

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Vancomycin resistance

Handbook for the following references

Manual para as seguintes referências

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

BD REF 444203

to be used with BD MAX™

para ser utilizado com BD MAX™

For Research Use Only (RUO)

This product has no declared clinical intended purpose and is not for clinical diagnostic use. No claim or representation is intended to provide information for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

Este produto não tem os fins clínicos a que se destina declarados e não se destina à utilização de diagnósticos clínicos. Nenhuma das declarações ou representações destina-se a providenciar informação para o diagnóstico, prevenção ou tratamento de uma doença.



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit is a research use only (RUO) assay designed for the specific identification and differentiation of *vanA* and *vanB* genes that can be associated with vancomycin-resistant enterococci (VRE) and other organisms.

The assay is performed on the BD MAX™ System from individuals at risk for VRE. The VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit can be used as an aid to identify, prevent and control VRE.

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 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 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. Whereas, the second type is acquired resistance (i.e. *vanA* or *vanB* genes) when enterococci can become resistant by acquisition of mobile genetic elements (transposons and plasmids) from another *Enterococcus* species or organisms. 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 level 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, sputum and other) or through indirect contact via the hands of health-care workers, or via contaminated patient care equipment or environmental surfaces.

The screening method applied at the beginning was culture-based, which is time-consuming and takes generally from one to five days to complete. To shorten the detection time and improve the sensitivity, 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 a RUO assay designed for the identification and differentiation of DNA from vancomycin-resistant *Enterococcus* 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.

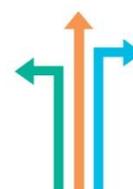
VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit contains in each tube all the components necessary for a real-time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. *vanA* gene is amplified and detected in channel 475/520, *vanB* gene 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-VAN12RUO	<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-RB08RUO	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-VAN124RUO.



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.

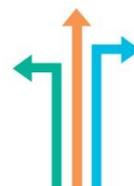
- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref:442826)
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519)
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).
- Nuclease-free water.
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves

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 can be used up to 28 days.

7. Precautions for users

- This VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit is for Research Use Only. It is not for use in diagnostic procedures. The performance characteristics of this product have not been established.
- For professional 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 against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- 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.
- Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- 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 using colony suspensions and spiked on Eswab (liquid Amies based collection and transport system), immediately placed in Eswab transport medium (Copan, Italy).

Collection, storage and transport samples should be maintained per the conditions validated by the user. Processing should be done as soon as possible to guarantee the quality of the test. Transportation should follow the local and national regulations for the transport. 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 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 media 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
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).

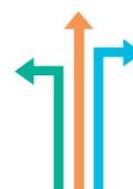
Step Name	Profile Type	Cycles	Time (s)	Temperature	Detect
Initial denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection)	2-Temperature	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

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 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 on 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 carry out 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.



