

# VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**  
BIOTEC

## *Vancomycin resistance*

Handbook for the following references/

Håndbok for følgende referanser:

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

**BD REF 444202**

to be used with the BD MAX™ System

for bruk med BD MAX™-systemet



## ENGLISH

---

### 1. Intended use

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

### 2. Summary and Explanation

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

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

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

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

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

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



### 3. Principle of the procedure

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

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

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

### 4. Reagents provided

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

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

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

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

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

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



## 6. Transport and storage conditions

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

## 7. Precautions for users

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

## 8. Test procedure

### 8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

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



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

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

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

## 8.2. SAMPLE PREPARATION AND DNA EXTRACTION

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

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

## 8.3. PCR PROTOCOL

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

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

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

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



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

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

Table 2. PCR settings.

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

		False Receiving Channel				
Channel		475/520	530/565	585/630	630/665	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.

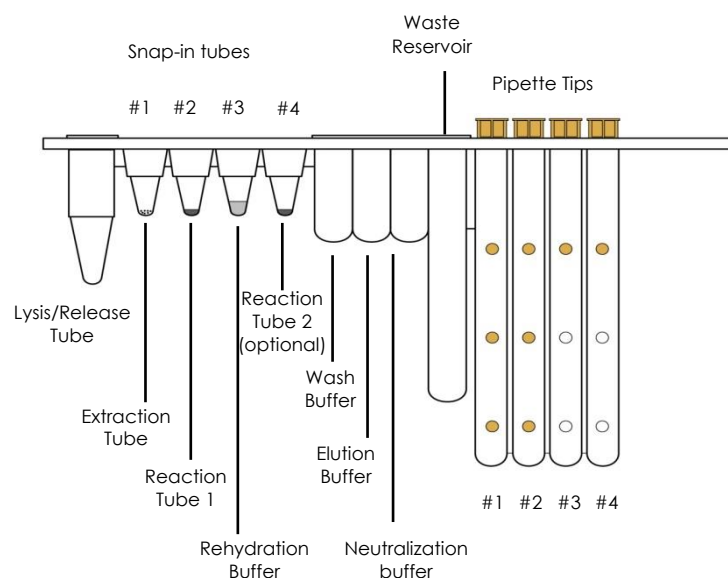
### 8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 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:

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

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

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

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

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

REPEAT TEST PROCEDURE

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

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

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



## 10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with perianal and/or rectal swabs collected using ESwab™ transport medium, and colony suspension.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from perianal and/or rectal swabs and colonies must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by vancomycin resistance suspicious samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

## 11. Quality control

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

## 12. Performance characteristics

### 12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

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

Table 6: Comparative results for *vanA* gene.

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



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



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

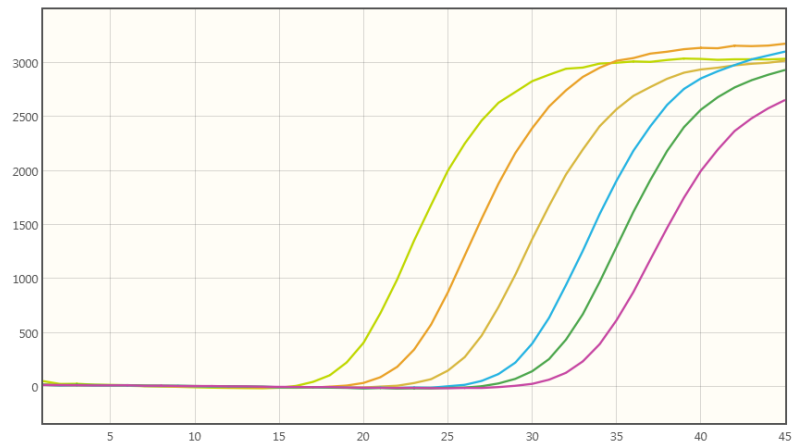
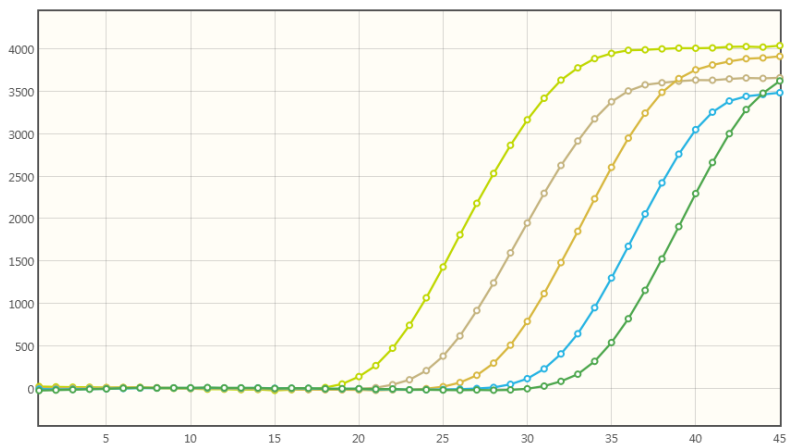


