

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Vancomycin resistance

Handbook for the following references/
Aşağıdaki referanslar için el kitabı:

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

BD REF 444202

to be used with the BD MAX™ System
BD MAX™ Sistemi ile kullanmak için



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.

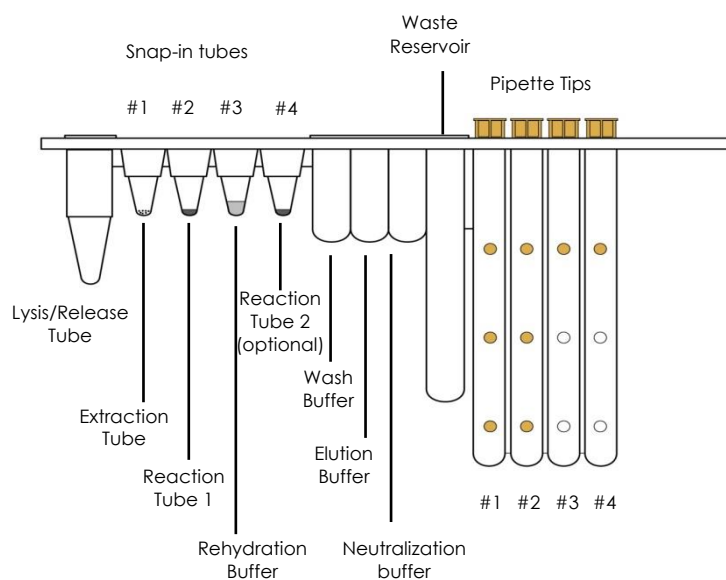
8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 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).

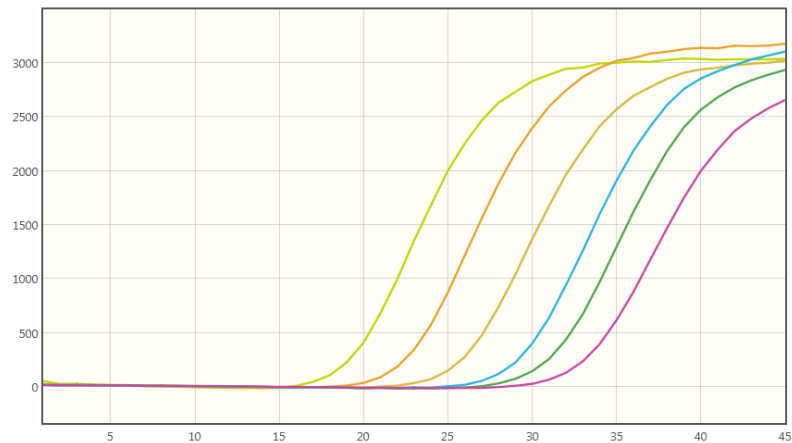
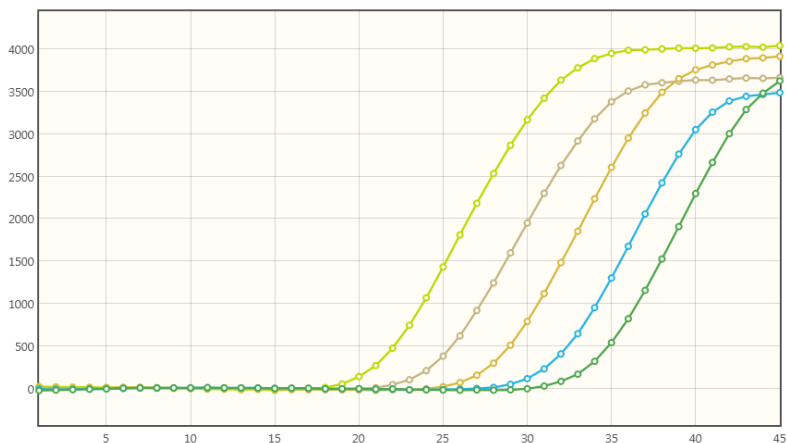


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene (5.65×10^4 - 9.98 CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



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.



TÜRKÇE

1. Kullanım amacı

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, perianal ve/veya rektal swab ve kolonilerden doğrudan gelen vankomisin direnci enterokok (VRE) ile ilişkili olabilecek *vanA* ve *vanB* genlerinin tespit ve ayırt edilmesi için tasarlanmıştır. Bu tahlil, vankomisine dirençli organizmaların, hastanın klinik belirti ve semptomları ve epidemiyolojik risk faktörleri ile birlikte tanımlanmasında yardımcı olarak kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Analiz, BD MAX™ Sistemini, otomatik olarak DNA'nın ekstraksiyonu için kullanır ve ardından BD MAX™ Sistemi için evrensel reaktifler ve atılabilir maddeler ile birlikte sağlanan reaktiflerin kullanıldığı gerçek zamanlı PCR'yi kullanır. Perianal ve/veya rektal swablardan ve kolonilerden gelen DNA *vanA* ve *vanB* genlerine özgü flüoresan raportör boya problemleri kullanılarak tespit edilir.

2. Özet ve Açıklama

Enterokoklar, gastrointestinal sistemde ve kadın üreme organlarında bulunan ortakçı organizmalardır. Yakın zamanda, idrar yolu enfeksiyonları, cilt enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları, endokardit ve sepsis gibi hastane enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı patojenler olarak tanınmışlardır.

Vankomisin, hücre duvarı sentezini inhibe eden ve ciddi oranda Gram-pozitif bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan bir glikopeptid antibiyotiktir. Vankomisine direnci enterokoklar (VRE) ilk olarak 1986'da İngiltere ve Fransa'da rapor edilmiş olup, günümüzde dünya çapındaki hastanelerde yaygın olarak görülmektedir.

Vankomisine direnç, karmaşık bir süreçtir ve farklı gen kümelerinin varlığına ihtiyaç duyar. Esas olarak, vankomisin direnç genleri tarafından üretilen pentapeptid öncüllerine bağlı olarak iki türe ayrılabilir; D-Alanine-D-Serine (VanC-, VanE-, VanG-, VanL- ve VanN-tipi) ile biten veya D-Alanine-D-Laktat (VanA-, VanB-, VanD- ve VanM-tipi) ile biten. Bu pentapeptid öncülleri, glikopeptitler için düşük oranda benzerlik göstermiş ve enterokoklarda vankomisin dirençleri vermiştir.

Enterokoklarda birinci tip vankomisin direnci intrinsik dirençtir (örn. *vanC* geni ile ilişkilidir). *Enterococcus gallinarum* ve *E. Casseliflavus E flavescens* izolatları vankomisine karşı doğal, düşük seviyeli bir direnç gösterir. İkinci tür ise kazanılan dirençtir (örneğin *vanA* veya *vanB* genleri) ve enterokok, başka bir Enterokok türünden veya organizmasından mobil genetik elementlerin (transpozonlar ve plazmitler) alınması yoluyla direnç kazanabilir. Bu direnç en sık olarak *E. faecium* ve *E. faecalis*'te görülür, ancak aynı zamanda *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* ve diğer bazı enterokok türlerinde de görülmüştür. Van A ve van B genleri yüksek ya da orta dereceli vankomisin direncinden sorumludur.

Vankomisine direnci enterokokların (VRE) iletimi, kolonize olmuş veya enfekte olmuş hastaların (kan, yara drenajı, idrar, dışkı, septum ve diğer yollardan) vücut sıvılarıyla doğrudan temas yoluyla veya sağlık çalışanlarının elleriyle dolaylı temas yoluyla veya Kirilenmiş hasta bakım ekipmanı veya çevresel yüzeyler aracılığıyla olur.

İlk başta, uygulanan tarama metodu kültür temelliydi ve zaman alıcıydı ve genellikle tamamlanması bir ila beş gün sürmekteydi. Gerçek zamanlı PCR analizlerinin, vankomisine dirençle klinik olarak ilgili genlerin tespiti için bir araç olduğu gösterilmiştir.



3. Prosedür ilkesi

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, DNA'nın vankomisine direnci enterokoklardan ve vankomisine direnci genler vanA ve vanB'yi taşıyan diğer organizmalardan ayırt edilmesi ve ayrılması için tasarlanmıştır. DNA izolasyonundan sonra, vankomisin direncinin belirlenmesi, spesifik primerleri ve flüoresan etiketli bir probu kullanarak, vanA ve vanB genlerinin korunmuş bir bölgesinin amplifikasyonu ile gerçekleştirilir.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, DNA polimerazının 5' nükleaz aktivitesine dayanır. DNA amplifikasyonu sırasında, bu enzim tamamlayıcı DNA sekansına bağlı probu ayırarak; söndürücü boyanın raportörden ayırt edilmesini sağlar. Bu reaksiyon, hedef şablonun miktarıyla orantılı olan floresan sinyalinde bir artış meydana getirir. Bu floresans BD MAX™ Sisteminde ölçülür.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit her tüpte, stabilize edilmiş bir formatta gerçek zamanlı PCR testi için gerekli tüm bileşenleri (spesifik primer/problar, dNTPS, tampon, polimeraz) ve ayrıca PCR inhibisyonunu izlemek için bir dahili kontrol içerir. vanA genleri 475/520 kanalında, vanB genleri 585/630 kanalında ve dahili kontrol (IC) 530/565 kanalında çoğaltılır ve tespit edilir.

4. Verilen reaktifler

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, Tablo 1'de ayrıntılı olarak verilen aşağıdaki maddeleri ve reaktifleri içerir:

Referans	Reaktif/Materyal	Açıklama	Renk	Miktar
VS-VAN112	<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube (<i>Vankomisin direnci</i> reaksiyon tüpü)	Enzimler, primer probları, tampon, dNTP'ler, stabilizatörler ve stabilize edilmiş formatta dahili kontrol içeren bir karışım	Şeffaf Mavi folyo	12 tüp içeren 2 poşet
VS-RB08	Rehydration Buffer tube (Rehidrasyon Tampon tüpü)	Stabilize edilmiş ürünü sulandırmak için solüsyon	Şeffaf Oksitlenmiş folyo	24 tüp içeren 1 kese

Tablo 1. VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit Ref. VS-VAN124 ile sağlanan reaktifler ve materyaller.

5. Kullanıcı tarafından tedarik edilecek olan reaktifler ve ekipman

Aşağıdaki liste, kullanım için gerekli olan ancak VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit içinde bulunmayan materyalleri ve ekipmanları içerir.

- Gerçek Zamanlı PCR cihazı: BD MAX™ Sistemi.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref:442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vorteks.
- Mikropipetler (2 ile 1000 µL arasında hatasız).
- Nükleaz içermeyen su.
- Filtre uçları.
- Pudrasız tek kullanımlık eldivenler



6. Taşıma ve depolama koşulları

- Kitler, etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar 2-40 °C'de sevk edilip saklanabilir.
- Reaksiyon tüplerini içeren alüminyum poşetler, açıldıktan sonra 28 güne kadar kullanılabilir.

7. Kullanıcılara uyarılar

- Profesyonel in vitro tanısal kullanım içindir.
- Son kullanma tarihi geçmiş reaktifleri ve/veya materyalleri kullanmayın.
- Dış kutuyu mühürleyen etiket açılmışsa kiti kullanmayın.
- Koruyucu kutu ulaştığında açılmış veya kırılmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Koruyucu poşetler ulaştığında açıksa veya kırılmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Reaktif poşetler içinde kurutucu mevcut değilse veya parçalanmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Kurutucu maddeyi reaktif poşetlerinden çıkarmayın.
- Her kullanımdan sonra hemen reaktif koruyucu poşetlerin fermuarını kapatın. Kapatmadan önce poşetlerdeki fazla havayı giderin.
- Folyo kırılmış veya hasar görmüşse reaktifleri kullanmayın.
- Farklı poşetlerden ve/veya kitlerden ve/veya partilerden reaktifleri karıştırmayın.
- Reaktifleri nemden koruyun.
- Bileşenleri ışıktan koruyun.
- Laboratuvarın genel alanında başka PCR testlerinin yapıldığı durumlarda, VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit, bunun için gerekli herhangi bir reaktif ile Test ve BD MAX™ Sisteminin kontamine olmamasına dikkat edilmelidir. Reaktifler ve kartuşlar kullanılmadan önce eldivenler değiştirilmelidir.
- Tek yönlü bir iş akışı tasarlayın. Ekstraksiyon Alanında başlanmalı ve Amplifikasyon ve Tespit Alanında devam edilmelidir. Numuneleri, ekipmanı ve reaktifleri önceki adımın gerçekleştirildiği alana geri götürmeyin.
- İyi Laboratuvar Uygulamalarına Uyun. Koruyucu kıyafet giyin, tek kullanımlık eldivenler, gözlükler ve maske kullanın. Çalışma alanında bir şey yemeyin, içmeyin veya sigara kullanmayın. Testi bitirdikten sonra ellerinizi yıkayın.
- Numuneler ile numunelere maruz kalan tüm reaktifler ve materyaller potansiyel olarak bulaşıcı muamelesi görmeli ve ulusal güvenlik düzenlemelerine uygun olarak ele alınmalıdır. Numunelerin toplanması, saklanması, işlenmesi ve bertarafı sırasında gerekli önlemleri alın.
- Yaygın olarak kullanılan ekipmanın, özellikle mikropipetler ve çalışma yüzeylerinin düzenli olarak dekontamine edilmesi önerilir.
- Ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için BD MAX™ Sistemi Kullanıcı El Kitabına bakın.

8. Test prosedürü

8.1. NUMUNELERİN TOPLANMASI, SAKLANMASI VE TAŞINMASI



VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit, derhal ESwab™ taşıma ortamına (sıvı Amies bazlı toplama ve taşıma sistemi) yerleştirilen perianal ve/veya rektal swablarla doğrulanmıştır (Copan, İtalya). VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit koloni süspansiyonunda da doğrulanmıştır.

Toplanan, saklanan ve taşınan numuneler, kullanıcı tarafından doğrulanılan şartlarda muhafaza edilmelidir.

Genel olarak, perianal ve/veya rektal swablar temiz bir ESwab™ taşıma ortamında uygun şekilde toplanmalı ve etiketlenmeli ve testin kalitesini garanti etmek için en kısa sürede işleme konmalıdır. Numuneler patojen materyalin taşınması ile ilgili yerel ve ulusal düzenlemelere uyularak taşınmalıdır. Uzun süreli taşımalar için (24 saatten fazla), sevkiyatın °-20°C'de yapılması önerilir. Numuneler 25°C'de 24 saate kadar, 2 ila 8°C'de 144 saate kadar (6 gün) saklanabilir veya -20°C'de 196 saate (8 gün) kadar dondurulabilir. Numune ve nükleik asitlerin bozulmasını önlemek için tekrarlanan donma-çözülme döngülerinden kaçınılmalıdır.

8.2. NUMUNELERİN HAZIRLANMASI VE DNA EKSTRAKSİYONU

Numune hazırlama işlemi kullanılan ekstraksiyon kiti olan BD MAX™ ExK™ TNA-2'nin kullanım talimatlarındaki önerilere uyararak gerçekleştirin. Bazı numunelerin ön işlem gerektirebileceğini unutmayın. Uygulamaya özel ekstraksiyon hazırlama prosedürleri kullanıcı tarafından geliştirilmeli ve doğrulanmalıdır.

1. Copan ESwab™: Bir BD MAX™ TNA-2 Numune Tampon Tüpüne 200 µL ESwab™ numunesini pipetleyin ve tüpü bir septum başlığıyla kapatın. Numuneyi 1 dakika boyunca yüksek hızda vorteksleyerek tamamen karıştırın. BD MAX™ Sistemini Kullanmaya geçin.
2. Koloniler: Kültürlenmiş ortamdan iki koloni alın ve bunları 500 µL nükleaz içermeyen suda süspansiyon halinde tutun. Vorteksleyerek tam karıştırma sağlayın. Bir BD MAX™ TNA-2 Numune Tampon Tüpüne 10 µL süspansiyon ekleyin ve tüpü septumlu kapakla kapatın. Numuneyi 1 dakika boyunca yüksek hızda vorteksleyerek tamamen karıştırın. BD MAX™ Sistemini Kullanmaya geçin.

8.3. PCR PROTOKOLÜ

Not: Lütfen ayrıntılı talimatlar için BD MAX™ Sistemi Kullanıcı El Kitabına bakın.

8.3.1. VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit için PCR test programı oluşturma

Not: Halihazırda VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection testi oluşturduysanız, 8.3.1 adımını atlayıp doğrudan 8.3.2'ye geçebilirsiniz.

- 1) BD MAX™ Sisteminin "Run" (Çalıştır) ekranında, "Test Editor" (Test Düzenleyici) sekmesini seçin.
- 2) "Create" (Oluştur) düğmesine tıklayın.
- 3) "Test Adı" (Test Name) penceresinde, testinize bir ad verin: örneğin VIASURE Vankomisin direnci.
- 4) "Extraction Type" (Ekstraksiyon Tipi) açılır menüsünde, "ExK TNA-2"yi seçin.
- 5) "Master Mix Format" (Master Karışım Formatı) açılır menüsünde, "Type 5"i (Tip 5) seçin.



- b. Not: Ürün BD MAX testi için ek bir VIASURE ile birlikte kullanılabilir, ardından "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Rehidrasyon Tamponlu (Tip 5) Çift Master Karışım Konsantre Liyofilize MM) ögesini seçin.
- 6) "Sample extraction parameters" (Numune ekstraksiyon parametreleri) içinde "User defined" (Kullanıcı tanımlı) seçeneğini seçin ve numune hacmini 500 µL olarak ayarlayın.
- 7) "Ct Calculation" (Ct Hesaplaması)'nda "Call Ct at Threshold Crossing" (Eşiğin Geçilmesi Halinde Ct'yi Ara)'yı seçin.
- 8) "PCR settings" (PCR ayarları) sekmesinde aşağıdaki parametreleri girin: "Channel Settings" (Kanal Ayarları), "Gains" (Kazanımlar) ve "Threshold" (Eşik) (Tablo 2).
- a. Not: Ürün BD MAX testi için ek bir VIASURE ile birlikte kullanılabilir, snap 2 (yeşil) ve snap 4 (mavi) konumları için PCR Ayarları ve Test Adımları tamamlanmalıdır.

Channel (Kanal)	Alias (Takma İsim)	Gain (Kazanım)	Threshold (Eşik)	Ct Min (Ct Asgari)	Ct Max (Ct Azami)
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

Tablo 2. PCR ayarları.

- 9) "PCR settings" (PCR ayarları) sekmesinde aşağıdaki parametreleri girin: "Spectral Cross Talk" (Spektral Tartışma) (Tablo 3) ve

		False Receiving Channel (Yanlış Alıcı Kanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Eksitasyon Kanalı)	475/520	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	0,0	-	0,0	0,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0
	630/665	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0

Tablo 3. Spektral tartışma parametreleri.

- 10) "Test Steps" (Test Adımları) sekmesine PCR protokolünü girin (Tablo 4).

Step Name (Adım İsmi)	Profile Type (Profil Tipi)	Cycles (Döngüler)	Time (s) (Süreler)	Temperature (Sıcaklık)	Detect (Tespit)
Initial denaturation (Başlangıç Denatürasyonu)	Hold (Tutma)	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denatürasyon ve Yeniden Birleştirme/Genişletme (Veri toplama))	2- Temperature (Sıcaklık)	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tablo 4. PCR protokolü.

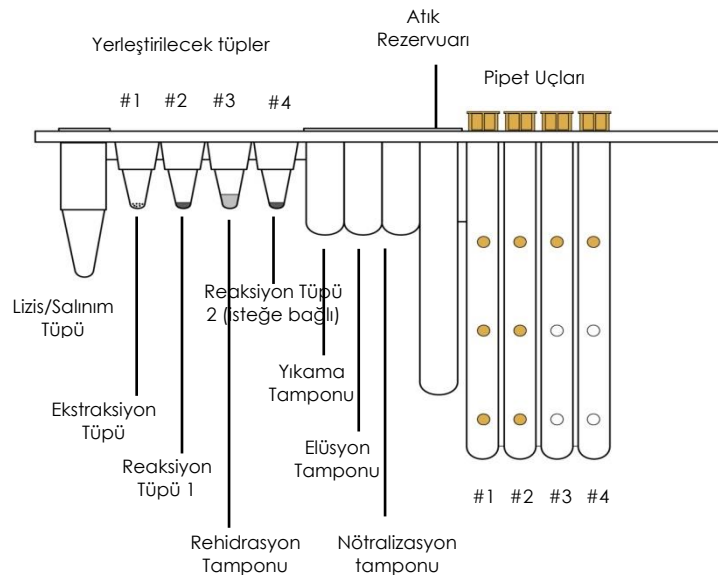


- 11) "Save Test (Testi Kaydet) düğmesine tıklayın.

8.3.2. BD MAX™ Raf kurulumu.

- 1) Test edilecek her bir numune için, BD MAX™ ExK TNA-2 kitinden bir adet Birimlere Ayrılmış Reaktif Şerit çıkarın. Tüm sıvıların tüplerin alt kısmında olduğundan ve BD MAX™ Sistemi numune raflarına yüklediğinden emin olmak için her bir şeridi hafifçe sert bir yüzeye vurun.
- 2) Gerekli sayıda BD MAX™ ExK TNA Ekstraksiyon Tüpü'nü (B4) (beyaz folyo) koruyucu poşetlerinden çıkarın. Ekstraksiyon Tüpünü/Tüplerini (beyaz folyo) TNA şeridindeki ilgili pozisyonlara yerleştirin (1. Yerleştirme pozisyonu, raftaki beyaz renkli kodlama. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve poşeti fermuar ile kapatın.
- 3) Uygun sayıda VIASURE Vankomisin resistance reaction tubes (mavi folyo) belirleyin ve ayırın ve şeritte karşılık gelen konumlarına yerleştirin (2. Yerleştirme pozisyonu, raftaki yeşil renkli kodlama. Şekil 1'e bakın).
 - a. Fazla havayı çıkartın ve alüminyum poşetleri fermuar ile kapatın.
 - b. Rehidrasyonu doğru şekilde gerçekleştirebilmek için, lütfen liyofilize ürünün tüpün dibinde olduğundan ve tüpün üst kısmına veya folyo kapamasına yapışmadığından emin olun.
 - i. Not: "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Rehidrasyon Tamponlu Çift Master Karışımli Konsantre Liyofilize MM (Tip 5)) (Bölüm 8.3.1) formatını seçtiyseniz, uygun sayıda ilave VIASURE reaksiyon tüpünü (farklı folyo) belirleyin ve ayırın ve şeritteki konumlarına yerleştirin (4. Yerleştirme pozisyonu, raftaki mavi renkli kodlama. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve alüminyum poşetleri fermuar ile kapatın.
- 4) Gerekli sayıda Rehydration Buffer tubes (oksitlenmiş folyo) çıkarın ve şeritteki konumlarına yerleştirin (3. Yerleştirme pozisyonu, raftaki renksiz kodlama. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve poşeti fermuar ile kapatın.
 - a. Aktarımı doğru şekilde gerçekleştirebilmek için, sıvının tüpün dibinde olduğundan ve tüpün üst kısmına veya folyo kapamasına yapışmadığından emin olun.

Şekil 1. BD MAX™ ExK TNA-2 kitindeki BD MAX™ TNA Reaktif Şerit (TNA).



8.3.3. BD MAX™ Cihaz kurulumu.

- 1) BD MAX™ Sistem yazılımı v4.50A veya daha üstü sürümünde "Run" (Çalıştır) ekranında "Work List" (İş Listesi) sekmesini seçin.
- 2) "Test" aşağı açılır menüsünde VIASURE Vancomycin resistance ögesini seçin (daha önce oluşturulmadıysa, Bölüm 8.3.1'e bakın).
- 3) Aşağı açılır menüden uygun kit parti numarasını (kullanılan ekstraksiyon kitinin dış kutusunda bulunur) seçin (isteğe bağlı).
- 4) Barkod tarayıcı ile tarayarak veya elle girerek İş Listesinin (Worklist) Numune tüpü (Sample tube) penceresine Numune Tampon Tüpü kimlik numarasını girin.
- 5) İş Listesinin (Worklist) Numune/Hasta Kimliği ve/veya Erişim (Specimen/Patient ID and/or Accession) penceresini doldurun ve "Save" (Kaydet) düğmesine tıklayın. Tüm Örnek Tampon Tüpleri girilene kadar devam edin. Numune/hasta kimliğinin ve Numune Tampon Tüplerinin doğru şekilde eşleştiğinden emin olun.
- 6) Hazırlanan Numune Tampon Tüpünü BD MAX™ Raflarına yerleştirin.
- 7) Rafları BD MAX™ Sistemine yükleyin (A Rafı, BD MAX™ Sisteminin sol tarafında ve B Rafı sağ tarafta yer alır).
- 8) BD MAX™ Sistemine gerekli sayıda BD MAX™ PCR Cartridges yerleştirin.
- 9) BD MAX™ Sisteminin kapağını kapatın.
- 10) Prosedüre başlamak için "Start Run" (Çalıştırmaya Başla) düğmesine tıklayın.

8.3.4 BD MAX™ raporu

- 1) Ana menüde "Results" (Sonuçlar) düğmesine tıklayın.
- 2) Ya listenizdeki çalıştır tuşuna çift tıklayın ya da "view button"a (görüntüle düğmesi) basın.
- 3) "Print" (Yazdır) ögesine tıklayın ve: "Run Details, Test Details and Plot..." (Çalıştırma Detayları, Test Detayları ve Çizit....) ögesini seçin.
- 4) "Run Reports" (Raporları Çalıştır) ekranında "Print or Export" (Yazdır veya Dışa Aktar) düğmesine tıklayın

9. Sonuçların yorumlanması

Verilerin nasıl analiz edileceğine dair ayrıntılı açıklama için, BD MAX™ Sistemi Kullanım Kılavuzuna bakın.

Verilerin analizi, üreticinin talimatlarına göre BD MAX™ yazılımı tarafından yapılır. BD MAX™ yazılımı, aşağıdaki şekilde test edilen her bir numunenin her bir tespit kanalı için Ct değerlerini ve amplifikasyon eğrilerini raporlar:

- 0'ın Ct değeri, belirtilen Eşik değerine sahip yazılım tarafından hesaplanan hiçbir Ct değerinin olmadığını gösterir (bkz. Tablo 2). "0" Ct değeri gösteren numunenin amplifikasyon eğrisi manuel olarak kontrol edilmelidir.

- 1'lik Ct değeri, amplifikasyon işleminin gerçekleşmediğini gösterir.

- Diğer herhangi bir Ct değeri, amplifikasyon eğrisi ile ilintili olarak ve Tablo 5'te verilen numune yorumlama kılavuzlarına göre yorumlanmalıdır.



Amplifikasyon karışımının doğru çalıştığını doğrulamak için Dahili Kontrol sinyalinin kontrol edin. Ek olarak, herhangi bir BD MAX™ Sistem hatası raporu olup olmadığını kontrol edin.

-Sonuçlar aşağıdaki tabloyu kullanarak okunmalı ve analiz edilmelidir:

vanA geni (475/520)	vanB geni (585/630)	Dahili kontrol (530/565)	Yorumlama
-	-	+	vanA ve vanB Negatif
+	+	+/-	vanA ve vanB Pozitif
+	-	+/-	vanA Pozitif, vanB Negatif
-	+	+/-	vanB Pozitif, vanA Negatif
-	-	-	PCR reaksiyonunda inhibitörlerin olması ya da numune işleme ve/veya amplifikasyon adımlarında genel bir sorun (hata kodu ile rapor edilmemiş) meydana gelmesi durumunda Çözülenmemiş (UNR) Sonuç elde edilir.
IND	IND	IND	Belirsiz tahlil sonucu (IND). BD MAX™ Sistem arızası nedeniyle. Bir hata koduna bağlı cihaz arızası durumunda gösterilen tahlil sonucu.
INC	INC	INC	Eksik tahlil sonucu (INC). BD MAX™ Sistem arızası nedeniyle. Çalışmanın tamamlanamaması durumunda gösterilen tahlil sonucu.

Tablo 5. Numunelerin yorumlanması

+: Amplifikasyon meydana geldi

-: Amplifikasyon meydana gelmedi

Elde edilen Ct değeri 40'tan küçükse, numune pozitif olarak kabul edilir. Yüksek sayıda hedef kopyası olması, dahili kontrol yerine hedefe özgü nükleik asitlerin tercihli amplifikasyonuna neden olabileceğinden; dahili kontrol, bir amplifikasyon sinyali gösterebilir veya göstermeyebilir. Bu durumlarda, IC'nin tespit edilmesi gerekli değildir.

Numune, tespit sistemi içerisinde amplifikasyon sinyali göstermiyorsa ancak dahili kontrol pozitifse, numune negatif olarak kabul edilir. PCR reaksiyonunun inhibisyonu, dahili kontrolün amplifikasyonu ile hariç tutulabilir.

Çözülenmemiş sonuçlarda (UNR), negatif numunede dahili kontrol sinyalinin olmaması durumunda aşağıdaki belirtileri izleyerek testi tekrarlamayı önerilir:

TEST PROSEDÜRÜNÜN TEKRARLANMASI

NOT: Numune Tampon Tüpünde bir tekrar testi için yeterli hacim mevcuttur. 2-8 °C veya 25 °C'de saklanan, hazırlanmış BD MAX Numune Tampon Tüpleri için tekrar testi 24 saat içinde yapılmalıdır.

NOT: Yeni numuneler aynı çalışmada tekrarlanan numunelerle birlikte test edilebilir.

Test sonuçları tıbbi geçmiş, klinik semptomlar ve diğer tanı testleri baz alınarak, bir sağlık uzmanı tarafından değerlendirilmelidir.



10. Testin kısıtlamaları

- Test sonuçları tıbbi geçmiş, klinik semptomlar ve diğer tanı testleri baz alınarak, bir sağlık uzmanı tarafından değerlendirilmelidir.
- Her ne kadar bu analiz diğer numune tipleriyle birlikte kullanılabilse de, ESwab™ taşıma ortamı ve koloni süspansiyonu kullanılarak toplanan perianal ve/veya rektal swablar ile doğrulanmıştır.
- Testin kalitesi numunenin kalitesine bağlıdır; perianal ve/veya rektal swablardan ve kolonilerden uygun şekilde ekstrakte edilmiş nükleik asitlerin varlığı önemlidir. Numunelerin uygun olmayan şekillerde toplanması, saklanması ve/veya taşınması hatalı negatif sonuçlar verebilir.
- Bu gibi durumlarda, tespit sınırının altında son derece düşük hedef seviyeleri tespit edilebilir, ancak sonuçlar tekrarlanamayabilir.
- Yüksek konsantrasyonlarda hedef DNA içeren vankomisin direnci şüphesi olan numunelerin çapraz kontaminasyonu nedeniyle veya önceki reaksiyonlardan kalan PCR ürünleriyle kontaminasyon gibi sebepler yüzünden hatalı pozitif sonuçların ortaya çıkma olasılığı bulunmaktadır.
- VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit kullanılarak Çözümlememiş, Belirsiz veya Eksik sonuçların alınması durumunda, yeniden test yapılması gerekecektir. Çözümlememiş sonuçlar, numunede inhibitörlerin varlığından veya liyofilize edilmiş reaksiyon karışımı tüpünün yanlış rehidrasyonundan kaynaklanabilir. Bir cihaz arızası varsa, Belirsiz veya Eksik sonuçlar elde edilecektir.

11. Kalite kontrol

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit, her reaksiyon tüpünde tekniğin doğru biçimde uygulandığını onaylayan dahili bir kontrol (IC) içerir.

12. Performans özellikleri

12.1. Klinik duyarlılık ve özgüllük

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit'in klinik performansı, VRE enfeksiyonunun varlığından şüphelenilen hastalardan (bebekler ve yetişkinler) 216 numune (ESwab™ kullanılarak toplanan taze rektal numuneler) kullanılarak test edilmiştir. Bu sonuçlar kurum içi gerçek zamanlı PCR testi ve zenginleştirme kültürü ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. BD MAX™ Sistemine uyarlanmış kurum içi gerçek zamanlı PCR, *E. faecalis*, *E. faecium* ve *vanA* ve *vanB* genlerini tespit eder.

		Kurum içi gerçek zamanlı PCR analizi		
		+	-	Toplam
VIASURE <i>Vancomycin resistance</i> Real Time PCR Detection kit	+	82*	0	82
	-	0	134	134
	Toplam	82	134	216

Tablo 6: *vanA* geni için karşılaştırılabilir sonuçlar.

*82 hasta arasından 17'si *vanA*- ve *vanB*- tipi *Enterokok faecium* ile koenfekteydi. VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, klinik numunelerde *vanA* ve *vanB* genlerini aynı anda doğru bir şekilde tespit edebilmektedir.



VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit	Kurum içi gerçek zamanlı PCR analizi			
		+	-	Toplam
	+	53*	1#	54
	-	0	162	162
Toplam	53	163	216	

Tablo 7: vanB geni için karşılaştırılabilir sonuçlar.

*53 hasta arasından 17'si vanA- ve vanB- tipi Enterokok faecium ile koenfekteydi. VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, klinik numunelerde vanA ve vanB genlerini aynı anda doğru bir şekilde tespit edebilmektedir.

Bu numune, Tam Genom Sıralama (WGS) analizi kullanıldığında vankomisin direnci için negatifti.

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit'in Kurum içi Gerçek Zamanlı PCR tahlili ile karşılaştırılması sonucu Hassasiyet (SE) ve Özgüllük (SP) durumları aşağıdaki tabloda gösterilmektedir:

Vankomisin direnci geni	SE (%)	SP (%)
vanA	>99,9	>99,9
vanB	>99,9	99,4

Tablo 8. VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit için Hassasiyet (SE) ve Özgüllük (SP) değerleri

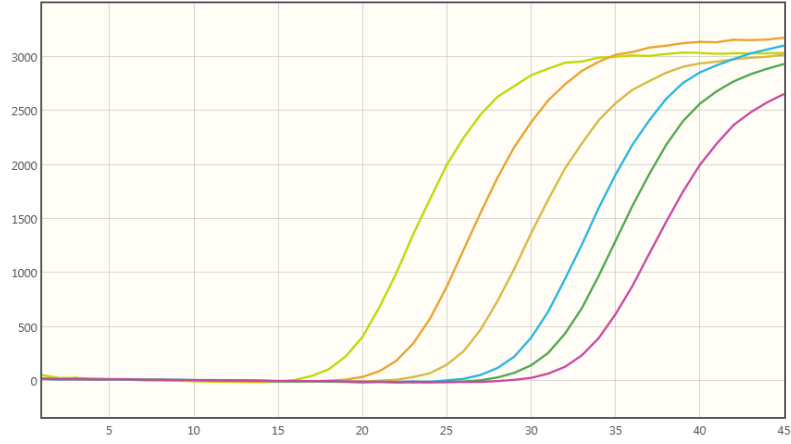
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit kullanılarak alınan sonuçlar, vanA ve vanB genlerinin saptanmasında yüksek hassasiyet ve özgüllük göstermektedir.

12.2. Analitik hassasiyet

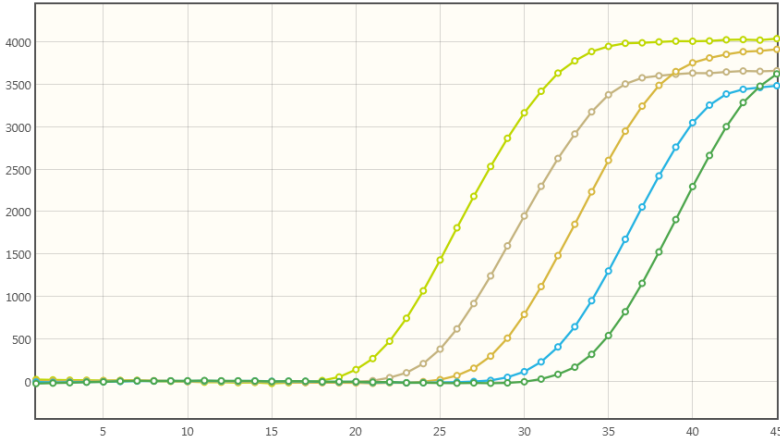
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, vanA için her reaksiyonda ≥ 4 koloni oluşturan birim(CFU / rxn) ve vanB için ≥ 10 CFU/rxn \geq % 95 oranında pozitif bir tespit sınırına sahiptir.



Şekil 2. *vanA* geni ($3.62 \cdot 10^4$ - 3.62 CFU/rxn) şablonunun BD MAX™ Sisteminde çalıştırılmasında dilüsyon serileri (475/520 (FAM) kanalı).



Şekil 3. *vanB* geni ($5.65 \cdot 10^4$ - 9.98 CFU/rxn) şablonunun BD MAX™ Sisteminde çalıştırılmasında dilüsyon serileri (585/630 (ROX) kanalı).



12.3. Analitik özgüllük

Vankomisin direnç testinin özgüllüğü, farklı antimikrobiyal dirençli organizmalardan ve bağırsakta bulunan en yaygın enterik patojenleri veya florayı temsil eden farklı mikroorganizmalardan oluşan bir panelin test edilmesiyle doğrulanmıştır. Her bir testin hedeflenen patojenleri hariç, test edilen aşağıdaki mikroorganizmaların hiçbiri arasında çapraz reaktivite tespit edilmemiştir:



Çapraz reaktivite testi					
Adenovirüs serotipleri 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	TEM-1 (ESBL olmayan), SHV-1 (ESBL olmayan), CTX-M-2 (ESBL) ve KPC-2 üreten Klebsiella pnömonisi izolatu	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	VanC tipi Enterokok casseliflavus	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	VanC2 tipi Enterokok casseliflavus	-	Norovirüs GI ve GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrovirüs Genotipi I-VIII	-	VanA tipi Enterokok faecalis	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	VanB tipi Enterokok faecalis	- / +	Rotavirüs A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	VanA tipi Enterokok faecium	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	VanB tipi Enterokok faecium	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	VanB ve VanC tipleri Enterokok gallinarum	- / +	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	VanC - tipi Enterokok gallinarum	-	<i>Salmonella paratyphi B</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	VanC1 tipi Enterokok gallinarum	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Citrobacter braakii izolatu üreten VIM-1	-	Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i>	-	Sapovirüs	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Citrobacter freundii-kompleks izolatu üreten KPC-3 ve VIM-4	-	Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Serratia marcescens</i> izolatu üreten OXA-48	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Escherichia coli</i> izolatu üreten OXA-244	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	<i>Escherichia coli</i> izolatu üreten TEM-1 (ESBL olmayan) ve IMP-1	-	<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>	-	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (mecC)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) suşu N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) suşu (oxa R, PVL pozitif, spa tipi t310)	-
Enterobacter cloacae izolatu üreten SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) ve OXA-48	-	Klaritromisine dirençli <i>Helicobacter pylori</i> (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
Enterobacter cloacae izolatu üreten TEM-1 (ESBL olmayan), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) ve NDM-1	-	Klaritromisine dirençli <i>Helicobacter pylori</i> (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Enterobacter kloak kompleksi izolatu üreten NDM-7	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
VanA tipi Enterokok avium	+ / -	Klebsiella pnömonisi izolatu üreten SHV-1 (ESBL olmayan), KPC-3 ve OXA-48	-		

Tablo 9. Bu çalışmada kullanılan referans patojenik mikroorganizmalar.



12.4. Analitik reaktivite











VanA geni için VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit'in reaktivitesi, vanA tipi Enterokok *avium*, vanA tipi Enterokok *faecalis* (NCTC 13632, NCTC 12201) ve vanA- tipi Enterokok *faecium* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202) suşlarıyla karşılaştırılarak değerlendirilmiş olup, pozitif sonuçlar göstermiştir.

VanB geni için VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit'in reaktivitesi, vanB tipi Enterokok *faecalis* (ATCC 51299, CECT 8120), vanB tipi Enterokok *faecium* (IOWA 2) ve vanB ve vanC Enterokok *gallinarum* (ENT20120142) suşlarıyla karşılaştırılarak değerlendirilmiş olup, pozitif sonuçlar göstermiştir.

13. Bibliography/Bibliyografi

1. B. Mirzaei et al. Detection of both *vanA* & *vanB* genes in *vanA* phenotypes of Enterococci by Taq Man RT-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology* 2015; 46, 1, 161-165.
2. J C.G. Marshall et al. D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; Vol. 94, pp. 6480–6483.
3. G. Werner et al. Comparison of direct cultivation on a selective solid medium, polymerase chain reaction from an enrichment broth, and the BD GeneOhm™ VanR Assay for identification of vancomycin-resistant enterococci in screening specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; Volume 70, Issue 4, Pages 512–521.
4. Centers for Disease Control and Prevention. VRE in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/HAI/organisms/vre/vre.html>
5. T.Nomura et al. New colony multiplex PCR assays for the detection and discrimination of vancomycin-resistant enterococcal species. *Journal of Microbiological Methods* 2018; 69-72.

14. Symbols for IVD components and reagents/IVD bileşenlerinin ve reaktiflerin sembolleri

 <i>In vitro</i> diagnostic device <i>In vitro</i> tanı cihazı	 Keep dry Kuru halde tutun	 Use by Son kullanma tarihi	 Manufacturer Üretici	 Batch code (Lot) Parti kodu (Lot)
 Consult Instructions for Use Kullanım Talimatlarına Bakın	 Temperature limitation Sıcaklık sınırlaması	 Contains sufficient for <n> test <n> testi için yeterli içerik	 Sample diluent Numune dilüsyonu	 Catalognumber Katalog numarası

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