

# VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest  
BIOTEC

## *Vancomycin resistance*

Handbook for the following references/  
Handbuch für folgende Medizinprodukte:

**VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit**

**BD REF 444202**

to be used with the BD MAX™ System  
zur Verwendung mit dem BD MAX™ System



## ENGLISH

---

### 1. Intended use

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit is designed for the specific detection and differentiation of *vanA* and *vanB* genes that can be associated with vancomycin-resistant enterococci (VRE) directly from perianal and/or rectal swabs and colonies. This test is intended to be used as an aid in the identification of vancomycin-resistant organisms in combination with patient's clinical signs and symptoms and epidemiological risk factors. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of DNA and subsequent real-time PCR employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ System. DNA from perianal and/or rectal swabs and colonies is detected using fluorescent reporter dye probes specific for *vanA* and *vanB* genes.

### 2. Summary and Explanation

Enterococci are common commensal organisms found in the gastrointestinal tract and female genitals. Recently they are recognized as opportunistic pathogens causing nosocomial infections such as urinary tract infections, skin infections, respiratory infections, endocarditis and sepsis in compromised host.

Vancomycin is a glycopeptide antibiotic that inhibits cell wall synthesis and used to treat severe Gram-positive bacterial infections. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) were first reported in England and France in 1986 and now spread through hospitals worldwide.

The resistance to vancomycin is a complex process and needs the presence of different gene clusters. Mainly, they can be divided into two types depending on the pentapeptide precursors produced by vancomycin resistance genes; the precursor ending in D-Alanine-D-Serine (VanC-, VanE-, VanG-, VanL- and VanN-type) or ending in D-Alanine-D-Lactate (VanA-, VanB-, VanD- and VanM-type). These pentapeptide precursors showed low-affinities for the glycopeptides and conferred vancomycin-resistances on enterococci.

The first type of vancomycin resistance in enterococci is intrinsic resistance (i.e. associated with *vanC* gene). Isolates of *Enterococcus gallinarum* and *E. casseliflavus/E. flavescens* demonstrate an inherent, low-level resistance to vancomycin.. The second type is acquired resistance (i.e. *vanA* or *vanB* genes) and enterococci can become resistant by acquisition of mobile genetic elements (transposons and plasmids) from another *Enterococcus* species or organism. Most commonly, this resistance is seen in *E. faecium* and *E. faecalis*, but also has been recognized in *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans*, and several other enterococcal species. *vanA* and *vanB* genes are responsible for high or moderate levels of vancomycin resistance.

Transmission of vancomycin-resistant enterococci (VRE) can occur through direct contact with body fluids from colonized or infected patients (blood, wound drainage, urine, stool, septum and other) or through indirect contact via the hands of health-care workers, or via contaminated patient care equipment or environmental surfaces.

At first, the screening method applied was culture-based, which is time-consuming and takes generally from one to five days to complete. Real-time PCR assays have been shown to be a tool for the detection of clinically relevant genes associated with vancomycin-resistance.



### 3. Principle of the procedure

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit is designed for the identification and differentiation of DNA from vancomycin-resistant enterococci and other organisms carrying the vancomycin resistance genes *vanA* and *vanB*. After DNA isolation, the identification of vancomycin resistance is performed by the amplification of a conserved region of the *vanA* and *vanB* genes, using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence is measured on the BD MAX™ System.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit contains in each tube all the components necessary for a real-time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. *vanA* genes are amplified and detected in channel 475/520, *vanB* genes in channel 585/630 and the internal control (IC) in channel 530/565.

### 4. Reagents provided

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1:

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-VAN112	<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	Transparent Blue foil	2 pouches of 12 tubes
VS-RB08	Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	Transparent Rust foil	1 pouch of 24 tubes

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit with Ref. VS-VAN124.

### 5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials and equipment that are required for use but not included in the VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit.

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref:442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).
- Nuclease-free water.
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves



## 6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- After opening the aluminum pouches which contain the reaction tubes, they can be used for up to 28 days.

## 7. Precautions for users

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents from humidity.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit, any additional reagents required for testing, and the BD MAX™ System are not contaminated. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

## 8. Test procedure

### 8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

The VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit has been validated on perianal and/or rectal swabs immediately placed in ESwab™ transport medium (liquid Amies based collection and transport system)



(Copan, Italy). The VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit has also been validated on colony suspension.

Collection, storage and transport specimens should be maintained per the conditions validated by the user.

Overall, perianal and/or rectal swabs should be collected and labelled appropriately in clean ESwab™ transport medium and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens must be transported following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 24 hours), we recommend shipping at  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ . The samples can be stored at  $25^{\circ}\text{C}$  for up to 24 hours,  $2$  to  $8^{\circ}\text{C}$  for up to 144 hours (6 days) or frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for up to 196 hours (8 days). Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

## 8.2. SAMPLE PREPARATION AND DNA EXTRACTION

Perform the sample preparation according to the recommendations in the instructions for use of the extraction kit used, BD MAX™ ExK™ TNA-2. Note that some other samples may require pre-processing. Application-specific extraction preparation procedures should be developed and validated by the user.

1. Copan ESwab™: Pipette 200  $\mu\text{L}$  of the ESwab™ sample into a BD MAX™ TNA-2 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.
2. Colonies: Pick up two colonies from the cultured medium and suspend them into 500  $\mu\text{L}$  nuclease free water. Ensure complete mixing by vortexing. Add 10  $\mu\text{L}$  of the suspension into a BD MAX™ TNA-2 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

## 8.3. PCR PROTOCOL

Note: Please, refer to the BD MAX™ System User's Manual for detailed instructions.

### 8.3.1. Creating PCR test program for VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit

Note: If you have already created the VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection test, you can skip step 8.3.1 and go directly to 8.3.2.

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the "Test Name" window, name your test: i.e. *VIASURE Vancomycin resistance*.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-2".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5"
  - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".



- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to 500 µL.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 2).
  - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	vanA	50	200	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	200	0	40
585/630 (ROX)	vanB	50	300	0	40
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Table 2. PCR settings.

- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 3), as well

		False Receiving Channel				
		Channel	475/520	530/565	585/630	630/665
Excitation Channel	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Table 3. Spectral cross-talk parameters.

- 10) In "Test Steps" tab, enter the PCR protocol (Table 4).

Step Name	Profile Type	Cycles	Time (s)	Temperature	Detect
Initial denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection)	2-Temperature	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Table 4. PCR protocol.

- 11) Click the "Save Test" button.

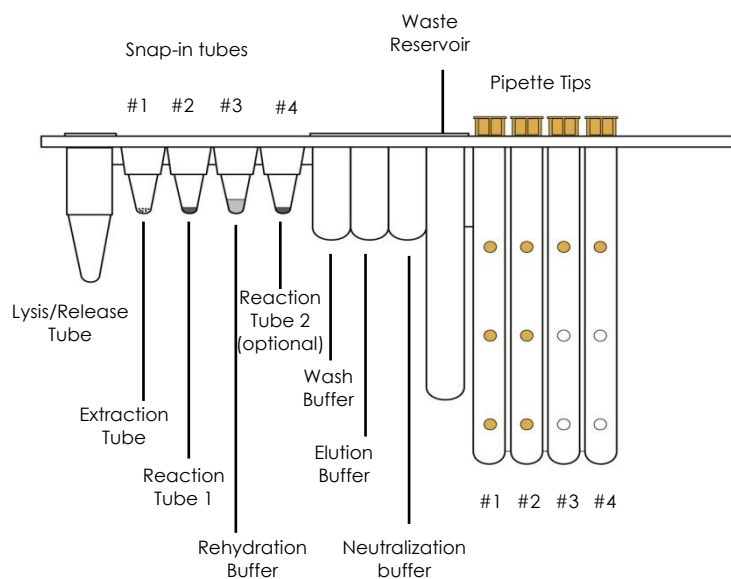
### 8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 1) For each specimen to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK TNA-2 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- 2) Remove the required number of BD MAX™ ExK TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close the pouch with the zip seal.



- 3) Determine and separate the appropriate number of VIASURE *Vancomycin resistance* reaction tubes (blue foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
  - a. Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
  - b. In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal.
    - i. Note: If you choose the format “Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (rust foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close the pouch with the zip seal.
  - a. In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal.

Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK TNA-2 kit.



### 8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the “Work List” tab on the “Run” screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the “Test” drop down menu, select VIASURE *Vancomycin resistance* (if not already created see Section 8.3.1).
- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull down menu (optional).
- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Worklist, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.



- 5) Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Worklist and click the "Save" button. Continue until all Sample Buffer Tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer Tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

### 8.3.4 BD MAX™ report

- 1) In main menu, click the "Results" button.
- 2) Either double click on your run in the list or press the "view button".
- 3) Click on "Print", select: "Run Details, Test Details and Plot..."
- 4) Click on "Print or Export button" on the "Run Reports" screen.

## 9. Result interpretation

For a detailed description on how to analyze data, refer to the BD MAX™ System User's manual.

The analysis of the data is done by the BD MAX™ software according to the manufacturer's instructions. The BD MAX™ software reports Ct values and amplification curves for each detector channel of each sample tested in the following way:

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 2). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.
- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Table 5.

Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. In addition, check that there is no report of BD MAX™ System failure.

-Results should be read and analyzed using the following table:





<b>vanA gene (475/520)</b>	<b>vanB gene (585/630)</b>	<b>Internal control (530/565)</b>	<b>Interpretation</b>
-	-	+	<b>vanA and vanB Negative</b>
+	+	+/-	<b>vanA and vanB Positive</b>
+	-	+/-	<b>vanA Positive, vanB Negative</b>
-	+	+/-	<b>vanB Positive, vanA Negative</b>
-	-	-	<b>Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs.</b>
IND	IND	IND	<b>Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.</b>
INC	INC	INC	<b>Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.</b>

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40. The internal control may or may not show an amplification signal because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids instead of the internal control. In these cases, the detection of the IC is not necessary.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

In case of unresolved results (UNR), absence of internal control signal in negative sample it is recommended to repeat the assay following the indications below:

**REPEAT TEST PROCEDURE**

NOTE: Sufficient volume is available for one repeat test from the Sample Buffer Tube. For prepared BD MAX Sample Buffer Tubes stored at 2–8 °C or 25°C, retesting must be performed within 24 hours.

NOTE: New samples may be tested in the same run with repeat samples.

The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

**10. Limitations of the test**

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with perianal and/or rectal swabs collected using ESwab™ transport medium, and colony suspension.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from perianal and/or rectal swabs and colonies must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.



- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by vancomycin resistance suspicious samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

## 11. Quality control

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contains an internal control (IC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

## 12. Performance characteristics

### 12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit was tested using 216 samples (fresh rectal samples collected using ESwab™) from patients (infants and adults) with suspected VRE infection. These results were compared with those obtained with in-house real-time PCR assay and enrichment culture. The in-house real-time PCR adapted to the BD MAX™ System detects *E. faecalis*, *E. faecium* and *vanA* and *vanB* genes.

		In-house real-time PCR assay		
		+	-	Total
VIASURE <i>Vancomycin resistance</i> Real Time PCR Detection kit	+	82*	0	82
	-	0	134	134
	Total	82	134	216

Table 6: Comparative results for *vanA* gene.

\*17/82 patients coinfecting with *vanA*- and *vanB*- types *Enterococcus faecium*. VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit is capable of correctly simultaneously detecting *vanA* and *vanB* genes in clinical samples.

		In-house real-time PCR assay		
		+	-	Total
VIASURE <i>Vancomycin resistance</i> Real Time PCR Detection kit	+	53*	1#	54
	-	0	162	162
	Total	53	163	216

Table 7: Comparative results for *vanB* gene.

\* 17/53 patients coinfecting with *vanA*- and *vanB*- types *Enterococcus faecium*. VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit is capable of correctly simultaneously detecting *vanA* and *vanB* genes in clinical samples.

# This sample was negative for vancomycin resistance using Whole Genome Sequencing (WGS) analysis.



Sensitivity (SE) and specificity (SP) for VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR detection kit compared with In-house Real Time PCR assay are shown in next table:

Vancomycin resistance gene	SE (%)	SP (%)
<b>vanA</b>	>99.9	>99.9
<b>vanB</b>	>99.9	99.4

Table 8. Sensitivity (SE) and specificity (SP) values for VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR detection kit.

The results show a high sensitivity and specificity to detect *vanA* and *vanB* genes using VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit.

### 12.2. Analytical sensitivity

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of  $\geq 4$  colony-forming unit per reaction (CFU/rxn) for *vanA* and  $\geq 10$  CFU/rxn for *vanB* with a positive rate of  $\geq 95\%$ .