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene ( $5.65 \times 10^4$ - $9.98$  CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



### 12.3. Analytical specificity

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



Cross-reactivity testing					
Adenovirus serotypes 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL), and KPC-2 producing <i>Klebsiella 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 <sup>R</sup> , PVL-positive, spa type t310)	-
SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) and OXA-48 producing <i>Enterobacter cloacae</i> isolate	-	<i>Helicobacter pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) and NDM-1 producing <i>Enterobacter cloacae</i> isolate	-	<i>Helicobacter pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
NDM-7 producing <i>Enterobacter cloacae</i> -complex isolate	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
VanA-type <i>Enterococcus avium</i>	+ / -	SHV-1 (non-ESBL), KPC-3, and OXA-48 producing <i>Klebsiella 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.



## NORSK

### 1. Tiltent bruk

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit er designet for spesifikk påvisning og differensiering av *vanA*- og *vanB*-gener, som kan knyttes til vankomycinresistente enterokokker (VRE) direkte fra perianal- og/eller rektalprøvepensler og kolonier. Denne testen er ment som en hjelp i identifikasjonen ved identifisering av vankomycinresistente organismer i kombinasjon med pasientens kliniske tegn og symptomer samt epidemiologiske risikofaktorer. Analysen bruker BD MAX™-systemet til automatisert ekstraksjon av DNA og påfølgende sanntids PCR ved bruk av de medfølgende reagensene kombinert med universale reagenser og forbruksmaterieell for BD MAX™-systemet. DNA fra perianal- og/eller rektalprøvepensler og kolonier påvises ved hjelp av fluorescerende reporterfargeprober som er spesifikke for *vanA*- og *vanB*-gener.

### 2. Sammendrag og forklaring

Enterokokker er vanlige kommensale organismer som finnes i tarmen og kvinnelige kjønnsorganer. De er nylig anerkjent som opportunistiske patogener som forårsaker sykehusinfeksjoner slik som urinveisinfeksjoner, hudinfeksjoner, luftveisinfeksjoner, endokarditt og sepsis hos vertspersonen.

Vancomycin er et glykopeptid-antibiotikum som hemmer celleveggsyntese og brukes til å behandle alvorlige infeksjoner forårsaket av Gram-positive bakterier. Vankomycinresistente enterokokker (VRE) ble først rapportert i England og Frankrike i 1986 og finnes i dag på sykehus over hele verden.

Vankomycinresistens er en kompleks kompress, og den krever tilstedeværelse av ulike gengrupper. Disse kan hovedsakelig deles inn i to typer, avhengig av pentapeptid-forløperne som produseres av genene for vankomycinresistens; forløperer som slutter med D-Alanine-D-Serine (*VanC*-, *VanE*-, *VanG*-, *VanL*- og *VanN*-typer) eller som slutter med D-Alanine-D-Lactate (*VanA*-, *VanB*-, *VanD*- og *VanM*-typer). Disse pentapeptid-forløperne har vist lav affinitet for glykopeptidene og resulterende vankomycinresistens hos enterokokker.

Den første typen av vankomycinresistens hos enterokokker er iboende resistens (dvs. assosiert med *vanC*-genet). Isolater av *Enterococcus gallinarum* og *E. casseliflavus*/*E. flavescens* viser iboende lavnivå vankomycinresistens. Den andre typen er tilegnet resistens (dvs. *vanA*- eller *vanB*-gener), og enterokokker kan bli resistente gjennom tilegning av mobile, genetiske elementer (transposoner og plasmider) fra en annen *Enterococcus*-art eller -organisme. Denne resistensen ses vanligvis i *E. faecium* og *E. faecalis*, men har også blitt observert i *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* og flere andre enterokokkarter. *vanA*- og *vanB*-genene er ansvarlige for høye eller moderate nivåer av vankomycinresistens.

Overføring av vankomycinresistente enterokokker (VRE) kan forekomme gjennom direkte kontakt med kroppsvæsker fra koloniserte eller infiserte pasienter (blod, sårveske, urin, avføring, septum m.fl.) eller gjennom indirekte kontakt via hendene til helsepersonell, eller via kontaminert utstyr brukt til pasientpleie eller overflater i omgivelsene.



Til å begynne med ble det brukt en kulturbasert screeningmetode. Denne metoden var tidkrevende og tok vanligvis mellom en og fem dager å fullføre. Sanntids PCR-analyser er dokumentert å være et verktøy for påvisning av klinisk relevante gener assosiert med vankomycinresistens.

