

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

Vancomycin resistance

Handbook for the following references/
Manuale per i seguenti riferimenti:

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

BD REF 444202

to be used with the BD MAX™ System
da utilizzare con il 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°C for up to 24 hours, 2 to 8°C for up to 144 hours (6 days) or frozen at -20°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 μL 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 μL nuclease free water. Ensure complete mixing by vortexing. Add 10 μL 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	680/715
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.

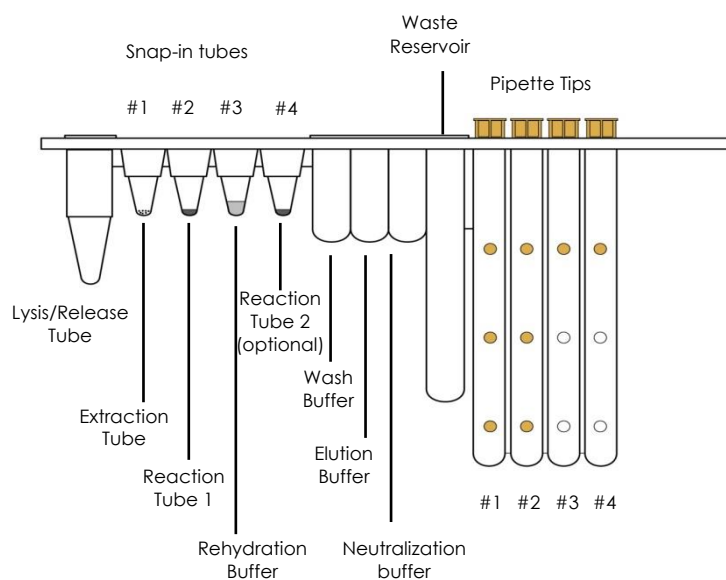
8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 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:

vanA gene (475/520)	vanB gene (585/630)	Internal control (530/565)	Interpretation
-	-	+	vanA and vanB Negative
+	+	+/-	vanA and vanB Positive
+	-	+/-	vanA Positive, vanB Negative
-	+	+/-	vanB Positive, vanA Negative
-	-	-	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.
IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

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.



VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit	In-house real-time PCR assay		
		+	-
+	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 (%)
vanA	>99.9	>99.9
vanB	>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 ≥ 4 colony-forming unit per reaction (CFU/rxn) for vanA and ≥ 10 CFU/rxn for vanB with a positive rate of $\geq 95\%$.



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

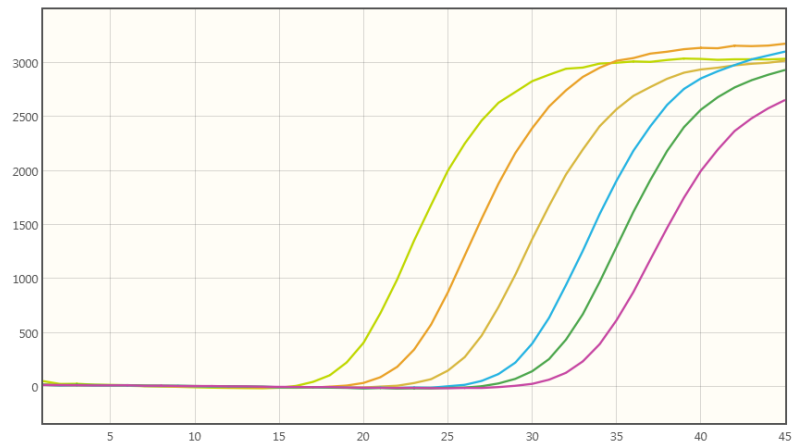
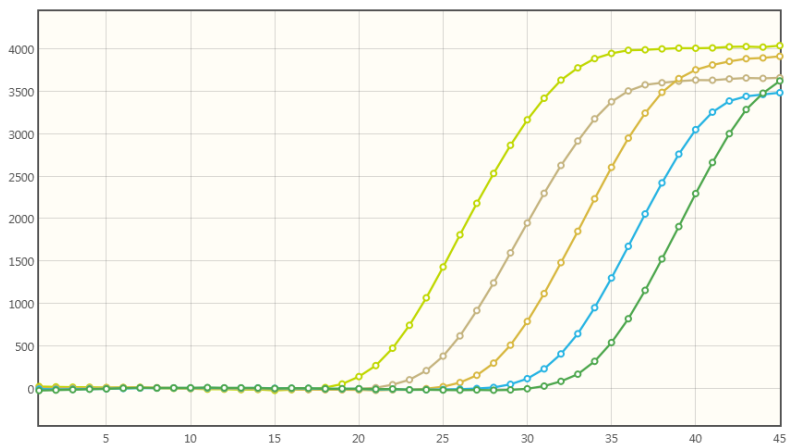


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene (5.65×10^4 - 9.98 CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



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 pneumoniae</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</i> A	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	VanC – type <i>Enterococcus gallinarum</i>	-	<i>Salmonella paratyphi</i> B	-
<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>	-	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 ^R , 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 pneumoniae</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.