Figure 2. Dilution series of *vanA* gene ( $3.62 \times 10^4$ -3.62 CFU/rxn) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

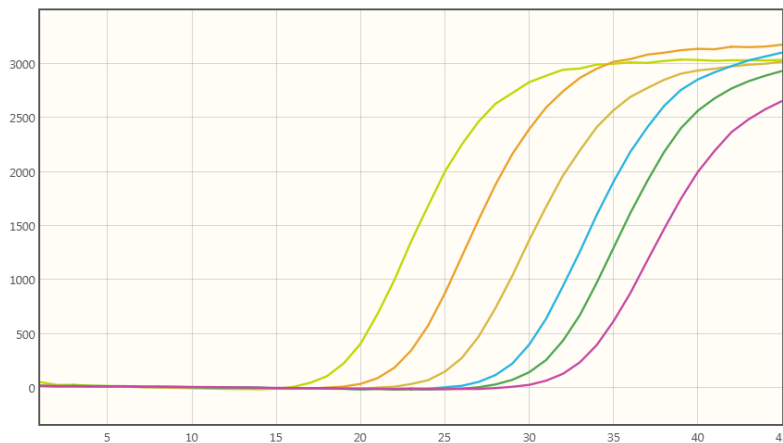
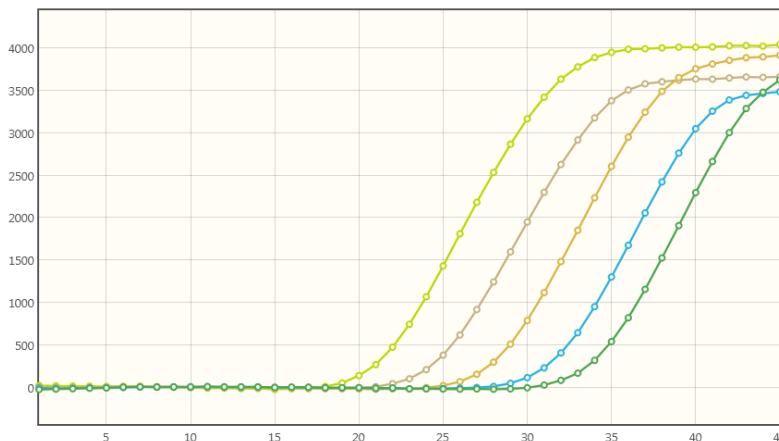


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene ( $5.65 \times 10^4$ -9.98 CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



### 12.3. Analytical specificity

The specificity of the vancomycin resistance assay was confirmed by testing a panel consisting of different antimicrobial resistant organisms and different microorganisms representing the most common enteric pathogens or flora present in the intestine. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay:

Cross-reactivity testing					
Adenovirus serotypes 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL), and KPC-2 producing <i>Klebsiella pneumonia</i> isolate	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	VanC- type <i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	VanC2- type <i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	Norovirus GI and GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrovirus Genotype I-VIII	-	VanA-type <i>Enterococcus faecalis</i>	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	VanB-type <i>Enterococcus faecalis</i>	- / +	Rotavirus A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	VanA- type <i>Enterococcus faecium</i>	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	VanB- type <i>Enterococcus faecium</i>	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	VanB and VanC- types <i>Enterococcus gallinarum</i>	- / +	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	VanC – type <i>Enterococcus gallinarum</i>	-	<i>Salmonella paratyphi B</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	VanC1- type <i>Enterococcus gallinarum</i>	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
VIM-1 producing <i>Citrobacter braakii</i> isolate	-	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-	Sapovirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
KPC-3 and VIM-4 producing <i>Citrobacter freundii</i> -complex isolate	-	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> isolate	-	OXA-48 producing <i>Serratia marcescens</i> isolate	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	OXA-244 producing <i>Escherichia coli</i> isolate	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	TEM-1 (non-ESBL) and IMP-1 producing <i>Escherichia coli</i> isolate	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (mecC)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) strain N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) strain (oxa <sup>R</sup> , PVL-positive, spa type t310)	-
SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) and OXA-48 producing <i>Enterobacter cloacae</i> isolate	-	<i>Helicobacter pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) and NDM-1 producing <i>Enterobacter cloacae</i> isolate	-	<i>Helicobacter pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
NDM-7 producing <i>Enterobacter cloacae</i> -complex isolate	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
VanA-type <i>Enterococcus avium</i>	+ / -	SHV-1 (non-ESBL), KPC-3, and OXA-48 producing <i>Klebsiella pneumonia</i> isolate	-		

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.



#### 12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit for *vanA* gene was evaluated against *vanA*-type *Enterococcus avium*, *vanA*-type *Enterococcus faecalis* (NCTC 13632, NCTC 12201) and *vanA*- type *Enterococcus faecium* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202) strains, showing positives results.

The reactivity of VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit for *vanB* gene was evaluated against *vanB*-type *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299, CECT 8120), *vanB*- type *Enterococcus faecium* (IOWA 2) and *vanB* and *vanC* *Enterococcus gallinarum* (ENT20120142) strains, showing positives results.



## DEUTSCH

### 1. Verwendungszweck

Das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit ist für den spezifischen Nachweis und die Differenzierung zwischen *vanA*- und *vanB*-Genen, die mit Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) assoziiert werden können, aus direkten perianalen und/oder rektalen Abstrichen sowie Kolonien vorgesehen. Dieser Test soll die Identifizierung von Vancomycin-resistenten Keimen in Kombination mit den klinischen und epidemiologischen Risikofaktoren des Patienten erleichtern. Der Assay verwendet das BD MAX™ System zur automatisierten DNA-Extraktion und anschließenden Echtzeit-PCR durch Einsatz der mitgelieferten Reagenzien in Kombination mit universellen Reagenzien und Einwegartikeln des BD MAX™ Systems. Die DNA aus perianalen und/oder rektalen Abstrichen und Kolonien wird über Sonden mit fluoreszierendem Reporterfarbstoff, der spezifisch an die *vanA*- und *vanB*-Gene bindet, nachgewiesen.

### 2. Zusammenfassung und Erläuterung

Enterokokken sind häufige kommensale Keime, die im Magendarmtrakt und den weiblichen Geschlechtsorganen vorkommen. In jüngster Zeit wurden sie als opportunistische Pathogene anerkannt, die nosokomiale Infektionen wie Harnwegsinfektionen, Hautinfektionen, Atemwegsinfektionen, Endokarditis und Sepsis beim immungeschwächten Wirt auslösen können.

Vancomycin ist ein Glykopeptid-Antibiotikum, das Zellwandsynthese hemmt und zur Behandlung von schweren Infektionen mit grampositiven Bakterien eingesetzt wird. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) wurden 1986 zum ersten Mal in England und Frankreich gemeldet und sind heute weltweit in Krankenhäusern anzutreffen.

Die Resistenz gegenüber Vancomycin ist ein komplexer Prozess und erfordert die Präsenz verschiedener Gencluster. Je nach den Pentapeptid-Präkursoren, die von Vancomycin-Resistenz-Genen erzeugt werden, können diese hauptsächlich in folgende zwei Arten unterteilt werden: der auf D-Alanin-D-Serin (*VanC*-, *VanE*-, *VanG*-, *VanL*- und *VanN*-Typ) oder auf D-Alanin-D-Laktat (*VanA*-, *VanB*-, *VanD*- und *VanM*-Typ) endende Präkursor. Diese Pentapeptid-Präkursoren zeigten eine niedrige Affinität für Glykopeptide und übertrugen Vancomycin-Resistenzen auf Enterokokken.