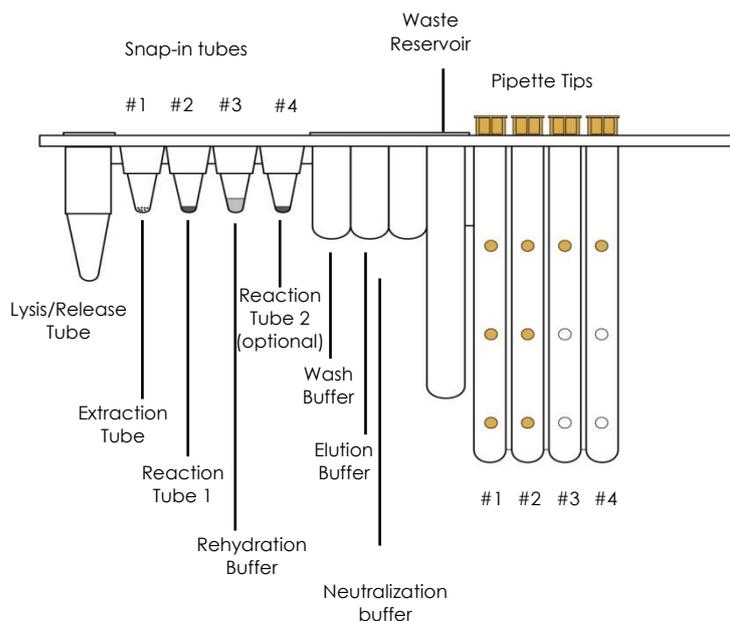


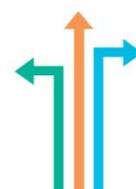
Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK TNA-2 kit.

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 into Accession window of the Worklist (if applicable) 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

Based on the validation using a colony suspension, 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 $\geq 95\%$

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

The analysis of the data is done by the BD MAX™ software according to 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 4). 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.

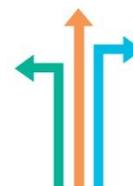
Using the following table read and analyze the results:

VanA (475/520)	VanB (585/630)	Internal control (530/565)	Interpretation
-	-	+	VanA and VanB Negative
+	+	+/-	VanA and VanB Positive
+	-	+/-	VanA Positive, VanB Negative
-	+	+/-	VanB Positive, VanA Negative
UNR	UNR	UNR	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, absence of internal control signal in negative sample we recommend to repeat the assay following the indications bellow:

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 25°C, retesting must be performed within 24 hours. Alternatively, for Sample Buffer Tubes stored at 2–8 °C, retesting may be performed within 24 hours.

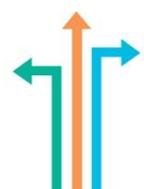
NOTE: New samples may be tested in the same run with repeat samples.

10. Limitations of the test

- The test must be used for RUO purposes, without any medical objective.
- This assay has been validated with colony suspensions.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from sample of 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.
- The results obtained with VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit may be Unresolved due to the sample contains inhibitors or incorrect rehydration of the lyophilized reaction mix tube or be Indeterminate or Incomplete due to instrument failure, and require retesting.

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.



PORTUGUÊS

1. Utilização prevista

O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit é um ensaio concebido apenas para utilização em investigação (RUO) para a identificação e a diferenciação específicas dos genes *vanA* e *vanB* que podem estar associados aos enterococos resistentes à vancomicina (ERV) ou a outros organismos. Este ensaio é levado a cabo no sistema BD MAX™ com indivíduos em risco de ERV. O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit pode ser utilizado para facilitar a identificação, prevenção e controlo de ERV. Este ensaio utiliza o sistema BD MAX™ para levar a cabo a extração automática de ADN e posterior-PCR em tempo real utilizando os reagentes fornecidos juntamente com os reagentes universais e descartáveis do sistema BD MAX™. O ADN é detetado utilizando sondas marcadas com uma molécula fluorescente específicas para os genes *vanB*.

2. Introdução e explicação

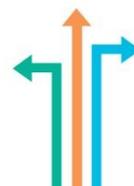
Os Enterococci são organismos comensais comuns que se encontram no trato gastrointestinal e nos genitais femininos. Foram reconhecidos recentemente como patogénicos oportunistas causando infeções nosocomiais tais como as infeções das vias urinárias, infeções cutâneas, endocardite e sépsis em hospedeiros comprometidos.

A vancomicina é um antibiótico glicopéptido que inibe a síntese da parede celular e é utilizada para tratar infeções bacterianas Gram-positivas graves. Os enterococos resistentes à vancomicina (ERV) foram relatados pela primeira vez em Inglaterra e França em 1986, e atualmente encontram-se propagadas em hospitais em todo o mundo.