ITALIANO

1. Uso previsto

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit è realizzato per il rilevamento e la differenziazione specifica dei geni *vanA* e *vanB* associati agli enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) direttamente su colonie e tamponi perianali e/o rettali. L'uso previsto di questo test è quello di facilitare l'identificazione degli organismi vancomicina-resistenti in combinazione con i segni clinici e i sintomi del paziente e i fattori di rischio epidemiologico. Questo test utilizza il sistema BD MAX™ per l'estrazione automatica del DNA e successivamente del PCR in tempo reale, utilizzando i reagenti forniti insieme ai reagenti universali e monouso del sistema BD MAX™. Il DNA viene estratto dalle colonie e dai tamponi perianali e/o rettali utilizzando sonde marcate da un colorante fluorescente specifico per i geni *vanA* e *vanB*.

2. Introduzione e spiegazione

Gli enterococchi sono organismi commensali comuni che si trovano nel tratto gastrointestinale e nei genitali femminili. Recentemente sono stati riconosciuti come agenti patogeni opportunisti che causano infezioni nosocomiali come infezioni del tratto urinario, infezioni della pelle, infezioni respiratorie, endocarditi e sepsi in soggetti immunocompromessi.

La vancomicina è un antibiotico glicopeptidico che inibisce la sintesi della parete cellulare e viene utilizzato per trattare le infezioni gravi da batteri Gram-positivi. Gli enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) sono stati descritti per la prima volta in Inghilterra e in Francia nel 1986 e sono oggi diffusi negli ospedali di tutto il mondo.

La resistenza alla vancomicina è un processo complesso e richiede la presenza di diversi cluster di geni. Principalmente possono essere suddivisi in due tipologie, sulla base dei precursori pentapeptidi prodotti dai geni resistenti alla vancomicina: il precursore che termina in D-Alanina-D-Serina (tipo VanC, VanE, VanG, VanL e VanN) e quello che termina in D-Alanina-D-Lattato (tipo VanA, VanB, VanD e VanM). Questi precursori pentapeptidi hanno mostrato una bassa affinità per i glucopeptidi, conferendo così la resistenza alla vancomicina negli enterococchi.

Il primo tipo di resistenza alla vancomicina negli enterococchi è una resistenza di tipo intrinseco (associata cioè al gene *vanC*). Isolati di *Enterococchi gallinarum* e di *E. casseliflavus/E. flavescens* hanno mostrato una resistenza intrinseca di basso livello alla vancomicina. Il secondo tipo è una resistenza di tipo acquisito (associata cioè ai geni *vanA* o *vanB*). In questo tipo gli enterococchi possono diventare resistenti tramite l'acquisizione di elementi genetici mobili (trasposoni e plasmidi) provenienti da un'altra specie di *Enterococchi* o da un altro organismo. Più comunemente, questa resistenza viene osservata negli *E. faecium* ed *E. faecalis*, ma è stata riconosciuta anche in *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* e altre specie di enterococchi. I geni *vanA* e *vanB* sono responsabili di una resistenza alla vancomicina alta o moderata.

La trasmissione degli enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) può verificarsi attraverso un contatto diretto con i fluidi corporei da pazienti colonizzati o infetti (sangue, drenaggio delle ferite, urina, feci, saliva e altro) oppure attraverso un contatto indiretto attraverso le mani degli operatori sanitari o le superfici e gli strumenti dei pazienti contaminati.



Inizialmente, il metodo di rilevamento applicato si basava sulle tecniche di coltura, una tecnica molto lunga che richiedeva da uno a cinque giorni per essere completata. I campioni di PCR in tempo reale si sono dimostrati essere uno strumento migliore per il rilevamento di geni clinicamente rilevanti associati alla resistenza alla vancomicina.

3. Principi del procedimento

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit è realizzato per identificare e differenziare il DNA dagli enterococchi vancomicina-resistenti e dagli altri organismi portatori dei geni *vanA* e *vanB* resistenti alla vancomicina. Dopo l'isolamento del DNA, si esegue l'identificazione della resistenza alla vancomicina attraverso l'amplificazione di una regione conservata dei geni *vanA* e *vanB*, utilizzando primer specifici e una sonda marcata a fluorescenza.