### 3. Grunnleggende prosedyre

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit er beregnet på identifisering og differensiering av DNA fra vankomycinresistente enterokokker og andre organismer som bærer de vankomycinresistente genene *vanA* og *vanB*. Etter DNA-isolering utføres identifisering av vankomycinresistens gjennom amplifisering av et konservert område av *vanA*- og *vanB*-genene, ved bruk av av spesifikke primere og en fluorescensmerket probe.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit er basert på 5'-eksonuklease-aktiviteten til DNA-polymerase. Under DNA-amplifikasjon kløver dette enzymet proben som er bundet til den komplementære DNA-sekvensen, og skiller quencher-fargen fra reporterfargen. Denne reaksjonen genererer en økning i fluorescenssignalet som er proporsjonal med kvantiteten av målmalen. Denne fluorescensen måles av BD MAX™-systemet.

Hvert rør i VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit inneholder alle komponenter som behøves for sanntids PCR-analyse (spesifikke primere/prober, dNTP-er, buffer og polymerase) i et stabilisert format samt en intern kontroll til monitorering av PCR-hemming. *vanA*-gener amplifiseres og påvises i kanal 475/520, og *vanB*-gener i kanal 585/630 og den interne kontrollen (IC) i kanal 530/565.

### 4. Reagenser som følger med

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit inkluderer følgende materialer og reagenser, nærmere beskrevet i tabell 1:

Referanse	Reagens/materiale	Beskrivelse	Farge	Mengde
VS-VAN112	<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube	En blanding av enzymer, primere, prober, buffere, dNTP-er, stabilisatorer og intern kontroll i et stabilisert format	Transparent blå folie	2 poser à 12 rør
VS-RB08	Rehydration Buffer tube	Løsning til rekonstituering av det stabiliserte produktet	Gjennomsiktig rustrød folie	1 pose à 24 rør

Tabell 1. Reagenser og materialer som følger med VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit med ref. VS-VAN124.

### 5. Reagenser og utstyr som må skaffes av brukeren

Følgende liste inneholder materialene og utstyret som kreves til bruken, men som ikke er inkludert i VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Sanntids PCR-instrument: BD MAX™-system.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (ref:442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (ref: 437519).
- Vortex.





- Mikropipetter (nøyaktighet mellom 2 og 1000 µl)
- Nukleasefritt vann
- Filterspisser
- Pudderfri engangshansker

## 6. Transport- og lagringsforhold

- Settene kan sendes og oppbevares ved 2–40 °C inntil utløpsdatoen som er angitt på etiketten.
- Etter åpning av aluminiumsposene med reaksjonsrørene kan disse brukes i opptil 28 dager.

## 7. Forholdsregler for brukere

- Til diagnostisk bruk *in vitro*.
- Ikke bruk reagenser og/eller materialer som er gått ut på dato.
- Ikke bruk settet hvis etiketten som forsegler ytteresken er brutt.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesesken er åpen eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesposene er åpne eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis reagensposene ikke har tørkemiddel eller hvis tørkemiddelet er ødelagt.
- Ikke fjern tørkemiddelet fra reagensposene.
- Beskyttelsesposene til reagensene skal lukkes med lynlåsen umiddelbart etter hver bruk. Fjern all overflødig luft i posene før de forsegles.
- Må ikke brukes hvis folien er revnet eller ødelagt.
- Ikke bland reagenser fra forskjellige poser og/eller sett og/eller loter.
- Beskytt reagenser fra fuktighet.
- Oppbevar komponentene beskyttet mot lys.
- I tilfeller der andre PCR-tester utføres i det samme generelle området av laboratoriet, må det utvises forsiktighet for å unngå kontaminering av VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit eventuelle andre reagenser som kreves for testing samt BD MAX™-systemet. Du må skifte hansker før du håndterer reagenser og kassetter.
- Benytt en enveis arbeidsflyt. Den skal starte i ekstraksjonsområdet og deretter gå videre til amplifikasjons- og påvisningsområdet. Prøver, utstyr og reagenser må ikke returneres til området der det forrige trinnet ble utført.
- Følg god laboratoriepraksis. Bruk verneklær, engangshansker, vernebriller og maske. Ikke spis, drikk eller røyk på arbeidsområdet. Vask hendene etter å ha fullført testen.
- Prøvene må behandles som potensielt smittfarlige, i likhet med alle reagenser og materialer som har blitt eksponert for prøvene, og må håndteres i henhold til nasjonale sikkerhetsregler. Ta nødvendige forholdsregler under innsamling, oppbevaring, behandling og kassering av prøver.
- Regelmessig dekontaminering av annet vanlig utstyr som brukes er anbefalt, spesielt mikropipetter og arbeidsflater.
- Konsulter brukerhåndboken for BD MAX™-systemet for ytterligere advarsler, forsiktighetsregler og prosedyrer.



## 8. Testprosedyre

### 8.1. INNSAMLING, OPPBEVARING OG TRANSPORT AV PRØVER

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit er validert på perianal- og/eller rektalprøvepensler som umiddelbart ble plassert i ESwab™-transportbeholdere (flytende Amies-basert innsamlings- og transportsystem (Copan, Italia). VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit er også validert på koloniløsning.