O primeiro tipo de resistentes à vancomicina nos enterococos é uma resistência intrínseca (por ex., associada ao gene *vanC*). Isolados de *Enterococcus gallinarum* e *E. casseliflavus/E. flavescens* demonstraram uma resistência inerente e de baixo nível à vancomicina. Enquanto que, o segundo tipo adquiriu resistência (por ex., os genes *vanA* ou *vanB* genes) quando os enterococci se tornarem resistentes devido à aquisição de elementos genéticos móveis (transposões e plasmídeos) de outras espécies de *Enterococcus* ou organismos. Normalmente, esta resistência é verificada em *E. faecium* e *E. faecalis*, mas também foi reconhecida em *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans*, e em várias outras espécies de enterococcal. Os genes *vanA* e *vanB* são responsáveis pelo elevado ou moderado nível de resistência à vancomicina.

A transmissão de enterococos resistentes à vancomicina (ERV) pode ocorrer por meio de contacto direto com líquidos corporais de doentes colonizados/infetados (sangue, ferida, drenagem, urina, fezes, expetoração, etc.) ou por meio de contacto indireto através das mãos de profissionais de saúde, ou de equipamento de cuidados de doentes contaminados ou superfícies ambientais.

O método de análise aplicado no início era baseado na cultura, o que envolve tempo e leva geralmente entre um a cinco dias a estar concluído. Para reduzir o tempo de deteção e melhorar a sensibilidade, os ensaios de PCR em tempo real têm demonstrado ser uma ferramenta para a deteção de genes clinicamente relevantes associados à resistência à vancomicina.



3. Procedimento

O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit é um ensaio RUO concebido para a identificação e diferenciação de ADN de *Enterococcus* resistentes à vancomicina e a outros organismos que transportam os genes *vanA* e *vanB* de resistência à vancomicina. Após o isolamento de ADN, a identificação da resistência à vancomicina é levada a cabo pela amplificação de uma região conservada dos genes *vanA* e *vanB*, utilizando oligonucleótidos específicos e uma sonda marcada com fluorescência.

O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit baseia-se na atividade de exonuclease de 5 da polimerase do ADN. Durante a amplificação do DNA, esta enzima hidroliza a sonda unida à sequência de ADN complementar, separando o fluoróforo do quencher. Esta reação gera um aumento no sinal fluorescente proporcional à quantidade de RNA alvo. Esta fluorescência é monitorizada no sistema BD MAX™.

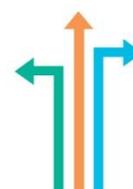
O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit contém em cada tubo todos os componentes necessários para levar a cabo a PCR em tempo real (oligonucleótidos/sondas específicas, dNTPs, tampão, polimerase) num formato estabilizado, assim como, num controlo interno para descartar a inibição da atividade da polimerase. Através da reação de amplificação, o gene *vanA* deteta-se no canal 475/520, o gene *vanB* deteta-se no canal 585/630, o RSV deteta-se no canal 630/665 e o controlo interno (CI) deteta-se no canal 530/565.

4. Reagentes fornecidos

O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit inclui os seguintes materiais e reagentes detalhados na Tabela 1:

Referência	Reagente/Material	Descrição	Cor	Quantidade
VS-VAN112RUO	Tubo de reação de resistência à vancomicina	Uma mistura de enzimas, sondas oligonucleotídicas, tampão, dNTPs, estabilizadores e controlo interno em formato estabilizado.	Transparente Selo azul	2 envelopes de 12 tubos
VS-RB08RUO	Tubo de tampão de reidratação	Solução para a reconstituição do produto estabilizado	Transparente Selo ferrugem	1 envelope de 24 tubos

Table 1. Reagentes e materiais fornecidos no VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit com Ref.ª VS-VAN124RUO.



5. Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos

A seguinte lista inclui os materiais necessários para a utilização mas que não estão incluídos no VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit.

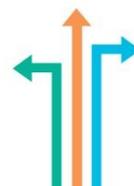
- Equipamento de PCR em tempo real: BD MAX™ System.
- Kit de extração BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref.º:442826)
- Cartuchos de PCR BD MAX™ (Ref.º: 437519)
- Vórtice.
- Micropipetas (entre 2 e 1000 µL).
- Água sem nuclease
- Pontas com filtro.
- Luvas não reutilizáveis sem pó.