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit si basa sull'attività esonucleasica 5' della DNA polimerasi. Durante l'amplificazione del DNA, questo enzima idrolizza la sonda legata alla sequenza complementare di DNA, separando il quencher dal marcatore. Questa reazione genera un aumento del segnale fluorescente proporzionale alla quantità del DNA bersaglio. Questa fluorescenza può essere misurata sul sistema BD MAX™.

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene in ciascuna provetta tutti i componenti necessari per un campione di PCR in tempo reale (primer/sonde specifici, dNTPS, tampone, polimerasi) in formato stabilizzato e un controllo interno per monitorare l'inibizione della PCR. I geni *vanA* vengono amplificati e individuati nel canale 475/520, i geni *vanB* nel canale 585/630 e il controllo interno (CI) nel canale 530/565.

4. Reagenti forniti

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit include i materiali e i reagenti indicati nella Tabella 1:

Riferimento	Reagente/Materiale	Descrizione	Colore	Quantità
VS-VAN112	<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube (Provetta di reazione <i>Vancomycin resistance</i>)	Una miscela di enzimi, sonde primer, tampone, dNTP, stabilizzatori e controllo interno in un formato stabilizzato	Trasparente Sigillo blu	2 confezioni da 12 provette
VS-RB08	Rehydration Buffer tube (Provetta tampone reidratazione)	Soluzione per ricostituire il prodotto stabilizzato	Trasparente Sigillo ruggine	1 confezione da 24 provette

Tabella 1. Reagenti e materiali forniti nel VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit con codice VS-VAN124.

5. Reagenti e strumenti necessari e non inclusi

Il seguente elenco include i materiali e gli strumenti richiesti per l'uso e che non sono inclusi nel VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Strumenti per la PCR in tempo reale: BD MAX™ System.



- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref:442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipette (tra i 2 e i 1000 µL).
- Acqua esente da nucleasi.
- Punte con filtro.
- Guanti monouso privi di talco.

6. Condizioni di trasporto e conservazione

- I kit possono essere spediti e conservati a 2-40 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Dopo la loro apertura, le confezioni che contengono le provette di reazione possono essere utilizzate fino a un massimo di 28 giorni.

7. Precauzioni per gli utenti

- Per uso diagnostico professionale *in vitro*.
- Non utilizzare reagenti e/o materiali scaduti.
- Non utilizzare il kit se l'etichetta che sigilla la scatola esterna è rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la scatola protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la confezione protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'interno della loro confezione il materiale essiccante non è presente o è rotto.
- Non rimuovere il materiale essiccante dalla confezione dei reagenti.
- Chiudere la confezione protettiva dei reagenti con la cerniera subito dopo ogni utilizzo. Rimuovere l'aria in eccesso dalle confezioni prima di sigillarle.
- Non utilizzare reagenti se il sigillo metallico è rotto o danneggiato.
- Non mescolare reagenti di diverse confezioni e/o kit e/o lotti.
- Proteggere i reagenti dall'umidità.
- Tenere i componenti lontano dalla luce.
- Nel caso in cui vengano eseguiti altri test di PCR nella stessa area del laboratorio, assicurarsi che il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, BD MAX™ ExK™ TNA-2 kit, i reagenti aggiuntivi richiesti per il test e il sistema BD MAX™ non siano contaminati. È necessario cambiarsi i guanti prima di manipolare reagenti e cartucce.
- Disegnare un flusso unidirezionale. Deve iniziare nell'area di estrazione e poi spostarsi nell'area di amplificazione e rilevamento. Non riportare campioni, strumenti e reagenti nell'area in cui è stato eseguito il passaggio precedente.
- Rispettare le buone pratiche di laboratorio. Indossare abiti protettivi e utilizzare guanti monouso, occhialini e mascherina. Non mangiare, bere o fumare all'interno dell'area di lavoro. Lavarsi le mani al termine del test.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come i reagenti e i materiali che sono stati esposti ai campioni e devono essere gestiti nel rispetto delle normative di sicurezza nazionali. Prendere le precauzioni necessarie durante la raccolta, la conservazione, il trattamento e lo smaltimento dei campioni.



- Si raccomanda una decontaminazione degli strumenti utilizzati abitualmente, soprattutto le micropipette e le superfici di lavoro.
- Consultare il manuale utente del sistema BD MAX™ per maggiori informazioni su avvertenze, precauzioni e procedure.

8. Procedura del test

8.1. RACCOLTA, CONSERVAZIONE E TRASPORTO DEI CAMPIONI

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit è stato convalidato su tamponi perianali e/o rettali poste immediatamente nel mezzo di trasporto ESwab™ (sistema di trasporto e raccolta a base di liquido tipo Amies) (Copan, Italia). Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit è stato convalidato anche su sospensione di colonie.

La raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni devono rispettare le condizioni convalidate dall'utente.

In generale, i tamponi perianali e/o rettali devono essere raccolti ed etichettati adeguatamente in un mezzo di trasporto ESwab™ pulito ed esaminato il prima possibile per garantire la qualità del test. I campioni devono essere trasportati nel rispetto delle normative locali e nazionali per il trasporto di materiale patogeno. Per i trasporti di lunga durata (oltre 24 ore), raccomandiamo una spedizione a ≤ -20 °C. I campioni possono essere conservati a 25 °C fino a 24 ore, da 2 a 8 °C fino a 144 ore (6 giorni) o congelati a -20 °C fino a 196 ore (8 giorni). Devono essere evitati cicli ripetuti di congelamento-scongelo per prevenire il deterioramento dei campioni e degli acidi nucleici.

8.2. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE ED ESTRAZIONE DEL DNA

Preparare il campione nel rispetto delle raccomandazioni presenti nelle istruzioni d'uso del kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-2. Si prega di notare che altri tipi di campioni possono richiedere un pretrattamento. Le procedure di preparazione dell'estrazione per applicazioni specifiche devono essere sviluppate e convalidate dall'utente.

1. Copan ESwab™: Pipettare 200 μ L di campione ESwab™ in una provetta di campione del kit BD MAX™ TNA-2 e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Assicurarsi una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con il BD MAX™ System Operation.
2. Colonie: Raccogliere due colonie dal mezzo di coltura e sospenderle in 500 μ L di acqua esente da nucleasi. Assicurarsi una miscelazione completa utilizzando il vortex. Aggiungere 10 μ L di sospensione in una provetta di campione del kit BD MAX™ TNA-2 e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Assicurarsi una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con il BD MAX™ System Operation.

8.3. PROTOCOLLO PCR

Nota: Consultare il manuale utente del sistema BD MAX™ per istruzioni dettagliate.

8.3.1. Creare il programma di test di PCR per il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit



Nota: Se avete già creato il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection test, potete saltare il passaggio 8.3.1 e passare direttamente all'8.3.2.

- 1) Sulla schermata "Run" (Esegui) del BD MAX™ System, selezionare la scheda "Test Editor" (Modifica test).
- 2) Cliccare sul pulsante "Create" (Crea).
- 3) Nella finestra "Test Name" (Nome test), nominare il vostro test: es. VIASURE *Vancomycin resistance*.
- 4) Nel menu a tendina "Extraction Type" (Tipo di estrazione), selezionare "ExK TNA-2".
- 5) Nel menu a tendina "Master Mix Format" (Formato master mix), scegliere "Type 5" (Tipo 5).
 - b. Nota: Il prodotto può essere utilizzato in combinazione con un test aggiuntivo VIASURE per BD MAX. In questo caso selezionare "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato master mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5).
- 6) In "Sample extraction parameters" (Parametri di estrazione campione) selezionare "User defined" (Utente definito) e regolare il volume del campione a 500 µL.
- 7) In "Ct Calculation" (Calcolo Ct) selezionare "Call Ct at Threshold Crossing" (Chiamare Ct al superamento del limite).
- 8) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni PCR) inserire i seguenti parametri: "Channel Settings" (Impostazioni canale), "Gains" (Guadagni) e "Threshold" (Limite) (Tabella 2).
 - a. Nota: Il prodotto può essere utilizzato in combinazione con un test aggiuntivo VIASURE per BD MAX. In questo caso "PCR Settings" (Impostazioni PCR) e "Test Steps" (Fasi del test) devono essere completate per entrambe le posizioni 2 (verde) e 4 (blu).

Channel (Canale)	Alias	Gain (Guadagno)	Threshold (Limite)	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

Tabella 2. Impostazioni di PCR.

- 9) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni di PCR) inserire anche i seguenti parametri "Spectral Cross Talk" (Cross talk spettrale) (Tabella 3):

		False Receiving Channel (Canale di ricezione falso)					
		Canale	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canale di eccitamento)	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	-	

Tabella 3. Parametri "Spectral cross-talk" (Cross-talk spettrale).



10) Nella scheda "Test Steps" (Fasi test), inserire il protocollo PCR (Tabella 4).

Step Name (Nome fase)	Profile Type (Tipo profilo)	Cycles (Cicli)	Time (s) (Volta)	Temperature (Temperatura)	Detect (Rilevare)
Initial denaturation (Denaturazione iniziale)	Hold	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturazione e annerimento/Estensione (Raccolta dati))	2-Temperature	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabella 4. Protocollo PCR.