Innsamling, oppbevaring og transport av prøver skal utføres under de forhold som valideres av brukeren.

Generelt skal perianal- og/eller rektalprøvepensler samles inn og merkes på egnet måte i rent ESwab™-transportmedium og behandles snarest mulig for å garantere kvaliteten av testen. Prøvene må transporteres i henhold til lokale og nasjonale regler for transport av patogen materiale. For langvarig transport (over 24 timer) anbefaler vi forsendelse ved  $\leq -20$  °C. Prøvene kan oppbevares ved 25 °C i opptil 24 timer, 2 til 8 °C i opptil 144 timer (6 dager) eller i fryser ved -20 °C i opptil 196 timer (8 dager). Gjentatte sykluser med frysing/tinging bør unngås for å forhindre forringelse av prøven og nukleinsyrene.

### 8.2. KLARGJØRING AV PRØVER OG DNA-EKSTRAKSJON

Klargjør prøven i henhold til anbefalingene i bruksanvisningen for ekstraksjonssettet som blir benyttet, BD MAX™ ExK™ TNA-2. Merk at enkelte andre prøver kan kreve forbehandling. Prosedyrer for klargjøring til ekstraksjon i samsvar med den spesifikke anvendelsen skal utvikles og valideres av brukeren.

1. Copan ESwab™: Pipetter 200 µl av ESwab™-prøven ned i et BD MAX™ TNA-2 prøvebufferrør og lukk røret med en membranhet. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Neste steg er BD MAX™-systemet.
2. Kolonier: Hent opp to kolonier fra det dyrkede mediet, og løs dem opp i 500 µl nukleasefritt vann. Bruk vorteksmikser for å sikre fullstendig blanding. Tilsett 10 µl av suspensjonen i et BD MAX™ TNA-2 prøvebufferrør og lukk røret med en membranhet. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Neste steg er BD MAX™-systemet.

### 8.3. PCR-PROTOKOLL

Merk: Se brukerhåndboken for BD MAX™-systemet for detaljerte instruksjoner.

#### 8.3.1. Opprette et PCR-testprogram for VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit

Merk: Hvis du allerede har opprettet testen for VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection, kan du hoppe over trinn 8.3.1 og gå direkte til 8.3.2.

- 1) Velg fanen "Test Editor" (Testredigering) på skjermen "Run" (Kjør) på BD MAX™-systemet.
- 2) Klikk på knappen "Create" (Opprett).
- 3) Skriv navnet på testen din i vinduet "Test Name" (Testens navn): f.eks. VIASURE *Vancomycin resistance*.



- 4) På nedtrekksmenyen "Extraction Type" (Ekstraksjonstype), velg "ExK TNA-2".
- 5) På nedtrekksmenyen "Master Mix Format", velg "Type 5".
  - a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med en ytterligere VIASURE for BD MAX-test. I så fall må du velge "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)).
- 6) Under "Sample extraction parameters" (Prøveekstraksjonsparametere), velg "User defined" (Brukerdefinert) og tilpass prøvevolumet til 500 µl.
- 7) Under "Ct Calculation" (Ct-beregning), velg "Call Ct at Threshold Crossing" (Angi Ct ved terskelkryssing).
- 8) Oppgi følgende parametere i fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger): "Channel Settings" (Kanalinnstillinger), "Gains" (Forsterkning) og "Threshold" (Terskel) (tabell 2).
  - a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med en ytterligere VIASURE for BD MAX-test. I så fall må "PCR settings" (PCR-innstillinger) og "Test Steps" (Testtrinn) fylles ut for posisjon 2 (grønn) og posisjon 4 (blå).

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Forsterkning)	Threshold (Terskel)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (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

Tabell 2. PCR-innstillinger.

- 9) I fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger) oppgir du følgende parametere "Spectral Cross Talk" (Spektral krysstale) (tabell 3)

		False Receiving Channel (Kanal som mottar falske data)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Eksitasjonskanal)	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

Tabell 3. Parametere for spektral krysstale.

- 10) I fanen "Test Steps" (Testtrinn) oppgir du PCR-protokollen (tabell 4).