6. Condições de transporte e armazenamento

- O transporte e armazenamento do kit pode ser realizado de 2 a 40 °C até à data de validade indicada na etiqueta.
- Após a abertura dos envelopes de alumínio que contém os tubos de reação, estes podem ser utilizados até 28 dias.

7. Precauções para o utilizador

- Este VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit é apenas para utilização em investigação. Não se destina a procedimentos de diagnóstico. As características do teste deste produto ainda não foram estabelecidas.
- Para utilização profissional.
- Não é recomendado utilizar o kit após a data de validade.
- Não utilizar o kit se a etiqueta de controlo da caixa exterior estiver rasgada ou danificada.
- Não utilizar os reagentes se o estojo exterior estiver aberto ou danificado aquando da receção.
- Não utilizar os reagentes se os envelopes ou as bolsas que protegem os tubos estiverem abertos ou danificados aquando da receção.
- Não utilizar os tubos de reação se o material dessecante incluído em cada envelope de alumínio não existir ou estiver danificado.
- Não remover o material dessecante dos envelopes de alumínio.
- Fechar os envelopes de alumínio que protegem os tubos de reação com o fecho zip imediatamente depois de casa utilização. Antes de fechar os envelopes, eliminar qualquer excesso de ar.
- Não utilizar os tubos de reagentes se o alumínio protetor estiver rasgado ou danificado.
- Não misturar reagentes de diferentes envelopes e/ou kits e/ou lotes.
- Proteger os reagentes da humidade. Uma exposição prolongada à humidade pode afetar o desempenho do produto.
- Proteger os componentes da luz.



- No caso de outros ensaios de PCR que estejam a ser realizados dentro da mesma área do laboratório, certifique-se de que o VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit, o kit de extração BD MAX™ ExK™ TNA-2, qualquer outro reagente adicional que seja necessário para realizar o ensaio e o sistema BD MAX™ não estão contaminados. É necessário mudar de luvas antes da manipulação dos reagentes e dos cartuchos de PCR.
- Conceber um fluxo de trabalho unidirecional. Deve-se começar na área de extração e, em seguida, passar para a área de amplificação e de deteção. Não colocar as amostras, os equipamentos e os reagentes utilizados em contacto com a área onde foi realizado o passo anterior.
- Use vestuário de proteção, luvas não reutilizáveis, óculos de proteção e máscara. Não comer, beber ou fumar na área de trabalho. Uma vez concluído o teste, lavar as mãos.
- Os espécimes devem ser tratados como potencialmente infecciosos assim como os reagentes que tenha estado em contacto com as amostras e devem ser manuseados de acordo com as regulamentações nacionais de segurança. Tome as precauções necessárias durante a colheita, o armazenamento, o tratamento e a eliminação das amostras.
- Recomenda-se a descontaminação periódica dos equipamentos utilizados habitualmente, em especial de micropipetas e das superfícies de trabalho.
- Consultar o manual do utilizador do sistema BD MAX™ S para obter informações sobre advertências, precauções e procedimentos adicionais.

8. Procedimento do teste

8.1. COLHEITA, ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

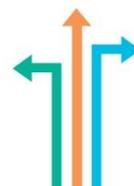
O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit foi validado com suspensões de colónias e fortificado recorrendo ao Eswab (sistema de colheita e transporte baseado em Amies líquido), colocado imediatamente em Eswab transporte médio (Copan, Itália).

Para a colheita, o armazenamento e o transporte das amostras devem ser seguidas as condições validadas pelo utilizador. O processamento deve ser efetuado com a maior brevidade possível para garantir a qualidade do teste. O transporte deve estar em conformidade com a normativa local e nacional para o mesmo. Para transportes de longa duração (com mais de 24 horas), é recomendado o envio a ≤ -20 °C. As amostras podem ser armazenadas a 25 °C até 24 horas, entre 2 a 8 °C até 144 horas (6 dias) ou congeladas a 20 °C até 196 horas (8 dias). Devem ser evitados ciclos de congelação-descongelação para prevenir a degradação da amostra e dos ácidos nucleicos.