Die erste Art von Vancomycin-Resistenz bei Enterokokken ist eine intrinsische Resistenz (d. h. eine mit dem *vanC*-Gen assoziierte Resistenz). Isolate von *Enterococcus gallinarum* und *E. casseliflavus*/*E. flavescens* zeigen eine inhärente, niedriggradige Resistenz gegenüber Vancomycin. Der zweite Typ ist eine erworbene Resistenz (d. h. *vanA*- oder *vanB*-Gen), bei der Enterokokken durch Erwerb mobiler genetischer Elemente (Transposons und Plasmide) von anderen *Enterococcus*-Arten oder Keimen resistent werden können. Am häufigsten wird diese Resistenz bei *E. faecium* und *E. faecalis* beobachtet, wurde jedoch auch bei *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* und weiteren anderen Enterokokken-Arten festgestellt. Die *vanA*- und *vanB*-Gene sind für hoch- oder mittelgradige Vancomycin-Resistenzen verantwortlich.

Die Übertragung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) kann durch direkten Kontakt mit Körperflüssigkeiten von kolonisierten oder infizierten Patienten (Blut, nässende Wunden, Urin, Stuhl, Septum und ähnliches) oder durch



indirekten Kontakt über die Hände von medizinischem Personal bzw. über kontaminierte Patientengeräte oder umgebende Flächen erfolgen.

Die ursprünglich angewandte Screening-Methode beruhte auf der Anlage von Kulturen, was zeitaufwändig ist und in der Regel ein bis fünf Tage in Anspruch nimmt. Echtzeit-PCR-Assays haben sich als Mittel zum Nachweis von klinisch relevanten Genen, die mit Vancomycin-Resistenz assoziiert sind, erwiesen.

### 3. Verfahrensprinzip

Das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit ist für die Identifizierung und Differenzierung von DNA aus Vancomycin-resistenten Enterokokken und anderen Keimen, die Träger der Vancomycin-Resistenz-Gene *vanA* und *vanB* sind, vorgesehen. Nach der DNA-Isolation erfolgt die Identifizierung von Vancomycin-Resistenz durch Amplifikation einer konservierten Region der *vanA*- und *vanB*-Gene mithilfe spezifischer Primer und einer fluoreszenzmarkierten Sonde.

Das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit nutzt die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase. Während der DNA-Amplifikation spaltet dieses Enzym die an die komplementäre DNA-Sequenz gebundene Sonde, wodurch der Quencher-Farbstoff vom Reporter getrennt wird. Diese Reaktion erzeugt eine zur Quantität des Ziel-Templates proportionale Steigerung des Fluoreszenzsignals. Diese Fluoreszenz wird vom BD MAX™ System gemessen.

Das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit enthält in jedem Gefäß bereits die für den Echtzeit-PCR-Test erforderlichen Komponenten (spezifische Primer/Sonden, dNTP, Puffer, Polymerase) in stabilisierter Form sowie eine interne PCR-Inhibitionskontrolle. *vanA*-Gene werden in Kanal 475/520 amplifiziert und nachgewiesen, *vanB*-Gene in Kanal 585/630 und die interne Kontrolle (IK) in Kanal 530/565.

### 4. Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

Im VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit sind die in Tabelle 1 aufgeführten Materialien und Reagenzien enthalten:

Referenznummer	Reagenz/Material	Beschreibung	Farbe	Menge
<b>VS-VAN112</b>	<i>Vancomycin resistance reaction tube (Vancomycin Resistenz-Reaktionsgefäß)</i>	Eine Mischung aus Enzymen, Primersonden, Puffer, dNTP, Stabilisatoren und interner Kontrolle in stabilisierter Form	Transparent Blaue Folie	2 Beutel mit je 12 Röhrrchen
<b>VS-RB08</b>	Rehydration Buffer tube (Rehydrationspuffer-Röhrrchen)	Lösung zur Rekonstitution des stabilisierten Produkts	Transparent Rostfarbene Folie	1 Beutel mit 24 Röhrrchen

Tabelle 1. Im Lieferumfang des VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit mit Ref.-Nr. VS-VAN124 enthaltenen Reagenzien und Materialien.



## 5. Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung

Nachfolgend sind die erforderlichen, jedoch nicht im Lieferumfang des VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kits enthaltenen Materialien aufgeführt.

- Echtzeit-PCR-Gerät: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref:442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortexmischer
- Mikropipetten (präzise zwischen 2 und 1000 µl)
- Nuklease-freies Wasser
- Filterspitzen
- Puderfreie Einweghandschuhe

## 6. Transport- und Lagerbedingungen

- Die Kits können bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei 2 °C bis 40 °C transportiert und gelagert werden.
- Nach dem Öffnen der Aluminiumbeutel können die darin enthaltenen Reaktionsgefäße bis zu 28 Tage verwendet werden.

## 7. Sicherheitshinweise für den Benutzer

- *In-vitro*-Diagnostikum für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Keine abgelaufenen Reagenzien und/oder Materialien verwenden.
- Das Kit nicht verwenden, wenn das Etikett, das die Außenverpackung versiegelt, aufgerissen ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbehälter bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt sind.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn sich in den Reagenzbeuteln kein Trockenmittel befindet oder dieses beschädigt ist.
- Trockenmittel nicht aus Reagenzbeuteln entfernen.
- Schutzbeutel von Reagenzien nach jedem Gebrauch sofort mit dem Zippverschluss schließen. Vor dem Verschließen überschüssige Luft aus den Beuteln entfernen.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Folie gerissen oder beschädigt ist.
- Reagenzien unterschiedlicher Beutel und/oder Kits und/oder Chargen nicht vermischen.
- Die Reagenzien vor Feuchtigkeit schützen.
- Die Komponenten vor Licht schützen.
- In Fällen, in denen andere PCR-Tests im selben allgemeinen Laborbereich durchgeführt werden, ist Sorge dafür zu tragen, dass das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, das BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit, sonstige zusätzlich für den Test erforderlichen Reagenzien und das BD MAX™ System nicht kontaminiert werden. Vor dem Umgang mit Reagenzien und Kartuschen Handschuhe wechseln.





- Einen Arbeitsfluss in eine Richtung implementieren. Der Arbeitsfluss sollte im Extraktionsbereich beginnen und zum Amplifikations- und Detektionsbereich übergehen. Keine Proben, Ausrüstungsgegenstände oder Reagenzien in einen Bereich zurückholen, in dem ein vorheriger Schritt durchgeführt wurde.
- Die Grundsätze der guten Laborpraxis befolgen. Schutzkleidung, Einweghandschuhe, Schutzbrillen und Schutzmasken verwenden. Im Arbeitsbereich nicht essen, trinken oder rauchen. Nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- Proben sowie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit den Proben in Berührung gekommen sind, immer als potenziell infektiös betrachten und entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien behandeln. Während der Entnahme, Lagerung, Verarbeitung und Entsorgung von Proben die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Eine regelmäßige Dekontaminierung von häufig genutzten Ausrüstungsgegenständen und Flächen, insbesondere Mikropipetten und Arbeitsoberflächen, wird empfohlen.
- Weitere Warn-, Sicherheits- und Verfahrenshinweise finden Sie im Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.