Step Name (Navn på trinn)	Profile Type (Profiltype)	Cycles (Sykluser)	Time (s) (Tid (s))	Temperature (Temperatur)	Detect (Påvis)
Initial denaturation (Innledende denaturering)	Vent	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing (Denaturering og herding)/Extension (Data collection) (forlengelse (datainnsamling))	2 - Temperatur	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabell 4. PCR-protokoll

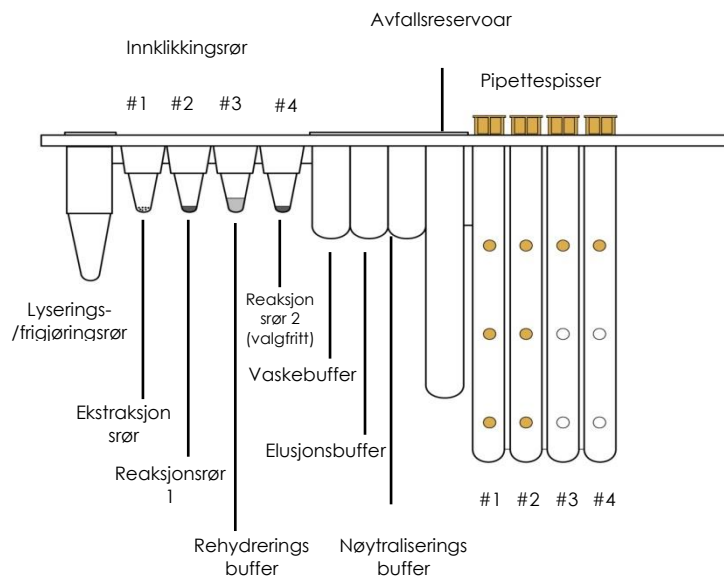
- 11) Klikk på knappen "Save test" (Lagre test).

### 8.3.2. Sette opp BD MAX™-stativet

- 1) For hver prøve som skal testes, ta ut en separat modulreagensstrimmel fra BD MAX™ ExK TNA-2 Kit. Bank forsiktig hver strimmel mot en hard overflate for å sikre at alle væskene ligger i bunnen av rørene, og sett den i BD MAX™-systemets prøvestativ.
- 2) Ta ut nødvendig antall BD MAX™ ExK TNA-ekstraksjonsrør (B4) (hvit folie) fra beskyttelsesposen. Klikk ekstraksjonsrøret(ene) (hvit folie) på plass i deres respektive posisjoner i TNA-strimmelen (posisjon 1, hvit fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lynlåsen.
- 3) Fastslå og adskill egnet antall VIASURE *Vancomycin resistance* reaction tubes (blå folie), og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 2, grønn fargekode på stativet. Se figur 1.)
  - a. Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lynlåsen.
  - b. For riktig rehydrering må du passe på at det frysetørkede produktet er i bunnen av røret og ikke har festet seg til det øverste området av røret eller til folietetningen.
    - i. Merk: Hvis du velger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)) (avsnitt 8.3.1), må du fastslå og adskille egnet antall ekstra VIASURE-reaksjonsrør (forskjellig folie) og klikke dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 4, blå fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lynlåsen.
- 4) Ta ut nødvendig antall Rehydration Buffer tubes (rustrød folie) og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 3, uten fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lynlåsen.
  - a. For å sikre riktig overføring må du passe på at væsken er i bunnen av røret og ikke har festet seg øverst i røret eller til folietetningen.



Figur 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) fra BD MAX™ ExK TNA-2 Kit.



### 8.3.3. Sette opp BD MAX™-instrumentet

- 1) Velg fanen "Work List" (Arbeidsliste) på skjermen "Run" (Kjør) i BD MAX™-systemets programvare v4.50A eller nyere.
- 2) I nedtrekksmenyen "Test", velg VIASURE *Vancomycin resistance* (hvis den ikke allerede er opprettet, se avsnitt 8.3.1).
- 3) Velg riktig lotnummer for settet (du finner det på ytteresken til ekstraksjonssettet som brukes) fra nedtrekksmenyen (valgfritt).
- 4) Oppgi ID-nummeret til prøvebufferrøret i vinduet "Sample Tube" (prøverør) i Worklist (Arbeidsliste), enten ved å skanne strekkoden eller ved å skrive det inn manuelt.
- 5) Fyll ut prøve-/pasient-ID og/eller vinduet "Accession" (Tilgang) i Worklist (Arbeidsliste) og klikk på knappen "Save" (Lagre). Fortsett helt til du har lagt inn alle prøvebufferrørene. Sørg for at prøve-/pasient-ID og prøvebufferrørene samsvarer.
- 6) Plasser det klargjorte prøvebufferrøret i BD MAX™-stativet(ene).
- 7) Plasser stativet(ene) i BD MAX™-systemet (Stativ A settes på venstre side av BD MAX™-systemet og stativ B settes på høyre side).
- 8) Plasser påkrevd antall BD MAX™ PCR Cartridge(s) i BD MAX™-systemet.
- 9) Lukk igjen døren på BD MAX™-systemet.
- 10) Klikk på "Start Run" (Start kjøring) for å begynne prosedyren.

### 8.3.4. BD MAX™-rapport

- 1) Gå til hovedmenyen og klikk på knappen "Results" (Resultater).
- 2) Enten dobbeltklikk på kjøringen din i listen eller trykk på knappen "View" (Vis).
- 3) Klikk på "Print" (Skriv ut), og velg: "Run Details, Test Details and Plot..." (Kjøringsdetaljer, testdetaljer og plott ...)



- 4) Klikk på knappen "Print or Export" (Skriv ut eller eksporter) på skjermen "Run Reports" (Kjøringsrapporter).

## 9. Tolkning av resultater

For en detaljert beskrivelse av hvordan man analyserer dataene, se brukerhåndboken for BD MAX™-systemet.

Dataanalysen utføres av BD MAX™-programvaren i henhold til produsentens instruksjoner. BD MAX™-programvaren rapporterer Ct-verdier og amplifikasjonskurver for hver detektorkanal for hver prøve som testes, på følgende måte:

- En Ct-verdi på 0 indikerer at programvaren ikke beregnet noen Ct-verdi med den angitte terskelen (se tabell 2). En amplifikasjonskurve av prøven som viser en Ct-verdi på 0, må sjekkes manuelt.

En Ct-verdi på -1 indikerer at det ikke har funnet sted noen amplifikasjonsprosess.

Alle andre Ct-verdier må tolkes i sammenheng med amplifikasjonskurven og i henhold til retningslinjene for tolkning av prøver som er angitt i tabell 5.

Sjekk det interne kontrollsignalet for å kontrollere at amplifikasjonsblandingen fungerer som den skal. Sjekk også at det ikke finnes noen rapport om systemfeil i BD MAX™-systemet.

-Bruk tabellen under til å lese av og analysere resultatene:

vanA-gen (475/520)	vanB-gen (585/630)	Intern kontroll (530/565)	Tolkning
-	-	+	<b>vanA og vanB negativ</b>
+	+	+/-	<b>vanA og vanB positiv</b>
+	-	+/-	<b>vanA positiv, vanB negativ</b>
-	+	+/-	<b>vanB positiv, vanA negativ</b>
-	-	-	<b>UNR = Uavklart resultat oppnådd på grunn av hemmere i PCR-reaksjonen eller når det oppstår et generelt problem (ikke rapportert av en feilkode) med prøvebehandlings- eller forsterkningstrinn.</b>
IND	IND	IND	<b>IND = Ubestemmelig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™. Analyseresultatet vises i tilfeller med instrumentfeil knyttet til en feilkode.</b>
INC	INC	INC	<b>INC = Ufullstendig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™. Analyseresultatet vises i tilfeller med ikke fullført kjøring.</b>

Tabell 5. Tolkning av prøve

+: Amplifikasjon fant sted

-: Ingen amplifikasjon fant sted

En prøve anses som positiv hvis oppnådd Ct-verdi er under 40. Den interne kontrollen kan vise et amplifikasjonssignal, men ikke alltid, da et høyt kopianntall for målet kan forårsake preferensiell amplifikasjon av målspesifikke nukleinsyrer i stedet for av den interne kontrollen. I slike tilfeller er det ikke nødvendig med påvisning av den interne kontrollen.



En prøve anses som negativ hvis prøven ikke viser noe amplifikasjonssignal i påvisningssystemet og den interne kontrollen er positiv. Hemming av PCR-reaksjonen kan utelukkes hvis den interne kontrollen amplifiseres.

I tilfelle av uavklarte resultater (UNR), fravær av signal for intern kontroll i en negativ prøve, anbefales det å gjenta analysen i henhold til indikasjonene nedenfor:

#### PROSEDYRE FOR REPETISJONSTEST

MERK: Det er tilstrekkelig volum i Sample Buffer Tube til én repetisjonstest. For BD MAX Sample Buffer Tubes som har vært lagret ved 2–8 °C eller 25 °C, må repetisjonstesting utføres innen 24 timer.

MERK: Nye prøver kan testes i samme kjøring som repetisjonsprøver.

Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med sykehistorikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.

## 10. Testens begrensninger

- Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med sykehistorikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.
- Selv om denne analysen kan brukes med andre typer prøver, har den blitt validert med perianal- og/eller rektalprøvepensler innsamlet ved bruk av ESwab™-transportmedium og kolonisuspensjon.
- Kvaliteten på testen avhenger av kvaliteten på prøven. Nukleinsyre må ekstraheres på riktig måte fra perianal- og/eller rektalprøvepensler og kolonier. Uegnet innsamling, oppbevaring og/eller transport av prøver kan gi falske negative resultater.
- Ekstremt lave målnivåer som ligger under påvisningsgrensen vil muligens bli påvist, men resultatene vil ikke kunne reproduseres.
- Det finnes en mulighet for falske positive resultater grunnet krysskontaminering av vankomycinresistens-prøver som inneholder høye konsentrasjoner av mål-DNA eller kontaminering grunnet PCR-produkter fra tidligere reaksjoner.
- I tilfelle av uavklarte, ubestemte eller ufullstendige resultater ved bruk av VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, må testen gjentas. Uavklarte resultater kan skyldes tilstedeværelse av hemmere i prøven eller en ukorrekt rehydrering av røret med lyofilisert reaksjonsblanding. Hvis det oppstår instrumentsvikt, vil resultatene som oppnås være ubestemte eller ufullstendige.

## 11. Kvalitetskontroll

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit inneholder en intern kontroll (IC) i hvert reaksjonsrør som bekrefter at teknikken fungerer som den skal.



## 12. Ytelseegenskaper

### 12.1. Klinisk sensitivitet og spesifisitet

Den kliniske ytelsen til VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit ble testet ved bruk av 216 prøver (friske rektalprøver innsamlet ved bruk av ESwab™) fra pasienter (spedbarn og voksne) med mistenkt VRE-infeksjon. Disse resultatene ble sammenlignet med resultatene oppnådd i intern sanntids PCR-analyse og anrikingskultur. Intern sanntids PCR tilpasset til BD MAX™ System påviser *E. faecalis*, *E. faecium* og *vanA*- og *vanB*-genene.

		Intern sanntids PCR-analyse		
		+	-	Totalt
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit	+	82*	0	82
	-	0	134	134
	Totalt	82	134	216

Tabell 6. Sammenligningsresultater for *vanA*-gen.

\*17/82 pasienter koinfisert med *Enterococcus faecium* av typene *vanA* og *vanB*. VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit kan gi korrekt samtidig påvisning av *vanA*- og *vanB*-gener i kliniske prøver.

		Intern sanntids PCR-analyse		
		+	-	Totalt
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit	+	53*	1#	54
	-	0	162	162
	Totalt	53	163	216

Tabell 7. Sammenligningsresultater for *vanB*-gen.

\*17/53 pasienter koinfisert med *Enterococcus faecium* av typene *vanA* og *vanB*. VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit kan gi korrekt samtidig påvisning av *vanA*- og *vanB*-gener i kliniske prøver.

# Denne prøven var negativ for vankomycinresistens ved bruk av WGS-analyse (helgenomsekvensering).

Sensitivitet (SE) og spesifisitet (SP) for VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit sammenlignet med intern sanntids PCR-analyse er oppgitt i neste tabell:

Gen for vankomycinresistens	SE (%)	SP (%)
<i>vanA</i>	>99,9	>99,9
<i>vanB</i>	>99,9	99,4

Tabell 8. Verdier for sensitivitet (SE) og spesifisitet (SP) for VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit.



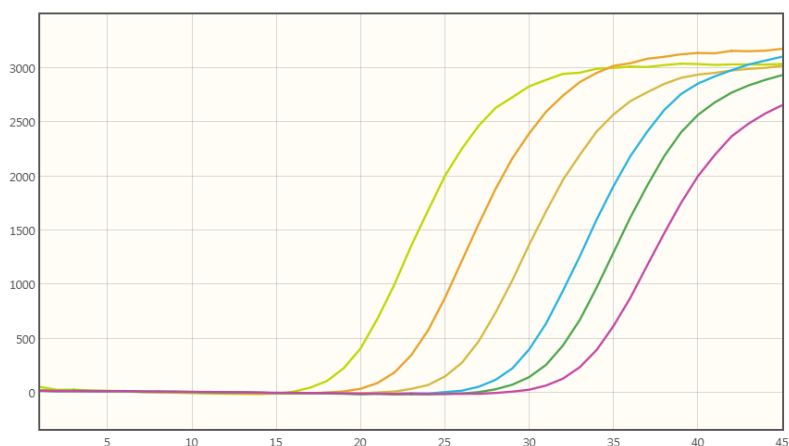


Resultatene viser en høy sensitivitet og spesifisitet for påvisning av *vanA*- og *vanB*-gener ved bruk av VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

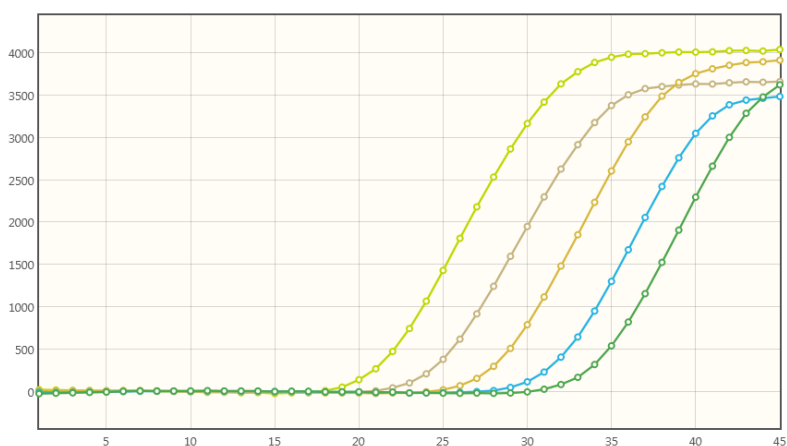
## 12.2. Analytisk sensitivitet

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit har en påvisningsgrense på  $\geq 4$  kolonidannende enhet (CFU) per reaksjon (CFU/reaksjon) for *vanA* og  $\geq 10$  CFU/reaksjon for *vanB* med en positiv rate på  $\geq 95$  %.

