MRSA 1: SAU + MEC A/C***

1) a 4): 8-well strips: 3 o 6 tiras de 8 pocillos según sean 24 o 48 determinaciones.

5) 4-well strips: 9 tiras de 4 pocillos para 36 determinaciones.

6): Reaction-Mix tube: 2 viales

- MRSA 2: ORFX

1) a 4): 8-well strips: 3 o 6 tiras de 8 pocillos según sean 24 o 48 determinaciones.

5) 4-well strips: 9 tiras de 4 pocillos para 36 determinaciones.

6): Reaction-Mix tube: 2 viales

Los kits CI y CE contienen, además:

- Rehydration Buffer: Solución para la reconstitución del producto estabilizado.

1) a 6): 1 vial x 1,8 mL

- Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Positive Control: DNA sintético liofilizado no infeccioso.

1) a 6): 1 vial

- Negative control: Control negativo

1) a 6): 1 vial x 1 mL

- Water RNase/DNase free: Agua libre de RNAsa/DNAsa

1) a 6): 1 vial x 1 mL

- Tear-off 8-cap strips:

1); 2): 6 tiras de 8 tapones

3); 4): 12 tiras de 8 tapones

- 4-cap strips:

5): 18 tiras de 4 tapones

4) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit: Los kits contiene reactivos suficientes

para realizar 36, 48, 72 o 96 pruebas según el formato o el equipamiento a utilizar. Además, por cada una de las presentaciones se encuentra la versión con control interno (CI) o con control de extracción (CE). Son en total 18 formas de presentación diferentes.

Formas de presentación: CI) Con control interno y CE) Con control de extracción

Para CI y CE):

- 1) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile
- 2) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile
- 3) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile
- 4) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile
- 5) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile
- 6) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile
- 7) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®
- 8) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®
- 9) VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

Composición: Todos los productos contienen los mismos componentes, difiriendo solo el soporte de reacción que contiene el reactivo de PCR; pudiendo ser tiras de perfil bajo o alto dependiendo del termociclador (*Perfil 1: bajo-Low profile-, 2: perfil alto-High profile-, 3: Rotor-Gene®) o tubos para alicuotar las reacciones en otro soporte.

Forma de Presentación	de Formato Final	Cantidad de reactivo	Número de determinaciones	de Formato Perfil*	del
1) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	48		
3) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	96	Bajo	
5) CI/CE	Placa de pocillos	1 placa de 96 pocillos	96		
2) CI/CE	Tira de pocillos	6 tiras de 8 pocillos	48		
4) CI/CE	Tira de pocillos	12 tiras de 8 pocillos	96	Alto	
6) CI/CE	Placa de pocillos	1 placa de 96 pocillos	96		

7) CI/CE	Tira de pocillos	9 tiras de 4 pocillos	36	Rotor-Gene®
8) CI/CE	Tira de pocillos	18 tiras de 4 pocillos	72	Rotor-Gene®
9) CI/CE	Viales (sin soporte)	4 viales para 24 determinaciones cada uno	96	-

Composición de kits con CI:

-Vancomycin resistance: Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado.

Composición de kits con CE:

-Vancomycin resistance: Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado.

- Extraction control: Acido nucleico liofilizado no infeccioso

Cantidad: 1 vial x 1 mL

El formato de **Vancomycin resistance** tanto para CI como para CE son:

1) a 4): 8-well strips: 6 o 12 tiras de 8 pocillos según sean 48 o 96 determinaciones.

5); 6): 96-well plate: 1 placa

7); 8): 4-well strips: 9 o 18 tiras de 4 pocillos según sean 36 o 72 determinaciones

9): Reaction-Mix tube: 4 viales

Los kits CI y CE contienen, además:

-Rehydration Buffer: Solución para la reconstitución del producto estabilizado.

1) a 9): 1 vial x 1,8 mL

- **Vancomycin resistance Positive Control:** DNA sintético liofilizado no infeccioso.

1) a 9): 1 vial

- **Negative control:** Control negativo

1) a 9): 1 vial x 1 mL

- **Water RNase/DNase free:** Agua libre de RNAsa/DNAsa

1) a 9): 1 vial x 1 mL

- **Tear-off 8-cap strips:**

1); 2): 48 determinaciones: 6 tiras de 8 tapones

3); 4); 5); 6): 96 determinaciones: 12 tiras de 8 tapones

- **4-cap strips:**

7): 9 tiras de 4 tapones

8): 18 tiras de 4 tapones

PERÍODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE PRESENTACIÓN: para 1, 2, 3 y 4: 24 (veinticuatro) meses. Conservado a temperatura entre 2- 40°C.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: CERTEST BIOTEC, S.L., C/J, N°1 POL. IND. RIO GÁLLEGO, SAN MATEO DE GÁLLEGO – 50840 (ZARAGOZA), ESPAÑA.

CONDICIÓN DE VENTA/CATEGORÍA: Venta exclusiva a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO.

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del **PRODUCTO MÉDICO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO PM-1127-423**

Nº EX-2022-16386269-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by Gestion Documental Electronica

Date: 2022.10.13 13:25:37 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica

Date: 2022.10.13 13:25:37 -03:00