## 8. Testverfahren

### 8.1. PROBENENTNAHME, -LAGERUNG UND -TRANSPORT

Das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit wurde für direkt in ein ESwab™-Transportmedium (auf flüssigem Amies basierendes Entnahme- und Transportsystem) (Copan, Italien) aufgenommene perianale und/oder rektale Abstriche validiert. Das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit wurde ebenso für Kolonie-Suspensionen validiert.

Die Entnahme, die Lagerung und der Transport von Proben sollte unter den vom Benutzer validierten Bedingungen erfolgen.

Im Allgemeinen sind perianale und/oder rektale Abstriche in einem sauberen und ordnungsgemäß gekennzeichneten ESwab™-Transportmedium zu entnehmen und zur Gewährleistung der Testqualität so schnell wie möglich zu verarbeiten. Die Proben sind gemäß den lokalen und nationalen Bestimmungen für den Transport von pathogenem Material zu transportieren. Für den Langzeittransport (über 24 Stunden) empfehlen wir eine Beförderung bei  $\leq -20$  °C. Die Proben können bis zu 24 Stunden bei 25 °C, bis zu 144 Stunden (6 Tage) bei 2 bis 8 °C oder bis zu 196 Stunden (8 Tage) bei -20 °C eingefroren gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden, um eine Schädigung der Proben und Nukleinsäuren zu vermeiden.

### 8.2. PROBENVORBEREITUNG UND DNA-EXTRAKTION

Die Probenvorbereitung gemäß den in der Gebrauchsanweisung des verwendeten Extraktionskits BD MAX™ ExK™ TNA-2 aufgeführten Empfehlungen durchführen. Bitte beachten Sie, dass andere Proben möglicherweise eine Vorbehandlung erfordern. Applikationsspezifische Vorbereitungsmaßnahmen für die Extraktion sind vom Benutzer zu bestimmen und zu validieren.

1. Copan ESwab™: Pipettieren Sie 200  $\mu$ l der ESwab™-Probe in ein BD MAX™ TNA-2 Probenpufferröhrchen und verschließen Sie das Röhrchen mit einem Septumverschluss. Stellen Sie eine vollständige Vermischung sicher, indem Sie die Probe bei hoher Geschwindigkeit 1 Minute vortexen. Führen Sie die Bearbeitung am BD MAX™ System fort.



2. Kolonien: Entnehmen Sie dem Kulturmedium zwei Kolonien und suspendieren Sie diese in 500 µl Nuklease-freiem Wasser. Stellen Sie die vollständige Vermischung durch Vortexen sicher. Pipettieren Sie 10 µl der Suspension in ein BD MAX™ TNA-2 Probenpufferröhrchen und verschließen Sie das Röhrchen mit einem Septumverschluss. Stellen Sie eine vollständige Vermischung sicher, indem Sie die Probe bei hoher Geschwindigkeit 1 Minute vortexen. Führen Sie die Bearbeitung am BD MAX™ System fort.

### 8.3. PCR-PROTOKOLL

Hinweis: Ausführliche Anweisungen entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.

#### 8.3.1. Erstellen eines PCR-Test-Programms für das VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

Hinweis: Wenn Sie den VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR-Detektionstest bereits erstellt haben, können Sie Schritt 8.3.1 auslassen und direkt zu Schritt 8.3.2 übergehen.

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems die Registerkarte „Test Editor“ (Test-Assistent).
- 2) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Create“ (Erstellen).
- 3) Benennen Sie im Fenster „Test Name“ Ihren Test, d. h.: VIASURE Vancomycin resistance.
- 4) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Extraction Type“ (Extraktionstyp) die Option „ExK TNA-2“.
- 5) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Master Mix Format“ die Option „Type 5“ (Typ 5).
  - b. Hinweis: Das Produkt kann in Kombination mit einem zusätzlichen „VIASURE für BD MAX Test“ verwendet werden. Wählen Sie in einem solchen Fall die Option „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix Konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)).
- 6) Wählen Sie unter „Sample extraction parameters“ (Probenextraktionsparameter) die Option „User defined“ (Benutzerdefiniert) und stellen Sie das Probenvolumen auf 500 µl ein.
- 7) Wählen Sie unter „Ct Calculation“ (Ct-Berechnung) die Option „Call Ct at Threshold Crossing“ (Ct bei Grenzwertüberschreitung abrufen) aus.
- 8) Geben Sie in der Registerkarte „PCR settings“ (PCR-Einstellungen) folgende Parameter ein: „Channel Settings“ (Kanaleinstellungen), „Gains“ (Verstärkung) und „Threshold“ (Grenzwert) (Tabelle 2).
  - a. Hinweis: Das Produkt kann in Kombination mit einem zusätzlichen „VIASURE für BD MAX Test“ verwendet werden. In einem solchen Fall sind die PCR-Einstellungen und Testschritte für die Einrastposition 2 (grün) und Einrastposition 4 (blau) einzugeben.



Channel (Kanal)	Alias	Gain (Verstärkung)	Threshold (Schwellenwert)	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	vanA	50	200	0	40
530/565 (HEX)	IK	80	200	0	40
585/630 (ROX)	vanB	50	300	0	40
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabelle 2. PCR-Einstellungen.

9) Geben Sie in der Registerkarte „PCR settings“ (PCR-Einstellungen) auch die folgenden Parameter für „Spectral Cross Talk“ (Spektrale Übersprechung) (Tabelle 3) ein.

		False Receiving Channel (Falsch-empfangender Kanal)					
		Kanal	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Exzitationskanal)	475/520	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	0,0	-	0,0	0,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0
	630/665	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0

Tabelle 3. Parameter für das spektrale Übersprechen.

10) Geben Sie in der Registerkarte „Test Steps“ (Testschritte) das PCR-Protokoll (Tabelle 4) ein.

Step Name (Schrittbezeichnung)	Profile Type (Profiltyp)	Cycles (Zyklen)	Time (s) (Zeit (s))	Temperature (Temperatur)	Detect (Detektion)
Initial denaturation (Initiale Denaturierung)	Hold	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturierung und Hybridisierung/Extension (Datenerfassung))	2-Temperatur	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabelle 4. PCR-Protokoll.

11) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Save Test“ (Test speichern).