Figur 2. Fortynningsserie med *vanA*-gen ( $3,62 \cdot 10^4$ - $3,62$  CFU/reaksjon) med mal kjørt på BD MAX™-systemet (kanal 475/520 (FAM)).



Figur 3. Fortynningsserie med *vanB*-gen ( $5,65 \cdot 10^4$ - $9,98$  CFU/reaksjon) med mal kjørt på BD MAX™ System (kanal 585/630 (ROX)).



## 12.3. Analytisk spesifisitet

Spesifisiteten til vankomycinresistens-analysen ble bekreftet ved å teste et panel bestående av forskjellige organismer resistente mot antimikrober og ulike mikroorganismer som representerer de vanligste enteriske patogener eller flora som finnes i tarmen. Ingen krysreaktivitet ble påvist mellom noen av de følgende testede mikroorganismene, bortsett fra målpatogenene for hver analyse:



Test av kryssreaktivitet					
Adenovirus, serotyper 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	TEM-1 (ikke-ESBL)-, SHV-1 (ikke-ESBL)-, CTX-M-2 (ESBL)- og KPC-2-produserende <i>Klebsiella pneumoniae</i> -isolat	-
<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 og 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- og VanC-type <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>	-	Enterohemoragisk <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
VIM-1-produserende <i>Citrobacter braakii</i> -isolat	-	Enteroinvasiv <i>Escherichia coli</i>	-	Sapovirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Enteropatogenisk <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
KPC-3- og VIM-4-produserende <i>Citrobacter freundii</i> -kompleksisolat	-	Enterotoksigenisk <i>Escherichia coli</i>	-	OXA-48-produserende <i>Serratia marcescens</i> -isolat	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	OXA-244-produserende <i>Escherichia coli</i> -isolat	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	TEM-1 (ikke-ESBL)- og IMP-1-produserende <i>Escherichia coli</i> -isolat	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	Meticillinresistent <i>Staphylococcus aureus</i> (mecC)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Meticillinresistent <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)-stamme N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	Meticillinresistent <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Meticillinresistent <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)-stamme (oxa <sup>R</sup> , PVL-positive, spa-type t310)	-
SHV-12 (ESBL)-, CTX-M-9 (ESBL)- og OXA-48-produserende <i>Enterobacter cloacae</i> -isolat	-	<i>Helicobacter pylori</i> klaritromycinresistent (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
TEM-1 (ikke-ESBL)-, SHV-12 (ikke-ESBL)-, CTX-M-15 (ESBL)- og NDM-1-produserende <i>Enterobacter cloacae</i> -isolat	-	<i>Helicobacter pylori</i> klaritromycinresistent (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
NDM-7-produserende <i>Enterobacter cloacae</i> -kompleksisolat	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
VanA-type <i>Enterococcus avium</i>	+ / -	SHV-1 (ikke-ESBL)-, KPC-3 og OXA-48-produserende <i>Klebsiella pneumoniae</i> -isolat	-		

Tabell 9. Patogen mikroorganisme benyttet som referanse i denne studien.



## 12.4. Analytisk reaktivitet











Reaktiviteten til VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit for *vanA*-genet ble evaluert opp mot *vanA*-type *Enterococcus avium*-, *vanA*-type *Enterococcus faecalis* (NCTC 13632, NCTC 12201)- og *vanA*-type *Enterococcus faecium* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202)-stammer, og viste positive resultater.

Reaktiviteten til VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit for *vanB*-genet ble evaluert opp mot *vanB*-type *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299, CECT 8120)-, *vanB*-type *Enterococcus faecium* (IOWA 2)- og *vanB*- og *vanC* *Enterococcus gallinarum* (ENT20120142)-stammer, og viste positive resultater.

## 13. Bibliography/ Litteratur

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/ Symboler for IVD-komponenter og reagenser

 In vitro diagnostic device In vitro-diagnostisk enhet	 Keep dry Holdes tørr	 Use by Brukes innen	 Manufacturer Produsent	 Batch code (Lot) Partikode (lot)
 Consult Instructions for Use Les instruksjonene før bruk	 Temperature limitation Temperaturgrenser	 Contains sufficient for <n> test Inneholder nok til <n> tester	 Sample diluent Prøvediluent	 Catalognumber Katalognummer

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

ESwab™ is a registered trademark of COPAN Diagnostics Inc.





**CerTest Biotec, S.L.**

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



VIASURE online

F-362 rev01

**VIASURE**



Real Time PCR Detection Kits

**CerTest**  
BIOTEC