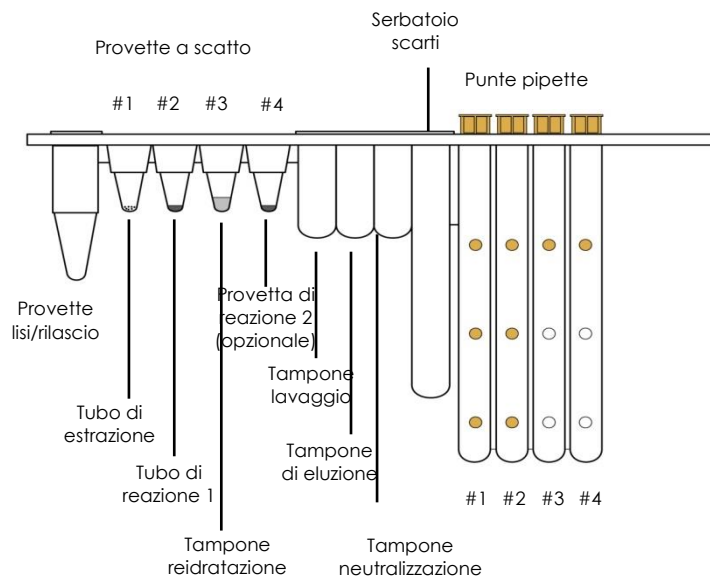
11) Cliccare sul tasto "Save Test" (Salva test).

8.3.2. Preparazione della griglia BD MAX™

- 1) Per ogni campione da testare, rimuovere una striscia di reagente individuale dal BD MAX™ ExK TNA-2 kit. Picchiettare delicatamente ogni striscia su una superficie dura per assicurarsi che tutti i liquidi si trovino sul fondo della provetta, quindi posizionarle sulla griglia del BD MAX™ System.
- 2) Rimuovere il numero richiesto di provette di estrazione BD MAX™ ExK TNA (B4) (sigillo bianco) dalla loro confezione protettiva. Posizionare la(e) provetta(e) di estrazione (sigillo bianco) nelle posizioni corrispondenti sulla striscia di TNA (posizione 1, codifica di colore bianco sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
- 3) Determinare e separare il numero appropriato di VIASURE *Vancomycin resistance* reaction tubes (sigillo blu) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 2, codifica di colore verde sulla griglia. Vedere Figura 1).
 - a. Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
 - b. Per effettuare una corretta reidratazione, assicurarsi che il prodotto liofilizzato si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica.
 - i. Nota: Se scegliete il formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato Master Mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5) (paragrafo 8.3.1), determinare e separare il numero appropriato di provette di reazione VIASURE (sigillo diverso) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 4, codifica di colore blu sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
- 4) Rimuovere il numero richiesto di Rehydration Buffer tubes (sigillo ruggine) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 3, nessuna codifica di colore sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
 - a. Per effettuare un trasferimento corretto, assicurarsi che il liquido si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica.



Figura 1. Striscia di reagente BD MAX™ TNA (TNA) dal BD MAX™ ExK TNA-2 kit.



8.3.3. Configurazione dello strumento BD MAX™

- 1) Selezionare la scheda "Work List" (Lista di lavoro) sulla schermata "Run" (Esegui) del software BD MAX™ System nella versione v4.50A o superiore.
- 2) Nel menu a tendina "Test" selezionare VIASURE *Vancomycin resistance* (se non è ancora stato creato, vedere paragrafo 8.3.1).
- 3) Selezionare il numero relativo al lotto del kit (si trova sulla confezione esterna del kit di estrazione utilizzato) dal menu a tendina (opzionale).
- 4) Inserire il numero identificativo della provetta di tampone campione nella finestra "Sample tube" (Provetta campione) dalla "Worklist" (Lista di lavoro), manualmente oppure scansionando il codice a barre.
- 5) Compilare il codice campione/paziente e/o la finestra "Accession" (Ingresso) nella "Worklist" (Lista di lavoro) e cliccare sul pulsante "Save" (Salva). Continuare fino all'inserimento di tutte le provette di tampone campione. Assicurarsi che il codice campione/paziente e le provette di tampone campione corrispondano.
- 6) Posizionare la provetta di tampone campione preparata sulla griglia del BD MAX™.
- 7) Caricare la griglia sul BD MAX™ System (la griglia A si trova sul lato sinistro del BD MAX™ System, la griglia B sul lato destro).
- 8) Posizionare il numero richiesto di BD MAX™ PCR Cartridge(s) nel BD MAX™ System.
- 9) Chiudere la porta del BD MAX™ System.
- 10) Cliccare "Start Run" (Inizia operazione) per iniziare la procedura.