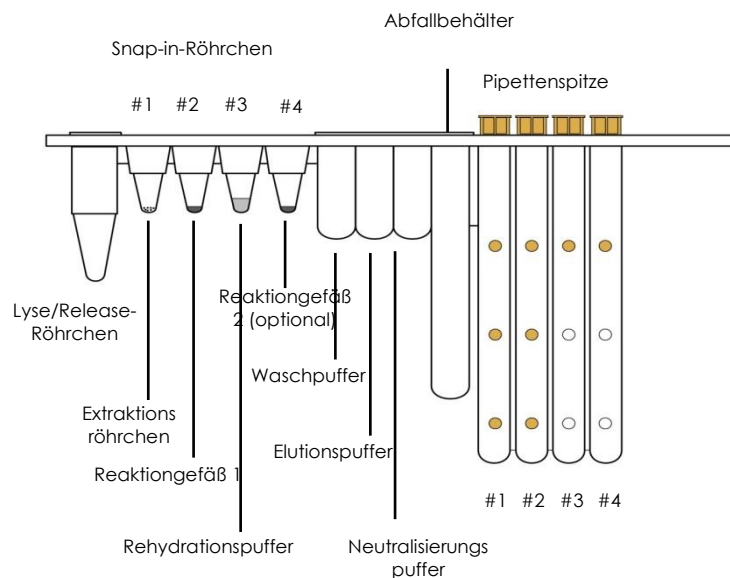
### 8.3.2. Einrichten der BD MAX™ Racks

- 1) Nehmen Sie für jede zu testende Probe einen Einzel-Reagenzstreifen aus dem BD MAX™ ExK TNA-2 Kit. Klopfen Sie jeden Streifen leicht auf eine harte Oberfläche, um sicherzustellen, dass sich alle Flüssigkeiten am Boden der Röhrchen befinden, und laden Sie sie in die Probenracks des BD MAX™ Systems.
- 2) Nehmen Sie die benötigte Anzahl an BD MAX™ ExK TNA Extraktionsröhrchen (B4) (weiße Folie) aus den Schutzbeuteln heraus. Lassen Sie das/die Extraktionsröhrchen (weiße Folie) in ihre entsprechenden Positionen im TNA-Streifen einrasten (Einrastposition 1, weiße Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.



- 3) Bestimmen und separieren Sie die geeignete Anzahl an VIASURE *Vancomycin resistance* reaction tubes (blaue Folie) und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 2, grüne Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1).
  - a. Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.
  - b. Stellen Sie zur Durchführung einer korrekten Rehydratation bitte sicher, dass sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet.
    - i. Hinweis: Wenn Sie das Format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix Konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)) (Abschnitt 8.3.1) wählen, bestimmen und separieren Sie die benötigte Anzahl an zusätzlichen VIASURE Reaktionsgefäßen (andersfarbige Folie) und lassen Sie sie in die entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 4, blaue Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.
- 4) Entnehmen Sie die benötigte Anzahl an Rehydratation Buffer tubes (rostfarbene Folie) und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 3, ohne Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
  - a. Stellen Sie für eine korrekte Überführung bitte sicher, dass sich die Flüssigkeit am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet.

Abbildung 1. BD MAX™ TNA Reagenzstreifen (TNA) aus dem BD MAX™ ExK TNA-2 Kit.



### 8.3.3. Einrichten des BD MAX™

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems (Software v4.50A oder höher) die Registerkarte „Work List“ (Arbeitsliste).



- 2) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Test“ die Option *VIASURE Vancomycin resistance* (falls nicht bereits erstellt, siehe 8.3.1).
- 3) Wählen Sie die entsprechende Chargennummer des Kits (an der Außenverpackung des verwendeten Extraktionskits zu finden) aus dem Auswahlmenü aus (optional).
- 4) Geben Sie die Identifikationsnummer des Probenpufferröhrchens im Probenröhrchen-Fenster der Arbeitsliste durch Scannen des Barcodes mit dem Scanner oder durch manuelle Eingabe ein.
- 5) Füllen Sie die Felder im Fenster „Specimen“ (Probe)/„Patient ID“ (Patienten-ID) und/oder „Accession“ (Eingang) der Arbeitsliste aus und klicken Sie auf die Schaltfläche „Save“ (Speichern). Führen Sie diese Schritte für sämtliche Probenpufferröhrchen aus. Stellen Sie sicher, dass die Proben/Patienten-ID und die Probenpufferröhrchen genau zugehörig sind.
- 6) Setzen Sie das/die vorbereitete(n) Probenpufferröhrchen in das/die BD MAX™ Rack(s).
- 7) Laden Sie das/die Rack(s) in das BD MAX™ System (Rack A befindet sich auf der linken Seite des BD MAX™ Systems und Rack B auf der rechten Seite).
- 8) Setzen Sie die erforderliche Anzahl an BD MAX™ PCR Cartridge (s) in das BD MAX™ System ein.
- 9) Schließen Sie die Tür des BD MAX™ Systems.
- 10) Klicken Sie auf „Start Run“ (Durchlauf starten), um den Vorgang zu starten.

### 8.3.4 BD MAX™ Bericht

- 1) Klicken Sie im Hauptmenü auf die Schaltfläche „Results“ (Ergebnisse).
- 2) Doppelklicken Sie auf Ihren Durchlauf in der Liste oder drücken Sie auf die Schaltfläche „View“ (Ansicht).
- 3) Klicken Sie auf „Print“ (Drucken) und wählen Sie folgende Optionen aus: „Run Details, Test Details and Plot...“ (Durchlaufdetails, Testdetails und Plot...)
- 4) Klicken Sie am Bildschirm „Run Reports“ (Durchlaufberichte) auf die Schaltfläche „Print“ (Drucken) oder „Export“.

## 9. Ergebnisinterpretation

Nähere Angaben zur Auswertung von Daten erhalten Sie im Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.

Die Datenanalyse durch die BD MAX™ Software erfolgt entsprechend den Herstelleranweisungen. Die BD MAX™ Software gibt die Ct-Werte und Amplifikationskurven für jeden Detektionskanal aller getesteten Proben auf folgende Weise an:

- Ein Ct-Wert von 0 gibt an, dass kein Ct-Wert mit dem spezifizierten Schwellenwert von der Software berechnet wurde (siehe Tabelle 2). Eine Amplifikationskurve einer Probe mit einem Ct-Wert von „0“ muss manuell geprüft werden.
- Ein Ct-Wert von -1 gibt an, dass kein Amplifikationsprozess stattgefunden hat.
- Jeder andere Ct-Wert ist in Übereinstimmung mit der Amplifikationskurve und entsprechend den Leitlinien für die Probenauswertung in Tabelle 5 auszuwerten.



Überprüfen Sie das Signal der internen Kontrolle, um die korrekte Funktionsweise der Amplifikationsmischung sicherzustellen. Überprüfen Sie zusätzlich, dass keine Störung des BD MAX™ Systems gemeldet wurde.

-Die Ergebnisse sind anhand folgender Tabelle zu lesen und auszuwerten:

vanA-Gen (475/520)	vanB-Gen (585/630)	Interne Kontrolle (530/565)	Interpretation
-	-	+	vanA und vanB Negativ
+	+	+/-	vanA and vanB Positiv
+	-	+/-	vanA Positiv, vanB Negativ
-	+	+/-	vanB Positiv, vanA Negativ
-	-	-	Unresolved (UNR) Ungelöstes Testergebnis aufgrund der Präsenz von Hemmsubstanzen in der PCR-Reaktion oder eines allgemeinen (nicht durch einen Fehlercode angezeigten) Problems bei der Probenverarbeitung und/oder den Amplifikationsschritten.
IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Nicht bestimmbares Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines mit einem Fehlercode verbundenen Gerätefehlers angezeigt.
INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Unvollständiges Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines nicht vollständig durchgeführten Durchlaufs angezeigt.

Tabelle 5. Probenauswertung

+: Stattgefundenene Amplifikation

-: Keine Amplifikation

Eine Probe gilt als positiv, wenn der erhaltene Ct-Wert unter 40 liegt. Die Anzeige oder Nicht-Anzeige eines Amplifikationssignals durch die interne Kontrolle ist darauf zurückzuführen, dass eine hohe Kopienzahl der Zielform eine präferenzielle Amplifikation der zielspezifischen Nukleinsäuren anstelle der internen Kontrolle hervorruft. In diesen Fällen ist der Nachweis durch die IK nicht erforderlich.

Eine Probe gilt als negativ, wenn vom Nachweissystem kein Amplifikationssignal in der Probe erfasst wird, die interne Kontrolle jedoch positiv ist. Eine Hemmung der PCR-Reaktion kann durch Amplifikation der internen Kontrolle ausgeschlossen werden.

Im Falle von ungelösten Ergebnissen (UNR) wird bei einem fehlendem Signal durch die interne Kontrolle einer negativen Probe empfohlen, den Assay entsprechend der folgenden Angaben zu wiederholen:

WIEDERHOLUNG DES TESTVEFAHRENS

HINWEIS: Das Probenpufferröhrchen enthält eine ausreichende Menge für einen Wiederholungstest. Für vorbereitete BD MAX Probenpufferröhrchen, die bei 2–8 °C oder 25 °C gelagert wurden, muss die Testwiederholung innerhalb von 24 Stunden erfolgen.



HINWEIS: Neue Proben können im selben Durchlauf wie die Wiederholungsproben getestet werden.

Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Krankengeschichte, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einer Gesundheitsfachkraft bewertet werden.

## 10. Grenzen des Tests

- Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Krankengeschichte, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einer Gesundheitsfachkraft bewertet werden.
- Auch wenn dieser Assay für andere Proben typen verwendet werden kann, wurde er für perianale und/oder rektale Abstriche, die mit dem ESwab™ Transportmedium gewonnen wurden, und Kolonie-Suspensionen validiert.
- Die Testqualität hängt von der Qualität der Probe ab; die Nukleinsäure muss ordnungsgemäß aus perianalen und/oder rektalen Abstrichen und Kolonien extrahiert werden. Eine nicht ordnungsgemäß durchgeführte Entnahme und/oder Beförderung von Proben kann zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
- Es kann eine extrem niedrige Kopienzahl der Zielform unterhalb des Nachweisgrenzwerts nachgewiesen werden, wobei sich die Ergebnisse unter Umständen nicht wiederholen lassen.
- Es besteht die Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund einer Kreuzkontamination mit verdächtigen Vancomycin-Resistenz-Proben, die hohe Konzentrationen der Ziel-DNA enthalten, oder aufgrund einer Kontaminierung durch PCR-Produkte früherer Reaktionen.
- Bei Vorliegen ungelöster (UNR), nicht bestimmbarer (IND) oder unvollständiger (INC) Ergebnisse bei Verwendung des VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kits ist eine Testwiederholung erforderlich. Ungelöste Ergebnisse können aufgrund von Hemmsubstanzen in der Probe oder einer inkorrekten Rehydratation des lyophilisierten Reaktionsmix-Gefäßes entstehen. Nicht bestimmbare oder unvollständige Ergebnisse sind auf eine Gerätestörung zurückzuführen.

## 11. Qualitätskontrolle

In jedem Reaktionsgefäß des VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kits ist eine interne Kontrolle (IK) enthalten, mit der die korrekte Funktionsweise des Tests bestätigt wird.

## 12. Testeigenschaften

### 12.1. Klinische Empfindlichkeit und Spezifität

Die klinische Leistungsfähigkeit des VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kits wurde anhand 216 Proben (mit ESwab™ entnommene frische Rektalproben) von Patienten (Kinder und Erwachsene) mit vermuteter VRE-Infektion untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen eines betriebsinternen Echtzeit-PCR-Assays und Anreicherungskulturen verglichen. Die an das BD MAX™ System angepasste betriebsinterne Echtzeit-PCR eignet sich für den Nachweis von *E. faecalis*, *E. faecium* sowie *vanA*- und *vanB*-Genen.



VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit	Betriebsinterner Echtzeit-PCR-Assay			
		+	-	Gesamt
	+	82*	0	82
	-	0	134	134
Gesamt	82	134	216	

Tabelle 6. Vergleichende Ergebnisse für das vanA-Gen.

\*17/82 mit dem vanA- und vanB-Typ des *Enterococcus faecium* koinfizierte Patienten. Das VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit ermöglicht den gleichzeitigen korrekten Nachweis von vanA- und vanB-Genen in klinischen Proben.

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit	Betriebsinterner Echtzeit-PCR-Assay			
		+	-	Gesamt
	+	53*	1#	54
	-	0	162	162
Gesamt	53	163	216	

Tabelle 7. Vergleichende Ergebnisse für das vanB-Gen.

\* 17/53 mit dem vanA- und vanB--Typ des *Enterococcus faecium* koinfizierte Patienten. Das VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit ermöglicht den gleichzeitigen korrekten Nachweis von vanA- und vanB-Genen in klinischen Proben.

# Diese Probe wurde mittels Ganzgenomsequenzierung (Whole Genome Sequencing, WGS) als Vancomycin-Resistenz-negativ ermittelt.

Folgende Tabelle zeigt die Empfindlichkeits- (SE) und Spezifitäts- (SP) Werte des VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kits im Vergleich zum betriebsinternen Echtzeit-PCR-Assay:

Vancomycin-Resistenz-Gen	SE (%)	SP (%)
vanA	>99,9	>99,9
vanB	>99,9	99,4

Tabelle 8. Empfindlichkeits- (SE) und Spezifitäts- (SP) Werte des VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kits.

Die Ergebnisse zeigen eine hohe Empfindlichkeit und Spezifität des VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kits für den Nachweis von vanA- und vanB-Genen.

## 12.2. Analytische Empfindlichkeit

Das VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit hat eine Nachweisgrenze von  $\geq 4$  koloniebildenden Einheiten (CFU/rxn) für vanA und  $\geq 10$  CFU/rxn für vanB mit einer positiven Rate von  $\geq 95\%$ .





Abbildung 2. Verdünnungsreihe eines *vanA*-Gen-Musters ( $3,62 \cdot 10^4$ – $3,62$  CFU/rxn), durchgeführt mit dem BD MAX™ System (Kanal 475/520 (FAM)).

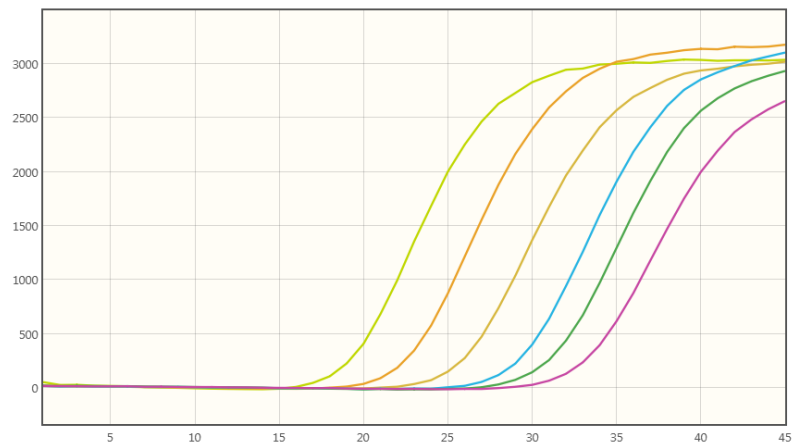
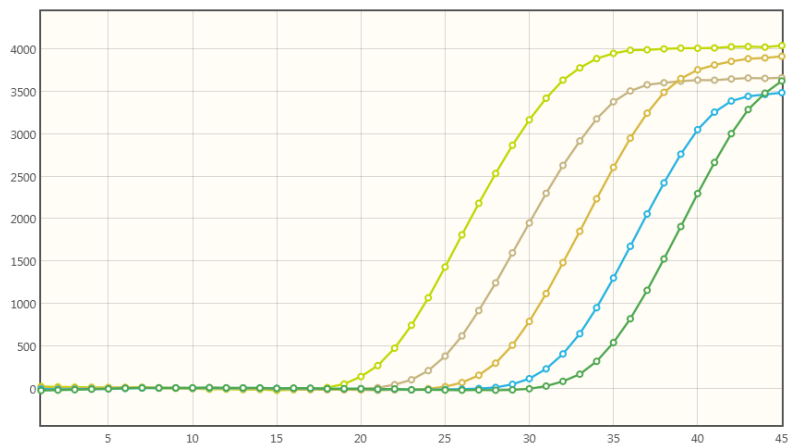


Abbildung 3. Verdünnungsreihe eines *vanB*-Gen-Musters ( $5,65 \cdot 10^4$ – $9,98$  CFU /rxn), durchgeführt mit dem BD MAX™ System (Kanal 585/630 (ROX)).



### 12.3. Analytische Spezifität

Die Spezifität des Vancomycin-Resistenz-Assays wurde durch Testen eines Panels mit unterschiedlichen antibiotikaresistenten Keimen und unterschiedlichen Mikroorganismen, welche die häufigsten enterischen Krankheitserreger bzw. Flora im Darm darstellen, bestätigt. Mit Ausnahme der anvisierten Erreger des jeweiligen Tests wurde zwischen keinem der nachfolgenden untersuchten Mikroorganismen eine Kreuzreaktivität festgestellt.



Test auf Kreuzreaktionen					
Adenovirus Serotypen 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	TEM-1 (nicht-ESBL), SHV-1 (nicht-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) und KPC-2 produzierendes <i>Klebsiella pneumoniae</i> -Isolat	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> vom VanC-Typ	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> vom VanC-Typ	-	Norovirus GI und GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrovirus Genotyp I-VIII	-	<i>Enterococcus faecalis</i> vom VanA-Typ	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> vom VanB-Typ	- / +	Rotavirus A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> vom VanA-Typ	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> vom VanB-Typ	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> vom VanB- und VanC-Typ	- / +	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> vom VanC-Typ	-	<i>Salmonella paratyphi B</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> vom VanC1-Typ	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
VIM-1 produzierendes <i>Citrobacter braakii</i> -Isolat	-	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-	Sapovirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
KPC-3 und VIM-4 produzierendes <i>Citrobacter freundii</i> -Komplex-Isolat	-	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>	-	OXA-48 produzierendes <i>Serratia marcescens</i> -Isolat	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	OXA-244 produzierendes <i>Escherichia coli</i> -Isolat	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	TEM-1 (nicht-ESBL) und IMP-1 produzierendes <i>Escherichia coli</i> -Isolat	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (mecC)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) Stamm N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) Stamm (oxa <sup>R</sup> , PVL-positiv, spa-Typ t310)	-
SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) und OXA-48 produzierendes <i>Enterobacter cloacae</i> -Isolat	-	<i>Helicobacter pylori</i> Clarithromycin-resistent (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
TEM-1 (nicht-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) und NDM-1 produzierendes <i>Enterobacter cloacae</i> -Isolat	-	<i>Helicobacter pylori</i> Clarithromycin-resistent (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
NDM-7 produzierendes <i>Enterobacter cloacae</i> -Komplex-Isolat	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Enterococcus avium</i> vom VanA-Typ	+ / -	SHV-1 (nicht-ESBL), KPC-3 und OXA-48 produzierendes <i>Klebsiella pneumoniae</i> -Isolat	-		

Tabelle 9. Bei dieser Untersuchung verwendete pathogene Referenz-Mikroorganismen.

## 12.4. Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kits auf das vanA-Gen wurde im Hinblick auf folgende Erreger untersucht: *Enterococcus avium* vom vanA-Typ, *Enterococcus faecalis* vom vanA-













Typ (Stämme NCTC 13632, NCTC 12201) und *Enterococcus faecium* vom vanA-Typ (Stämme LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202), wobei die Ergebnisse positiv ausfielen.

Die Reaktivität des VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kits auf das vanB-Gen wurde im Hinblick auf folgende Erreger untersucht: *Enterococcus faecalis* vom vanB-Typ (Stämme ATCC 51299, CECT 8120), *Enterococcus faecium* vom vanB-Typ (Stamm IOWA 2) und *Enterococcus gallinarum* vom vanB- und vanC-Typ (Stamm ENT20120142), wobei die Ergebnisse positiv ausfielen.

### 13. Bibliography/Literaturverzeichnis

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/Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien

 In vitro diagnostic device In-vitro-Diagnostikum	 Keep dry Trocken aufbewahren	 Use by Verfallsdatum	 Manufacturer Hersteller	 Batch code (Lot) Chargennummer (Lot)
 Consult Instructions for Use Siehe Gebrauchsanweisung	 Temperature limitation Temperaturbegrenzung	 Contains sufficient for <n> test Ausreichend für <n> Test(s)	 Sample diluent Probenverdünner	 Catalog number Katalognummer

BD MAX™ is a registered trademark of Becton, Dickinson and Company.  
ESwab™ is a registered trademark of COPAN Diagnostics Inc.





**CerTest Biotec, S.L.**

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1  
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)  
[www.certest.es](http://www.certest.es)



VIASURE online

F-362 Rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest  
BIOTEC