8.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E EXTRAÇÃO DE ADN

Realizar a preparação das amostras de acordo com as recomendações nas instruções de utilização do kit de extração utilizado, BD MAX™ ExK™ TNA-2. Ter em conta que outras amostras podem requerer pré-processamento. A utilização de outros procedimentos de preparação e extração específicos deve ser validada pelo utilizador.

1. Copan ESwab™: Colher com uma pipeta de 200 µL do Eswab media para um tubo de tampão de amostras do sistema (Tubo de tampão de amostra BD MAX™ TNA-2) e fechar o tubo com uma tampa com septo. Assegurar



uma mistura completa centrifugando a amostra um minuto a alta velocidade. Ir para a secção "8.3 Funcionamento do sistema BD MAX™".

2. Colónias: Recolher duas colónias do meio em cultura e suspendê-las em 500 µL de água sem nuclease. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra. Adicionar 10 µL da suspensão para um tubo de tampão de amostras do sistema (Tubo de tampão de amostra BD MAX™ TNA-2) e fechar o tubo com uma tampa com septo. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra um minuto a alta velocidade. Ir para a secção "8.3 Funcionamento do sistema BD MAX™".

8.3. FUNCIONAMENTO DO SISTEMA BD MAX™

Nota: Consultar o manual do utilizador do sistema BD MAX™ para obter instruções mais detalhadas.

8.3.1. Programação do teste do VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit

Nota: Se já tiver sido criado o VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection test, pode ignorar o passo 8.3.1 e ir diretamente para o passo 8.3.2.

- 1) No ecrã "Run" do sistema BD MAX™, selecionar o separador "Test Editor".
- 2) Clicar no botão "Create".
- 3) Na janela "Test Name", escrever o nome do teste: por ex., VIASURE resistência à vancomicina.
- 4) No menu de lista pendente "Extraction Type", selecionar "ExK TNA-2".
- 5) No menu de lista pendente "Master Mix Format", escolher "Type 5".
 - b. Nota: O produto pode ser utilizado junto com outros produtos de teste Viasure for BD MAX, em seguida, selecionar "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) Em "Sample extraction parameters" selecionar "User defined" e ajustar o volume para 500 µL.
- 7) Em "Ct Calculation" selecionar "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) No separador "PCR settings" introduzir os seguintes parâmetros: "Channel Settings", "Gains" e "Threshold" (Tabela 2).
 - a. Nota: O produto pode ser utilizado juntamente com outros produtos Viasure para um teste BD MAX™ adicional, neste caso completar "PCR Settings" e "Test Steps" para ambas as posições 2 (verde) e 4 (azul).

Canal	Aliás	Ganho	Limiar	Ct Mín.	Ct Máx.
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. Definições de PCR.



- 9) No separador "PCR settings" introduzir também os parâmetros "Spectral Cross Talk" (Tabela 3)

		False Receiving Channel				
Canal		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. Parâmetros "Spectral cross-talk".

- 10) No separador "Test Steps", introduzir o protocolo de PCR (Tabela 4).

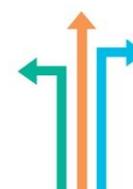
Etapa	Tipo de perfil	Ciclos	Tempo (s)	Temperatura	Deteção
Desnaturação inicial	Retenção	1	120	98 °C	-
Desnaturação e hibridização/Extensão (recolha de dados)	2- Temperatura	45	10	95 °C	-
			58	60 °C	✓

Tabela 4. Protocolo de PCR.

- 11) Clique no botão "Save Test".

8.3.2. Preparação do suporte para tubos do sistema BD MAX™

- 1) Para cada espécimen, retirar uma tira de reagentes individual do kit de extração (BD MAX™ ExK TNA-2). Bater levemente cada tira sobre uma superfície dura para se certificar de que todos os líquidos se encontram no fundo dos tubos e colocar a tira de reagentes no suporte para tubos do sistema BD MAX™.
- 2) Determinar e separar o número de tubos de reagente de extração necessários (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (selo branco)) da sua bolsa protetora. Colocar o(s) tubo(s) de reagente de extração (selo branco) na sua posição correspondente dentro da tira de reagentes TNA (Posição 1, código de cor branca no suporte para tubos. Ver figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar as bolsas protetoras com o fecho hermético.
- 3) Determinar e separar o número adequado de tubos de reação do teste VIASURE Vancomycin resistance (selo azul) e colocá-los na sua posição correspondente da tira (Posição 2, código de cor verde no suporte para tubos. Ver figura 1).
 - a. Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.
 - b. Para uma reidratação correta, certifique-se de que o produto liofilizado está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio.
 - i. Nota: Se escolher o formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Secção 8.3.1), calcular e separar o número adequado de tubos de reação dos testes VIASURE adicionais (com selo de cor diferente) e colocá-los na sua posição correspondente dentro da tira (Posição 4, código de cor azul no suporte para tubos. Ver figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.



- 4) Remover o número necessário de tubos de tampão de reidratação (selo ferrugem) e colocá-los na sua posição correspondente da tira (Posição 3, código sem cor no suporte para tubos. Ver figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes com o fecho hermético.
 - c. Para uma transferência correta, certifique-se de que o líquido está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio.

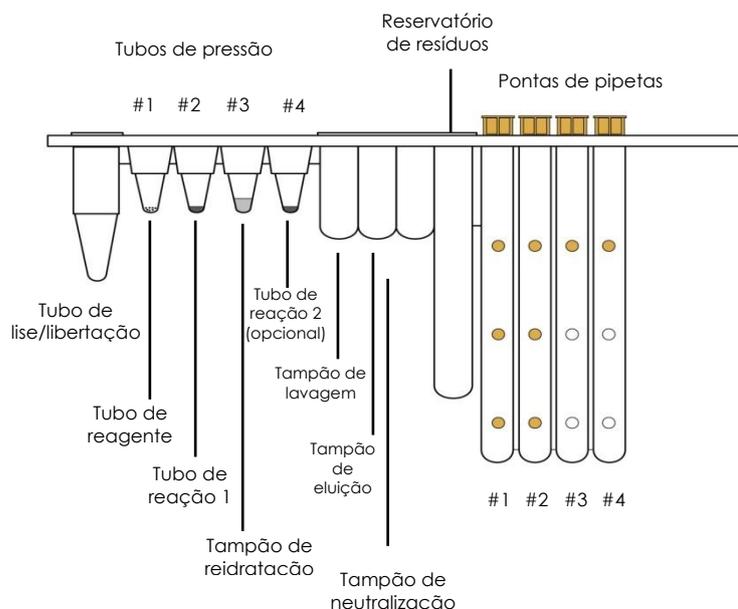
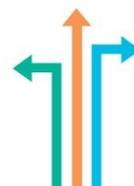


Figura 1 Tiras de reagente individuais BD MAX™ TNA Reagent (TNA) do kit de extração BD MAX™ ExK TNA-2.