8.3.4 Report BD MAX™

- 1) Nel menu principale, cliccare sul pulsante "Results" (Risultati).
- 2) Cliccare due volte sul test in corso nella lista oppure premere il pulsante "View" (Vedi).



- 3) Cliccare su "Print" (Stampa), selezionare: "Run Details, Test Details and Plot..." (Dettagli operazione, dettagli test e grafico...)
- 4) Cliccare su "Print or Export button" (Stampa o esporta) nella schermata "Run Reports" (Esegui report)

9. Interpretazione dei risultati

Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, fare riferimento al manuale utente del sistema BD MAX™.

L'analisi dei dati viene svolta dal software del sistema BD MAX™, sulla base delle istruzioni del produttore. Il software del sistema BD MAX™ riporta i valori di Ct e le curve di amplificazione per tutti i canali di rilevazione di ciascun campione testato nel seguente modo:

- Valore di Ct pari a 0: indica che il software non ha calcolato nessun valore di Ct nei limiti specificati (vedere Tabella 2). La curva di amplificazione del campione che presenta un valore di Ct pari a 0 deve essere controllata manualmente.
- Valore di Ct pari a -1: non si è verificato nessun processo di amplificazione.
- Qualunque altro valore di Ct deve essere interpretato in correlazione con la curva di amplificazione e nel rispetto delle linee guida di interpretazione del campione riportate nella Tabella 5.

Controllare l'emissione del segnale di controllo interno per verificare il corretto funzionamento della miscela di amplificazione. Inoltre, controllare che non sia presente nessun guasto al BD MAX™ System.

I risultati devono essere letti e analizzati utilizzando la seguente tabella:

Gene vanA (475/520)	Gene vanB (585/630)	Controllo interno (530/565)	Interpretazione
-	-	+	vanA e vanB negativi
+	+	+/-	vanA e vanB positivi
+	-	+/-	vanA positivo, vanB negativo
-	+	+/-	vanB positivo, vanA negativo
-	-	-	Un risultato non risolto (UNR) ottenuto in presenza di inibitori nella reazione PCR o quando si verifica un problema generale (non segnalato da un codice di errore) con le fasi di elaborazione del campione e/o di amplificazione.
IND	IND	IND	Risultato test indeterminato (IND). Dovuto a guasto nel sistema BD MAX™. Visualizzazione del risultato del test in caso di guasto dello strumento collegato ad un codice di errore.
INC	INC	INC	Risultato test incompleto (INC). Dovuto a guasto nel sistema BD MAX™. Visualizzazione del risultato del test in caso di mancato completamento del test.

Tabella 5. Interpretazione del campione

+: Curva di amplificazione presente

-: Senza curva di amplificazione



Un campione viene considerato positivo se il valore ottenuto di Ct è inferiore a 40. Il controllo interno a volte può non mostrare un segnale di amplificazione a causa di un elevato numero di copie del bersaglio, che causa un'amplificazione preferenziale degli acidi nucleici specifici al posto del controllo interno. In questi casi, non è necessario il rilevamento del CI.

Un campione viene considerato negativo se non mostra un segnale di amplificazione nel sistema di rilevamento ma il controllo interno è positivo. Un'inibizione della reazione di PCR può essere esclusa dall'amplificazione del controllo interno.

In caso di risultati non risolti (UNR) con assenza di un segnale di controllo interno in un campione negativo, è raccomandabile ripetere il test seguendo queste indicazioni:

RIPETERE LA PROCEDURA DEL TEST

NOTA: Il volume contenuto nella provetta di tampone campione è sufficiente per ripetere un test. Per le provette preparate di tampone campione BD MAX conservate a 2-8 °C, il nuovo test deve essere eseguito entro 24 ore.

NOTA: I nuovi campioni possono essere testati nella stessa operazione con campioni ripetuti.

I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.

10. Limiti del test

- I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.
- Nonostante questo test possa essere utilizzato con altri tipi di campioni, è stato convalidato con tamponi raccolti utilizzando il mezzo di trasporto ESwab™ e con sospensioni di colonie.
- La qualità del test dipende dalla qualità del campione: gli acidi nucleici devono essere estratti in modo appropriato da colonie e tamponi perianali e/o rettali. Una raccolta, conservazione e/o trasporto inadatti dei campioni possono portare a falsi negativi.
- Possono essere rilevati livelli estremamente bassi al di sotto del limite di rilevamento, ma i risultati non possono essere riproducibili.
- Esiste la possibilità di falsi positivi a causa della contaminazione incrociata con campioni con sospetta resistenza alla vancomicina, a causa di concentrazioni elevate di DNA bersaglio oppure di contaminazione dovuta ai prodotti della PCR di reazioni precedenti.
- È richiesto un nuovo test nel caso in cui si ottengano risultati non risolti, indeterminati o incompleti utilizzando il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit. I risultati non risolti possono essere dovuti alla presenza di inibitori nel campione o ad una reidratazione incorretta della provetta di miscelazione di reazione liofilizzata. Un danno agli strumenti può comportare risultati indeterminati o incompleti.



11. Controllo di qualità

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene un controllo interno (CI) in ogni provetta di reazione, che conferma il funzionamento corretto della tecnica.

12. Caratteristiche del test

12.1. Sensibilità e specificità clinica

Le prestazioni cliniche del VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit sono state testate utilizzando 216 campioni (campioni rettali freschi raccolti con ESwab™) da pazienti (neonati e adulti) con una sospetta infezione da VRE. Questi risultati sono stati poi confrontati con quelli ottenuti nei test in-house di PCR in tempo reale e nelle colture di arricchimento. La PCR in-house in tempo reale adattata al sistema BD MAX™ ha rilevato gli *E. faecalis*, gli *E. faecium* e i geni *vanA* e *vanB*.

		Test in-house di PCR in tempo reale		
		+	-	Totale
VIASURE <i>Vancomycin resistance</i> Real Time PCR Detection Kit	+	82*	0	82
	-	0	134	134
	Totale	82	134	216

Tabella 6: Risultati comparativi per il gene *vanA*.

*17/82 pazienti presentano una coinfezione da *Enterococcus faecium* con genotipo *vanA* e *vanB*. Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit è in grado di rilevare correttamente in simultanea i geni *vanA* e *vanB* nei campioni clinici.

		Test in-house di PCR in tempo reale		
		+	-	Totale
VIASURE <i>Vancomycin resistance</i> Real Time PCR Detection Kit	+	53*	1#	54
	-	0	162	162
	Totale	53	163	216

Tabella 7: Risultati comparativi per il gene *vanB*.

*17/53 pazienti presentano una coinfezione da *Enterococcus faecium* con genotipo *vanA* e *vanB*. Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit è in grado di rilevare correttamente in simultanea i geni *vanA* e *vanB* nei campioni clinici.

Questo campione è risultato negativo alla resistenza alla vancomicina utilizzando l'analisi Whole Genome Sequencing (WGS).

La seguente tabella mostra il confronto tra i valori di sensibilità (SE) e specificità (SP) del VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit e del test in-house di PCR in tempo reale:



Geni resistenti alla vancomicina	SE (%)	SP (%)
vanA	>99,9	>99,9
vanB	>99,9	99,4

Tabella 8. Valori di sensibilità (SE) e specificità (SP) del VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

I risultati mostrano elevate sensibilità e specificità nella rilevazione dei geni *vanA* e *vanB* utilizzando il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilità analitica

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit presenta un limite di rilevamento di ≥ 4 unità formanti colonie per ogni reazione (CFU/rxn) per il gene *vanA* e di ≥ 10 CFU/rxn per il gene *vanB* con un tasso positivo $\geq 95\%$.

Figura 2. Serie di diluizioni del gene *vanA* ($3,62 \cdot 10^4$ - $3,62$ CFU/rxn) realizzata sul sistema BD MAX™ (canale 475/520 (FAM)).

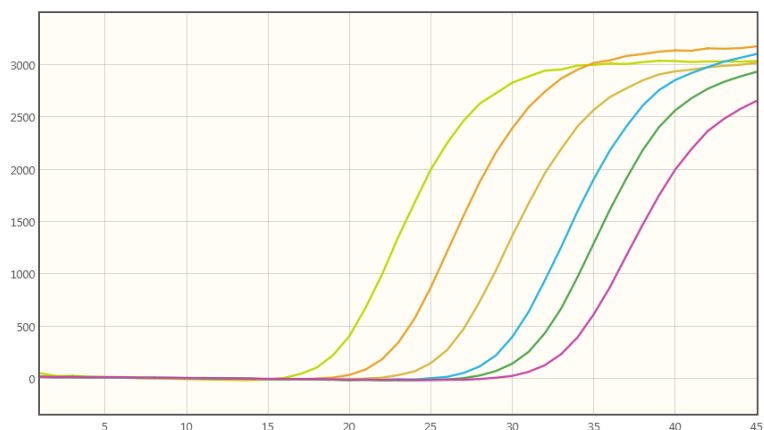
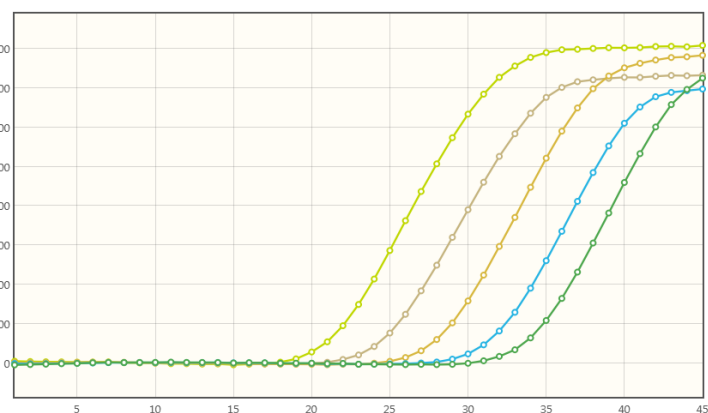


Figura 3. Serie di diluizioni del gene *vanB* ($5,65 \cdot 10^4$ - $9,98$ CFU/rxn) realizzata sul sistema BD MAX™ (canale 585/630 (ROX)).



12.3. Specificità analitica

La specificità del test di resistenza alla vancomicina è stata confermata testando un pannello formato da diversi organismi resistenti agli antimicrobici e da diversi microrganismi che rappresentano i più comuni patogeni enterici



della flora presente nell'intestino. Non è stata rilevata alcuna reattività incrociata tra i seguenti microrganismi testati, a eccezione dei patogeni bersaglio di ciascun test:

Test di reattività incrociata					
Sierotipi di adenovirus 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) e KPC-2 che generano un isolato di <i>Klebsiella pneumonia</i>	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> di tipo VanC	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> di tipo VanC2	-	Norovirus GI e GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrovirus genotipo I-VIII	-	<i>Enterococcus faecalis</i> di tipo VanA	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> di tipo VanB	- / +	Rotavirus A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> di tipo VanA	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> di tipo VanB	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> di tipo VanB e VanC	- / +	<i>Salmonella paratyphi</i> A	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> di tipo VanC	-	<i>Salmonella paratyphi</i> B	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> di tipo VanC1	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Escherichia coli</i> enteroemorragico	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
VIM-1 che genera un isolato di <i>Citrobacter braakii</i>	-	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasivo	-	Sapovirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Escherichia coli</i> enteropatogeno	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
KPC-3 e VIM-4 che generano un isolato di complesso di <i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Escherichia coli</i> enterotossigeno	-	OXA-48 che genera un isolato di <i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	OXA-244 che genera un isolato di <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	TEM-1 (non-ESBL) e IMP-1 che generano un isolato di <i>Escherichia coli</i>	-	<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>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente alla meticillina (mecC)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente alla meticillina (MRSA) ceppo N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente alla meticillina (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente alla meticillina (MRSA) ceppo (oxa ^R , positivo a PVL, tipo spa t310)	-
SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) e OXA-48 che generano un isolato di <i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i> resistente alla claritromicina (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) e NDM-1 che generano un isolato di <i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i> resistente alla claritromicina (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
NDM-7 che genera un isolato del complesso di <i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Enterococcus avium</i> genotipo VanA	+ / -	SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 e OXA-48 che generano un isolato di <i>Klebsiella pneumonia</i>	-		

Tabella 9. Microrganismi patogeni di riferimento utilizzati in questo studio.



12.4. Reattività analitica











La reattività di VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit per il gene *vanA* è stata valutata sulla base dei ceppi dell'*Enterococcus avium* di tipo *vanA*, dell'*Enterococcus faecalis* di tipo *VanA* (NCTC 13632, NCTC 12201) e dell'*Enterococcus faecium* di tipo *VanA* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202), mostrando risultati positivi.

La reattività di VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit per il gene *vanB* è stata valutata sulla base dei ceppi dell'*Enterococcus faecalis* di tipo *vanB* (ATCC 51299, CECT 8120), dell'*Enterococcus faecium* di tipo *vanB* (IOWA 2) e dell'*Enterococcus gallinarum* di tipo *vanB* e *vanC* (ENT20120142), mostrando risultati positivi.

13. Bibliography/Bibliografia

1. B. Mirzaei et al. Detection of both *vanA* & *vanB* genes in *vanA* phenotypes of Enterococci by TaqMan 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/Simboli per reagenti e componenti IVD

 In vitro diagnostic device Dispositivo per uso diagnostico <i>in vitro</i>	 Keep dry Mantenere asciutto	 Use by Usare entro	 Manufacturer Produttore	 Batch code (Lot) Codice lotto (Lot)
 Consult Instructions for Use Consultare le istruzioni per l'uso	 Temperature limitation Limitazione temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contenuto sufficiente per <n> test	 Sample diluent Diluyente	 Catalog number Numero catalogo

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



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC