

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

Vancomycin resistance

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

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

BD REF 444202

to be used with the BD MAX™ System
para ser utilizado con el sistema BD MAX™



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.

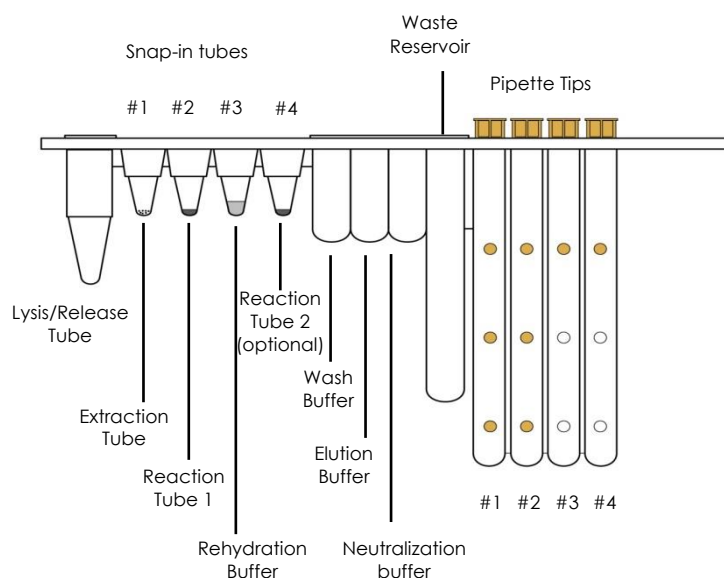
8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 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).

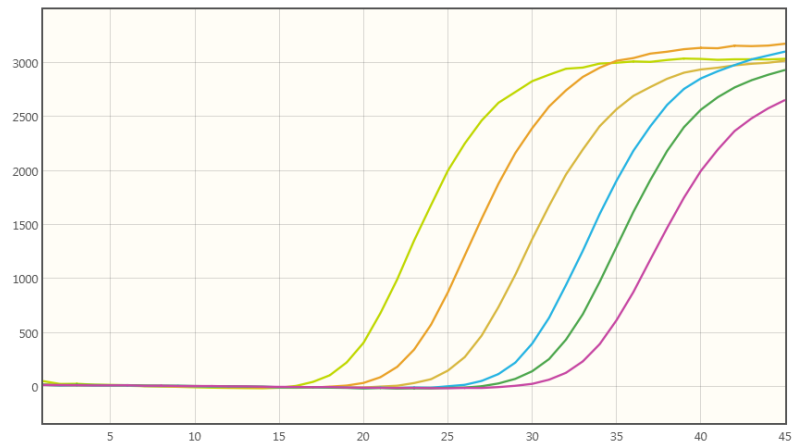
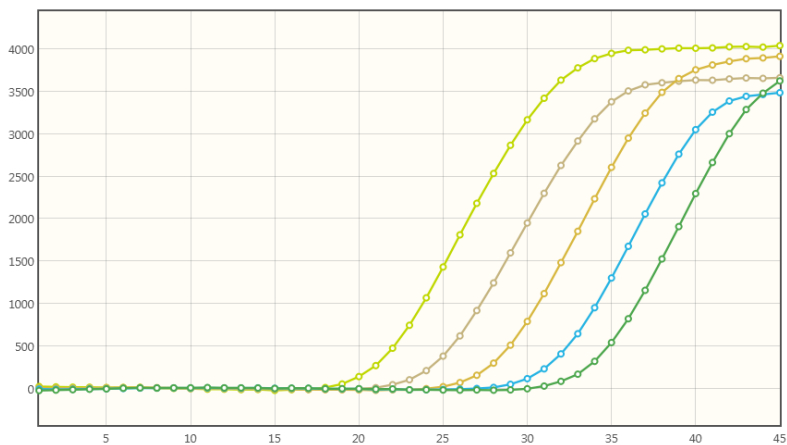


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene (5.65×10^4 - 9.98 CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



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 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>	-	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.



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección y diferenciación específica de los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a vancomicina (ERV) directamente a partir de hisopos perianales y/o rectales y colonias. El uso previsto del test es facilitar la identificación de organismos resistentes a la vancomicina en combinación con los signos y síntomas clínicos del paciente y los factores de riesgo epidemiológico. Este test utiliza el sistema BD MAX™ para llevar a cabo la extracción del DNA y posterior PCR a tiempo real utilizando los reactivos suministrados junto con los reactivos universales y desechables del sistema BD MAX™. El DNA extraído a partir de hisopos perianales y/o rectales y colonias, es detectado utilizando una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar los genes *vanA* y *vanB*.

2. Introducción y explicación

Los enterococos son organismos comensales comunes que se encuentran en el tracto gastrointestinal y en los genitales femeninos. Recientemente se les reconoce como patógenos oportunistas que causan infecciones nosocomiales como infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel, infecciones respiratorias, endocarditis y sepsis en individuos inmunocomprometidos.

La vancomicina es un antibiótico glucopéptido que inhibe la síntesis de la pared celular y se usa para tratar infecciones graves por bacterianas gram-positivas. Los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) se describieron por primera vez en Inglaterra y Francia en 1986, habiéndose extendido en la actualidad a través de los hospitales de todo el mundo.

La resistencia a la vancomicina es un proceso complejo y necesita la presencia de diferentes clusters de genes. Principalmente, se pueden dividir en dos tipos dependiendo atendiendo a los precursores pentapéptidos producidos por genes de resistencia a la vancomicina; el precursor que termina en D-Alanina-D-Serina (VanC-, VanE-, VanG-, VanL- y VanN-type) o el que termina en D-Alanine-D-Lactate (VanA-, VanB-, VanD- y VanM- tipo). Estos precursores pentapéptidos muestran una baja afinidad por los glucopéptidos, confiriendo así la resistencia a la vancomicina en los enterococos.

El primer tipo de resistencia a la vancomicina en los enterococos se considera resistencia intrínseca (ej. Asociada con el gen *vanC*). Aislados de *Enterococcus gallinarum* y *E. casseliflavus/E. flavescens* muestran esta resistencia inherente a la vancomicina de bajo nivel. Mientras que, el segundo tipo es la resistencia adquirida (ej. relacionada con los genes *vanA* o *vanB*). En este caso, los enterococos pueden volverse resistentes mediante la adquisición de elementos genéticos móviles (transposones y plásmidos) de otra especie de *Enterococcus* u organismo. Más comúnmente, esta resistencia se observa en *E. faecium* y *E. faecalis*, pero también se ha reconocido en *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* y otras especies de enterococos. Los genes *vanA* y *vanB* son responsables de una resistencia a la vancomicina alta o moderada.

La transmisión de enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) puede ocurrir por contacto directo con fluidos corporales de pacientes colonizados o infectados (sangre, drenaje de heridas, orina, heces, esputo y otros) o por contacto indirecto a través de las manos de los trabajadores de la salud, o a través de equipos de cuidado de pacientes o superficies ambientales contaminadas.



Inicialmente, el método de detección más comúnmente aplicado se basó en técnicas de cultivo, que conllevan mucho tiempo y generalmente toman de uno a cinco días para completarse. Para acortar el tiempo de detección y mejorar la sensibilidad, los ensayos de PCR en Tiempo Real han demostrado ser una herramienta para la detección de genes clínicamente relevantes asociados con la resistencia a la vancomicina.

3. Procedimiento

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación del DNA que codifica los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) y otros organismos portadores de estos genes que confieren resistencia a la vancomicina. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de la resistencia a vancomicina se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes *vanA* y *vanB*.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en el equipo BD MAX™.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la amplificación, el gen *vanA* se detecta en el canal 475/520, el gen *vanB* se detecta en el canal 585/630 y el control interno (CI) se detecta en el canal 530/565.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1:

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-VAN112	<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Transparente Sellado Azul	2 sobres de 12 tubos
VS-RB08	Rehydration Buffer tube	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Transparente Sellado óxido	1 sobre de 24 tubos

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit con Ref.VS-VAN124.

5. Reactivos y equipos requeridos y no suministrados

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

- Equipo de PCR a tiempo real: BD MAX™ System.
- Kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref: 442826)



- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519)
- Vórtex.
- Micropipetas (entre 2 y 1000 µL).
- Agua libre de nucleasas.
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El kit puede usarse hasta 28 días después de abrir las bolsas de aluminio que contienen los tubos de reacción.

7. Precauciones para el usuario

- Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso. Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes.
- Proteger los reactivos de la humedad.
- Proteger y conservar los componentes alejados de la luz.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo de dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit, el kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-2, cualquier otro reactivo adicional que se necesite para realizar el ensayo y el sistema BD MAX™ no estén contaminados. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos y las tarjetas de PCR (*cartridges*).
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional.



Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.

- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener información sobre advertencias, precauciones y procedimientos adicionales

8. Procedimiento del test

8.1. RECOLECCIÓN, ALMACENAJE Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit ha sido validado en hisopos perianales y/o rectales colocados inmediatamente en el medio de transporte líquido ESwab™ (sistema de recolección y transporte de base líquida Amies modificado) (Copan, Italy). VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit también ha sido validado en suspensión de colonias.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, los hisopos perianales y/o rectales deben recogerse y etiquetarse adecuadamente en un medio de transporte limpio de ESwab™ y ser procesados con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los especímenes deben ser transportados conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Para transportes largos de duración mayor de 24 horas, se recomienda realizar el envío a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Las muestras se pueden almacenar a 25°C hasta 24 horas, a 8°C hasta 144 horas (6 días) o congeladas a -20°C hasta 196 horas (8 días). Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

8.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DE DNA

Realizar la preparación de la muestra según las recomendaciones del fabricante, detalladas en el instructivo del kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-2. Hay que puntualizar que otro tipo de muestras pueden requerir una etapa de tratamiento previo. La aplicación de procedimientos de extracción específicos debe ser desarrollada y validada por el usuario.

1. Copan ESwab™: pipetear 200 μL de la muestra en ESwab™ en el Sample Buffer Tube del kit BD MAX™ TNA-2 y cerrar bien el tubo con el tapón perforable. Agitar la muestra con vortex a gran velocidad durante 1 minuto. Proceder con BD MAX™ System Operation.
2. Colonias: Picar dos colonias del medio de cultivo y resuspenderlas en 500 μL de agua libre de nucleasas. Agitar mediante vorteo. Añadir 10 μL de la suspensión en el Sample Buffer Tube del kit BD MAX™ TNA-2. Cerrar bien el tubo con el tapón perforable. Agitar la muestra con vortex a gran velocidad durante 1 minuto. Proceder con BD MAX™ System Operation.

8.3. FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA BD MAX™

Nota: Por favor, consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener instrucciones más detalladas.



8.3.1. Programación de la prueba VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit

Nota: Si ya ha creado el test para VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit, puede omitir el paso 8.3.1 e ir directamente al 8.3.2.

- 1) En la pantalla "Run" del Sistema BD MAX™, seleccionar la pestaña "Test Editor".
- 2) Hacer click en el botón "Create".
- 3) En la ventana "Test Name", escribir el nombre del test: ej. VIASURE Vancomycin resistance.
- 4) En el menu desplegable "Extraction Type", seleccionar "ExK TNA-2".
- 5) En el menu desplegable "Master Mix Format", elegir "Type 5"
 - a. Nota: El producto puede ser usado junto con otros productos VIASURE para BD MAX™, en este caso seleccionar "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) En "Sample extraction parameters" seleccionar "User defined" y ajustar el volumen de la muestra a 500 µL.
- 7) En "Ct Calculation" seleccionar "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) En la pestaña "PCR settings" introducir los siguientes parámetros: "Channel Settings", "Gains" y "Threshold" (Tabla 2).
 - a. Nota: El producto puede ser usado junto con otros productos VIASURE para BD MAX™, en este caso completar "PCR Settings" y "Test Steps" para ambas posiciones, 2 (verde) y 4 (azul).

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

Tabla 2. PCR settings.

- 9) En la pestaña "PCR settings" introducir también los parámetros "Spectral Cross Talk" (Tabla 3)

		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. Parámetros "Spectral cross-talk".



- 10) En la pestaña "Test Steps", introducir el protocolo de PCR (Tabla 4).

Etapa	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	✓

Tabla 4. PCR protocol.

- 11) Hacer click en el botón "Save Test".

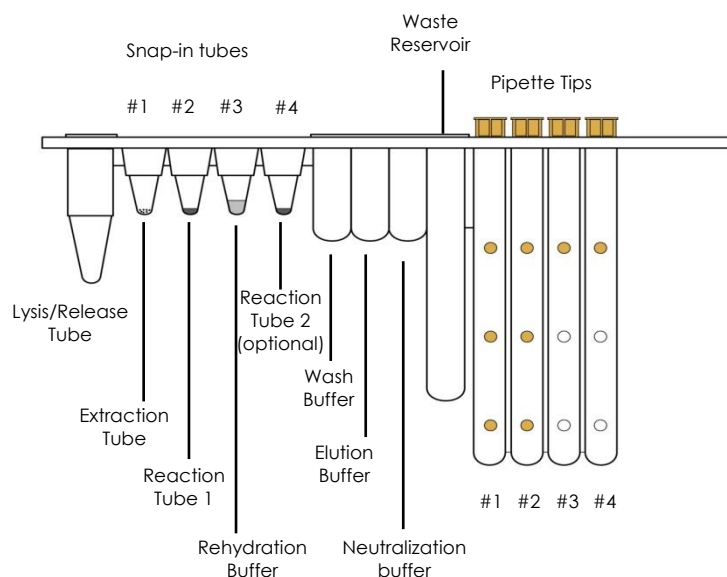
8.3.2. Preparación de la gradilla del sistema BD MAX™

- 1) Para cada espécimen, coger una tira de reactivos individual (BD MAX™ ExK TNA-2 Reagent Strip (TNA)) del kit de extracción (BD MAX™ ExK TNA-2 kit). Golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos y colocar la tira de reactivos en la gradilla del sistema BD MAX™.
- 2) Determinar y separar el número de tubos de reactivo de extracción necesarios (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (sello blanco)) de su bolsa protector. Colocar el tubo de reactivo de extracción (sello blanco) en su posición correspondiente dentro de la tira de reactivos TNA (Posición 1. Código de color blanco en la gradilla. Ver figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar las bolsas protectoras con el zip.
- 3) Calcular y separar el número adecuado de *Vancomycin resistance* reaction tube reacción (sello azul) y colocarlos en su posición correspondiente de la tira (Posición 2. Código de color verde en la gradilla. Ver figura 1).
 - a. Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres de aluminio con el zip.
 - b. Para llevar a cabo una rehidratación correcta, asegurarse que el producto liofilizado esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido al área superior del tubo o del sellado del tubo.

Nota: Si elige el formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Sección 8.3.1), calcular y separar el número adecuado de tubos de reacción de los test VIASURE adicionales (sellado de color diferente) y colocarlos en su posición correspondiente dentro de la tira (Posición 4. Código de color azul en la gradilla. Ver figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres de aluminio con el zip.
- 4) Coger el número necesario de Rehydration Buffer tube (sello oxidado) y colocarlos en su posición correspondiente dentro de la tira (Posición 3. Sin código de color en la gradilla. Ver figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres con el zip.
 - a. Para llevar a cabo una transferencia correcta, asegúrese de que el líquido esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido a la parte superior del tubo o al sello del mismo.



Figura 1. Tira de reactivos individuales BD MAX™ TNA Reagent (TNA)) del kit de extracción BD MAX™ ExK TNA-2 kit.



8.3.3. Configuración del instrumento BD MAX™

- 1) Seleccionar la pestaña "Work List" en la pantalla "Run" utilizando el software v4.50A o uno superior del sistema BD MAX™.
- 2) En el menú desplegable "Test", seleccionar VIASURE *Vancomycin resistance* (si todavía no está creado, consultar la sección 8.3.1).
- 3) Seleccionar en el menú desplegable el número de lote del kit de extracción empleado (situado en el estuche exterior). Este paso es opcional.
- 4) Introducir el número de identificación/el código de barras del tubo de tampón de muestra BD MAX™ ExK TNA-2 en la ventana de "Sample tube" dentro de la pestaña "Work list", ya sea escaneando el código de barras con el lector o mediante entrada manual.
- 5) Introducir la identificación de la muestra/paciente y/o "Accession" en la pestaña "Work list" y haga clic en el botón "Save". Continúe hasta que se introduzcan todos los Sample Buffer Tubes. Asegúrese de que la identificación la muestra/paciente y los Sample Buffer Tubes estén correctamente colocados.
- 6) Colocar el tampón de muestra preparado en la(s) gradilla(s) del sistema BD MAX™.
- 7) Colocar la(s) gradilla(s) en el sistema BD MAX™ (la gradilla A se encuentra en el lado izquierdo del sistema BD MAX™ y la gradilla B en el lado derecho).
- 8) Colocar el número necesario de BD MAX™ PCR Cartridges en el sistema BD MAX™.
- 9) Cerrar la puerta del sistema BD MAX™.
- 10) Presionar "Start Run" para comenzar con el procedimiento.

8.3.4 Informe BD MAX™

- 1) En el menú principal, hacer click en el botón "Results".
- 2) Hacer doble click en la prueba incluida en la lista de ensayos o seleccionar la prueba y presionar el botón "view".
- 3) Hacer click en el botón "Print", seleccionar: "Run Details, Test Details and Plot..."
- 4) Hacer click en el botón "Print or Export" de la pantalla "Run Report".



9. Interpretación de los resultados

Para una descripción detallada de cómo analizar los datos, consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™.

El análisis de los datos se realiza con el software del sistema BD MAX™ de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. El software del sistema BD MAX™ proporciona los valores de Ct y muestra las curvas de amplificación para cada uno de los canales de detección de cada muestra que se analiza de la siguiente manera:

- Un valor de Ct de 0 indica que el software no calculó ningún valor de Ct con el umbral especificado (ver Tabla 2). Si la curva de amplificación muestra un "0" como valor de Ct, es necesario analizarla manualmente.
- Un valor de Ct de -1 indica que no ha habido proceso de amplificación.
- Cualquier otro valor de Ct debería de ser interpretado en correlación con la curva de amplificación y según las pautas de interpretación descritas en la Tabla 5.

Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. Además, comprobar que no hay ningún fallo del sistema BD MAX™.

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

Gen <i>vanA</i> (475/520)	Gen <i>vanB</i> (585/630)	Control Interno (530/565)	Interpretación
-	-	+	<i>vanA</i> y <i>vanB</i> Negativos
+	+	+/-	<i>vanA</i> y <i>vanB</i> Positivos
+	-	+/-	<i>vanA</i> Positivo, <i>vanB</i> Negativo
-	+	+/-	<i>vanB</i> Positivo, <i>vanA</i> Negativo
-	-	-	Resultado sin resuelto (UNR) debido a la presencia de inhibidores en la reacción de PCR o a un problema general (no informado por un código de error) durante el procesamiento de la muestra y/o la etapa de amplificación
IND	IND	IND	Resultado indeterminado (IND) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de un fallo del instrumento vinculado a un código de error.
INC	INC	INC	Resultado de ensayo incompleto (INC) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de que no se complete la prueba.

Tabla 5. Interpretación

+: curva de amplificación
-: sin curva de amplificación

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



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

En caso de obtener resultado sin resolver (UNR), ausencia de la señal de control interno en muestras negativas, se recomienda repetir el ensayo según las siguientes indicaciones:

REPETIR PROCEDIMIENTO DEL TEST

NOTA: El tubo de buffer (Sample Buffer Tube) que se suministra presenta suficiente volumen como para repetir la prueba una segunda vez. Si los tubos de buffer de muestra BD MAX son almacenados a 2–8°C o 25°C, la nueva prueba debe realizarse dentro de las 24 horas siguientes a su preparación.

NOTA: Se pueden probar en el mismo ensayo muestras nuevas y muestras repetidas.

El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con hisopos perianales y/o rectales recolectados en el medio de transporte líquido ESwab™, y suspensiones de colonias.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras de hisopos rectales y/o perianales y de las colonias. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con muestras sospechosas de resistencia a vancomicina, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- En el caso de obtener con VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit resultados no resueltos, indeterminados o incompletos se requiere volver a testar de nuevo. Los no resueltos pueden deberse a la presencia de inhibidores en la muestra o debido a una rehidratación incorrecta del tubo de mezcla de reacción liofilizada. Si hay un fallo en el instrumento, se podrán obtener resultados indeterminados o incompletos.

11. Control de calidad

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene un control interno (CI) en cada tubo de reacción que confirma el correcto funcionamiento de la técnica.



12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron 216 muestras (muestras rectales frescas recolectadas en el medio ESwab™) procedentes de pacientes (lactantes y adultos) con sospecha de infección por VRE. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un ensayo *in-house* de PCR a Tiempo Real y por cultivo enriquecido. El ensayo *in-house* de PCR a Tiempo Real adaptado al sistema BD MAX™ detecta *E. faecalis*, *E. faecium* y los genes *vanA* y *vanB*. Los resultados fueron los siguientes:

		PCR a Tiempo Real <i>in-house</i>		
		+	-	Total
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit	+	82*	0	82
	-	0	134	134
	Total	82	134	216

Table 6. Comparativa de resultados para el gen *vanA*.

* 17/82 pacientes presentan una coinfección con *Enterococcus faecium* genotipo *vanA* y *vanB*. VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit es capaz de detectar correcta y simultáneamente los genes *vanA* y *vanB* en muestras clínicas.

		PCR a Tiempo Real <i>in-house</i>		
		+	-	Total
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit	+	53*	1#	54
	-	0	162	162
	Total	53	163	216

Table 7. Comparativa de resultados para el gen *vanB*.

* 17/53 pacientes presentan una co-infección con *Enterococcus faecium* genotipo *vanA* y *vanB*. VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit es capaz de detectar correcta y simultáneamente los genes *vanA* y *vanB* en muestras clínicas.

Esta muestra fue negativa para la resistencia a vancomicina mediante el análisis de Secuenciación del Genoma Completo (Whole Genome Sequencing, WGS).

Los valores de sensibilidad (S) y especificidad (E) para VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR detection kit (CerTest Biotec) en comparación con la PCR a Tiempo Real *in-house* se muestran en la siguiente tabla:

Genes de resistencia a la vancomicina	S (%)	E (%)
<i>vanA</i>	>99.9	>99.9
<i>vanB</i>	>99.9	99.4

Tabla 8. Valores de sensibilidad (S) y especificidad (E) para VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit.



Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar los genes *vanA* y *vanB* utilizando VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 4 unidades formadoras de colonias por reacción (UFC/rxn) para *vanA* y de ≥ 10 unidades formadoras de colonias por reacción (UFC/rxn) para *vanB* (Figura 2, 3 y 4) con una tasa de aceptación \geq del 95%

Figura 2. Diluciones seriadas de gen *vanA* ($3.62 \cdot 10^4$ - 3.62 CFU/rxn). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

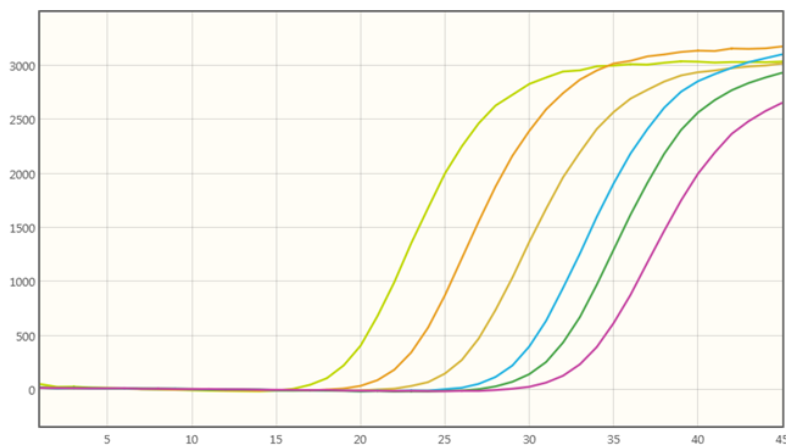
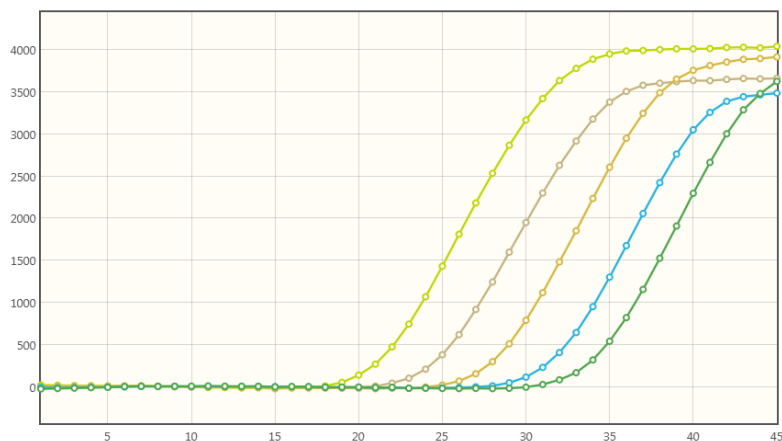


Figura 3. Diluciones seriadas de gen *vanB* ($5.65 \cdot 10^4$ - 9.98 CFU /rxn). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 585/630 (ROX)).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Vancomycin resistance* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos resistentes a los antimicrobianos y diferentes microorganismos que representan los patógenos entéricos más comunes o la flora presente en el intestino. No se detectan reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto los patógenos específicos de cada ensayo:



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 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>	-	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	-		

Tabla 9. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.



12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit para gen *vanA* se evaluó frente a las cepas *Enterococcus avium* genotipo *vanA*, *Enterococcus faecalis* genotipo *vanA* (NCTC 13632, NCTC 12201) y *Enterococcus faecium* genotipo *vanA* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit para gen *vanB* se evaluó frente a las cepas *Enterococcus faecalis* genotipo *vanB* (ATCC 51299, CECT 8120), *Enterococcus faecium* genotipo *vanB* (IOWA 2) y *Enterococcus gallinarum* genotipo *vanB* y *vanC* (ENT20120142), mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

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/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

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

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