8.3.3. Configuração do instrumento BD MAX™

- 1) Selecionar o separador "Work List" no ecrã "Run" utilizando o software v4.50A ou um superior do sistema BD MAX™.
- 2) No menu de lista pendente "Test", selecionar VIASURE *Vancomycin resistance* (se ainda não tiver sido criado, consultar a secção 8.3.1).
- 3) Selecionar no menu de lista pendente o número de lote do kit de extração utilizado (que se encontra na caixa exterior). Este passo é opcional.
- 4) Introduzir o número de identificação/o código de barras do tubo de tampão de amostra BD MAX™ ExK TNA-3 na janela "Sample tube" no separador "Work list", através da digitalização do código de barras com o leitor ou através da entrada manual.
- 5) Introduzir a identificação da amostra/doente na janela "Accession" do separador "Work list" (se aplicável) e clicar no botão "Save". Continue até estarem introduzidos todos os tubos de tampão de amostra. Certifique-se de que a identificação da amostra/doente e os tubos de tampão de amostra estão corretamente equiparados.
- 6) Colocar o tampão de amostra preparado no(s) suporte(s) para tubos do sistema BD MAX™.
- 7) Colocar o(s) suporte(s) para tubos no sistema BD MAX™ (o suporte para tubos A encontra-se no lado esquerdo do sistema BD MAX™ e o suporte para tubos B no lado direito).



- 8) Colocar o número necessário de cartuchos de PCR BD MAX™ no sistema BD MAX™.
- 9) Fechar a porta do sistema BD MAX™.
- 10) Clicar em "Start Run" para iniciar o procedimento.

8.3.5 Relatório BD MAX™

- 1) No menu principal, clique no botão "Results".
- 2) Fazer duplo clique no teste incluindo na lista de ensaios ou selecionar o teste e premir o botão "view".
- 3) Clicar no botão "Print", selecionar: "Run Details, Test Details and Plot..."
- 4) Clicar no botão "Print or Export button" no ecrã "Run Reports"

9. Interpretação dos resultados

Com base na validação utilizando uma suspensão de colónias, o kit de deteção em tempo real VIASURE de resistência à vancomicina tem um limite de deteção ≥ 4 de unidades formadoras de colónias por reação(UFC/reação) para VanA e ≥ 10 UFC/reação para VanB com uma taxa de aceitação $\geq 95\%$.

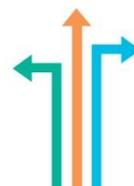
Para uma descrição detalhada de como analisar os dados, consultar o manual do utilizador do sistema BD MAX™.

A análise dos dados é realizada com o software do sistema BD MAX™ de acordo com as instruções de utilização do fabricante. O software do sistema BD MAX™ proporciona os valores de Ct e mostra as curvas de amplificação para cada um dos canais de deteção de cada amostra analisada da seguinte forma:

- Um valor de Ct de 0 indica que o software não calculou nenhum valor de Ct com o limiar especificado (ver a Tabela 2). Se a curva de amplificação mostra um "0" como valor de Ct, é necessário analisá-la manualmente.
- Um valor de Ct de -1 indica que não houve processo de amplificação.
- Qualquer outro valor de Ct deve ser interpretado em correlação com a curva de amplificação e segundo as orientações de interpretação descritas na Tabela 5.

Verificar a emissão do sinal do controlo interno para confirmar o correto funcionamento da mistura de amplificação. Para além disso, verificar que não há nenhuma anomalia do sistema BD MAX™.

Com a ajuda da seguinte tabela, ler e analisar os resultados:



VanA (475/520)	VanB (585/630)	Controlo interno (530/565)	Interpretação
-	-	+	VanA e VanB negativos
+	+	+/-	VanA e VanB positivos
+	-	+/-	VanA positivo e VanB negativo
-	+	+/-	VanB positivo e VanA negativo
UNR	UNR	UNR	Resultado não resolvido (UNR) . Resultado obtido na presença de inibidores na reação de PCR ou quando ocorre um problema geral (não indicado por um código de erro) nos passos de processamento e/ou amplificação da amostra.
IND	IND	IND	Resultado indeterminado do ensaio (IND). Devido a anomalia do sistema BD MAX™. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha do instrumento associado a um código de erro.
INC	INC	INC	Resultado incompleto do ensaio (INC). Devido a anomalia do sistema BD MAX™. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha de uma execução completa.

Table 5. Interpretação da amostra

+: Houve amplificação

-: Não houve amplificação

Uma amostra é considerada positiva, se o valor Ct obtido for inferior a 40. O controlo interno poderá mostrar ou não um gráfico de amplificação, já que a presença de um elevado número inicial de cópias do ácido nucleico alvo pode causar uma amplificação preferencial desta última. Nestes casos, a deteção do controlo interno não é necessária.

Uma amostra é considerada negativa se não for detetada uma curva de amplificação acima do valor limiar, e o controlo interno a apresentar. A inibição da reação de PCR pode ser excluída pela amplificação do controlo interno.

Em caso de ausência do sinal de controlo interno nas amostras negativas, é recomendado repetir o ensaio seguindo as indicações abaixo:

REPETIR P PROCEDIMENTO DO TESTE

NOTA: Encontra-se disponível volume suficiente para um teste de repetição a partir do tubo de tampão de amostras. Para tubos de tampão de amostras BD MAX armazenados a 25 °C, um novo teste deve ser realizado no prazo de 24 horas. Em alternativa, para tubos de tampão de amostras BD MAX armazenados a 2-8 °C, um novo teste deverá ser realizado no prazo de 24 horas.

NOTA: Poderão ser testadas novas amostras na mesma sequência com amostras repetidas.



10. Limitações do teste

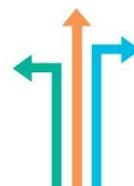
- O teste deve ser utilizado para fins RUO, sem prosseguir qualquer objetivo médico.
- Este ensaio foi validado com suspensões de colónias.
- O correto funcionamento do teste depende da qualidade da amostra; o ácido nucleico deve ser extraído de forma adequada das amostras de exsudados e as colónias devem ser extraídas. Uma forma inadequada de colheita, armazenamento e/ou transporte das amostras pode dar origem a falsos negativos.
- Pode-se detetar um baixo número de alvos abaixo do limite de deteção, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
- Existe a possibilidade de resultados falsos positivos devido à contaminação cruzada por resistência à vancomicina, quer pelas amostras suspeitas de elevadas concentrações de ADN alvo quer pela contaminação por arraste a partir de produtos de PCR de reações anteriores.
- Os resultados obtidos com o VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit podem ser "Não resolvido" devido ao facto de a amostra conter inibidores ou reidratação incorreta do tubo de mistura da reacção liofilizada ou "Indeterminado" ou "Incompleto" devido a falha do instrumento e exige um novo teste.

11. Controlo de qualidade

O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit contém um controlo interno (CI) em cada tubo de reacção que confirma o correto funcionamento da técnica.

12. Bibliography/Bibliografia

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.

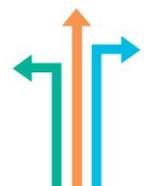


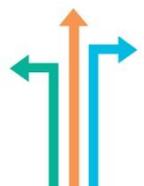
13. Symbols for components and reagents/ Símbolos para componentes e reagentes

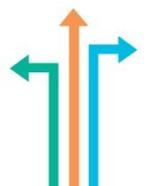
<p>Research Use Only device</p> <p>RUO Dispositivo apenas para utilização em investigação</p>	<p>Keep dry</p> <p> Armazenar em local seco</p>	<p>Use by</p> <p> Data de validade</p>	<p> Manufacturer</p> <p>Fabricante LOT Batch code</p> <p>Número de lote</p>
<p> Consult instructions for use</p> <p>Consultar as instruções de utilização</p>	<p> Temperature limitation</p> <p>Limitação de temperatura</p>	<p> Contains sufficient for <n> test</p> <p>Contém <n> test</p>	<p>DIL Sample diluent</p> <p>Diluyente de amostra REF Catalogue number</p> <p>Número de referência</p>

BD MAX™ is a registered trademark of Becton, Dickinson and Company.

BD MAX™ é uma marca registada da Becton, Dickinson and Company









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-349 rev00

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC