

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Vancomycin resistance
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Tyto pokyny platí pro následující odkaz na výrobek:

PRODUCT / ODKAZ NA	REFERENCE / VÝROBEK
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit	444202 / VS-VAN124

Table A 1. Reference for product to be used with the BD MAX™ System. / Odkaz na výrobek pro použití se systémem BD MAX™ System.

Content

1.	Intended use.....	5
2.	Summary and Explanation	5
3.	Principle of the procedure	6
4.	Reagents provided	6
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	6
6.	Transport and storage conditions.....	7
7.	Precautions for users	7
8.	Test procedure	8
8.1.	Sample collection, transport and storage.....	8
8.2.	Sample preparation and DNA extraction	9
8.3.	PCR protocol	9
9.	Result interpretation	12
10.	Limitations of the test	13
11.	Quality control	14
12.	Performance characteristics.....	15
12.1.	Clinical sensitivity and specificity	15
12.2.	Analytical sensitivity	16
12.3.	Analytical specificity	16
12.4.	Analytical reactivity	18

Obsah

1.	Účel použití.....	19
2.	Shrnutí a vysvětlení	19
3.	Princip postupu.....	20
4.	Dodávané reagentie.....	20
5.	Reagentie a vybavení, které dodá uživatel	20
6.	Přepravní a skladovací podmínky	21
7.	Bezpečnostní opatření pro uživatele	21
8.	Postup testování.....	22
8.1.	Odběr, přeprava a uchovávání vzorku	22
8.2.	Příprava vzorku a extrakce DNA.....	23
8.3.	Protokol PCR	23

9.	Interpretace výsledků	26
10.	Omezení testu.....	28
11.	Kontrola kvality	29
12.	Výkonové charakteristiky	29
12.1.	Klinické senzitivita a specificita	29
12.2.	Analytická senzitivita.....	30
12.3.	Analytická specificita	30
12.4.	Analytická reaktivita	32
	Bibliography/Literatura	33
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboly pro komponenty IVD a reagentie	33
	Trademarks.....	33

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 the extraction process and/or inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
Vancomycin resistance genes	475/520	<i>vanA</i>
Vancomycin resistance genes	585/630	<i>vanB</i>
Internal control (IC)	530/565	-

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 2:

Reagent/Material	Description	Barcode	Amount
<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	1B foil	2 pouches of 12 transparent tubes
Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	11 foil	1 pouch of 24 transparent tubes

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit with Cat. N°.VS-VAN124 (444202).

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: 442825 or 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

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- For *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. 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. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges.
- To avoid contamination of the environment by amplicons, do not break apart the BD MAX™ PCR Cartridge after use. The seals of the BD MAX™ PCR Cartridge are designed to prevent contamination.
- 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, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, 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, transport, storage, handling, and disposal of samples.

- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP) or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. Sample collection, transport and storage

The VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit has been tested 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 tested on colony suspension. Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of 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 should be transported at 2 to 8°C for up to 24 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 24 hours), we recommend shipping at $\leq -20^{\circ}\text{C}$ or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 25°C for up to 24 hours, 2 to 8°C for up to 144 hours (6 days), frozen at -20°C for up to 192 hours (8 days) or ideally at -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The faecal specimens must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the CDC guideline (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) and the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

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™ sample into a BD MAX™ ExK™ 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™ ExK™ 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 test for the VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, 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 Basic Information tab, within 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) If running software version 5.00 or higher, in the "Custom Barcodes" select the following configuration:
 - a. Snap-In 2 Barcode: 1B (concerning Vancomycin resistance reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube)
 - c. Snap-In 4 Barcode: another VIASURE reaction tube (different foil) if you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1).

- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 3).

- 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-In 2 (green) and Snap-In 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 3. PCR settings.

Note: It is recommended to set the minimum threshold values listed above for each channel as a starting point, but the final settings must be determined by the end-user during the result interpretation in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

- 10) In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 4), 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 4. Spectral cross-talk parameters.

- 11) In "Test Steps" tab, enter the PCR protocol (Table 5).

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 5. PCR protocol.

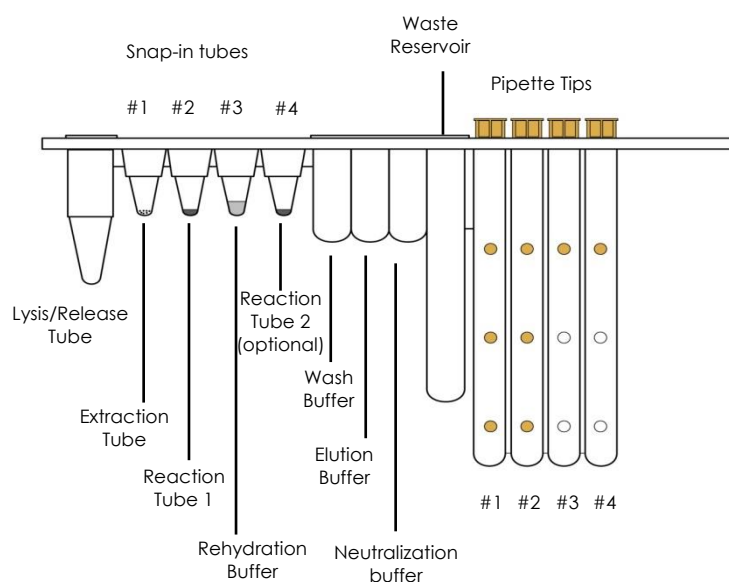
- 12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- For each sample 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.
- 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 *Vancomycin resistance* reaction tubes (1B 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. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
 - 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 (1I 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. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the buffer is at the bottom of the tube.

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 3). 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 6.

Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. In addition, check that there is no report of BD MAX™ System failure.

-Results should be read and analyzed using the following table:

vanA gene (475/520)	vanB gene (585/630)	Internal control (530/565)	Interpretation
+	+	+/- ¹	vanA and vanB genes DNA Detected¹
+	-	+/- ¹	vanA gene DNA Detected, vanB gene DNA Not Detected¹
-	+	+/- ¹	vanB gene DNA Detected, vanA gene DNA Not Detected¹
-	-	+ ²	vanA and vanB genes DNA Not Detected²
-	-	- ²	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.²
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 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

1 A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40. The Internal Control (IC) may or may not show an amplification signal. Sometimes, the IC detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

2 A sample is considered negative if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive (Ct less than 40). 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

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user; to verify the correct performance of each qPCR steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.

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.
- For good test performance, the lyophilized product should be at the bottom of the tube and not adhered to the top area of the tube or the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- 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.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- 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.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).
 - Degradation of the DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown *vanA* gene and/or *vanB* gene variants.
 - A vancomycin resistance organism load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- A negative IC signal does not preclude the presence of *vanA* gene and/or *vanB* gene DNA in a clinical specimen.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable vancomycin resistance organism and does not imply that these organisms are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targets vancomycin resistance sequences.
- Negative results do not preclude vancomycin resistance organism infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions.
- 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 clinical specimens (rectal swabs) from patients with suspected VRE infection. The results were as follows:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	Clinical Microbiology, Centre for Infectious Diseases and Microbiology Laboratory services, NSW Health Pathology, Westmead Hospital (Sydney, Australia)	Rectal swab	BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System	VanA gene
				VanB gene
				VanA + VanB genes

Table 7. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity and specificity values for VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity
1	In-house PCR VRE (Westmead – WMD)	VanA	65	151	0	0	100% (93%-100%)	100% (96%-100%)
		VanB	36	179	1	0	100% (87% - 100%)	99% (96%-100%)
		VanA+VanB	17	199	0	0	100% (97% - 100%)	100%(97% -100%)

Table 8. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity and specificity for VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Results show high agreement to detect *vanA* and *vanB* genes using VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

In addition to this, the sample processing control failure rate was calculated. The initial number of unresolved reactions (UNR) was 3 (Initial UNR rate: 1.39%). The number of UNR after repetition was 0 (Final UNR rate: 0.00%).

In order to evaluate the compatibility of VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit adapted for BD MAX™ with other different matrix samples, an evaluation to verify the detection of vancomycin-resistant enterococci colonies suspensions was carried out.

Different colonies suspensions were prepared by adding two colonies of a determinate culture in 500 µl nuclease-free water. The strains used for this evaluation were CECT 5253 *Enterococcus faecium vanA*, CECT 8120 *Enterococcus faecalis vanB*, NCTC 12201 *Enterococcus faecalis vanA*, and NCTC 13632 *Enterococcus faecalis*

vanA. A volume of 10 µl of each colonies suspensions was added directly to the sample buffer tube. The flowchart used to carry out this evaluation was: BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System.

The obtained results showed that colonies suspensions of CECT 5253, NCTC 12220, and NCTC 13632 were positive for *vanA* gene and colonies suspension of CECT 8120 was positive for *vanB* gene.

These results show that VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit can properly detect *vanA* and *vanB* genes in colonies suspensions.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 4 colony-forming unit per reaction (CFU/rxn) for *vanA* and ≥ 10 colony-forming unit per reaction (CFU/rxn) for *vanB* (Figures 2 and 3) with a positive rate of $\geq 95\%$ on perianal and rectal swabs.

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

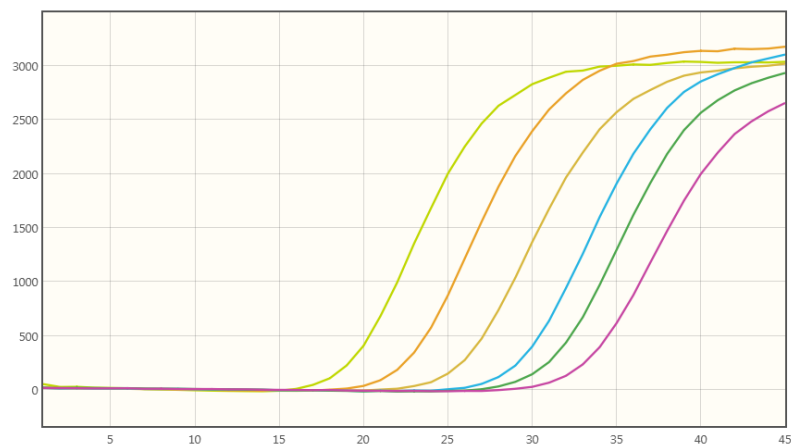
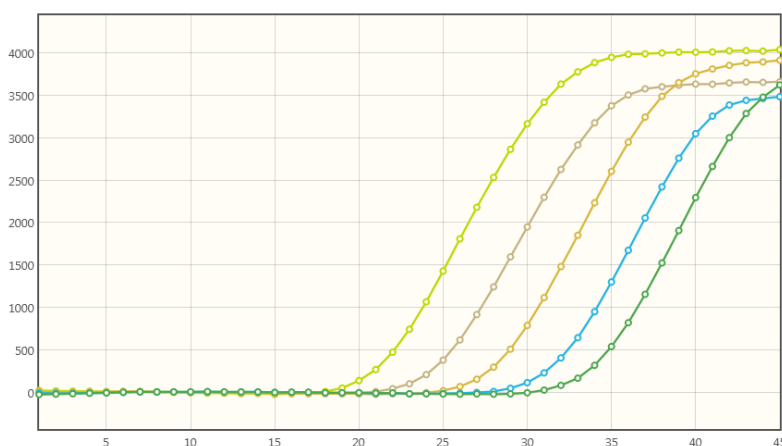


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene ($5.65 \cdot 10^4$ - 9.98 CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



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 pneumonia</i> isolate	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	VanC- type <i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	VanC2- type <i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	Norovirus GI and GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrovirus Genotype I-VIII	-	VanA-type <i>Enterococcus faecalis</i>	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	VanB-type <i>Enterococcus faecalis</i>	- / +	Rotavirus A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	VanA- type <i>Enterococcus faecium</i>	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	VanB- type <i>Enterococcus faecium</i>	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	VanB and VanC- types <i>Enterococcus gallinarum</i>	- / +	<i>Salmonella paratyphi</i> A	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	VanC – type <i>Enterococcus gallinarum</i>	-	<i>Salmonella paratyphi</i> B	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	VanC1- type <i>Enterococcus gallinarum</i>	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
VIM-1 producing <i>Citrobacter braakii</i> isolate	-	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-	Sapovirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
KPC-3 and VIM-4 producing <i>Citrobacter freundii</i> -complex isolate	-	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	-	OXA-48 producing <i>Serratia marcescens</i> isolate	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	OXA-244 producing <i>Escherichia coli</i> isolate	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	TEM-1 (non-ESBL) and IMP-1 producing <i>Escherichia coli</i> isolate	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (mecC)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) strain N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) strain (oxa ^R , PVL-positive, spa type t310)	-
SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) and OXA-48 producing <i>Enterobacter cloacae</i> isolate	-	<i>Helicobacter pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) and NDM-1 producing <i>Enterobacter cloacae</i> isolate	-	<i>Helicobacter pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
NDM-7 producing <i>Enterobacter cloacae</i> -complex isolate	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
VanA-type <i>Enterococcus avium</i>	+ / -	SHV-1 (non-ESBL), KPC-3, and OXA-48 producing <i>Klebsiella pneumonia</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 DNA extracted from *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 DNA extracted from *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.

ČESKY

1. Účel použití

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit je určen ke specifické detekci a diferenciaci genů *vanA* a *vanB*, které jsou spojeny s enterokoky rezistentními na vankomycin (VRE) přímo z perianálních a/nebo rektálních stěrů a kolonií. Tento test je určený k použití jako pomůcka v identifikaci organismů rezistentních na vankomycin v kombinaci s klinickými příznaky a příznaky a epidemiologickými rizikovými faktory. Test používá BD MAX™ System k automatizované extrakci DNA a následné PCR v reálném čase, s použitím dodávaných reagensů v kombinaci s univerzálními reagensy a spotřebním materiálem pro BD MAX™ System. DNA z perianálních a/nebo rektálních stěrů a kolonií je detekována s použitím sond s fluorescenčním reportérovým barvivem specifickým pro geny *vanA* a *vanB*.

2. Shrnutí a vysvětlení

Enterokoky a běžné cizopasně organismy vyskytující se v gastrointestinálním traktu a ženských pohlavních orgánech. Nedávno našli oportunistické patogeny, způsobující nozokomiální infekce, jako jsou infekce močového traktu, kožní infekce, respirační infekce, endokarditidu a sepsi u ohroženého hostitele.

Vankomycin je glykopeptidové antibiotikum, které inhibuje syntézu buněčné stěny při léčbě gram pozitivních bakteriálních infekcí. Enterokoky rezistentní vůči vankomycinu (VRE) byly poprvé hlášeny v Anglii a ve Francii v roce 1986 a nyní se rozšířily po nemocnicích v celém světě.

Rezistence na vankomycin je složitý proces a vyžaduje přítomnost různých genových klastrů. Dělí se hlavně na dva typy v závislosti na pentapeptidových prekurzorech produkovaných geny rezistentními na vankomycin: prekurzor se zakončením D-alanin-D-serin (typ *VanC*, *VanE*, *VanG*, *VanL* a *VanN*) nebo se zakončením D-alanin-D-laktát (typ *VanA*, *VanB*, *VanD* a *VanM*). Tyto pentapeptidové prekurzory vykazaly nízké afinity k glykopeptidům a byly hlášeny rezistence na vankomycin pro enterokoky.

Prvním typem rezistence na vankomycin u enterokoků je přirozená rezistence (tzn. spojení s genem *vanC*). Izoláty *Enterococcus gallinarum* a *E. casseliflavus/E. flavescens* vykazují přirozenou rezistenci nízké úrovně na vankomycin. Druhým typem je získaná rezistence (tzn. geny *vanA* nebo *vanB*) a enterokoky se mohou stát rezistentními získáním mobilních genetických elementů (transposonů a plasmidů) od jiných druhů *Enterococcus* nebo organismů. Nejčastěji je tato rezistence vidět u *E. faecium* a *E. faecalis*, ale byla také zjištěna u *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* a různých dalších kmenů enterokoků. Geny *vanA* a *vanB* jsou odpovědné za vysoké nebo střední úrovně rezistence na vankomycin.

K přenosu enterokoků rezistentních na vankomycin (VRE) může dojít přímým kontaktem s tělesnými tekutinami kolonizovaných nebo infikovaných pacientů (krev, výtok z rány, moč, stolice a další) nebo nepřímým kontaktem prostřednictvím rukou zdravotníků nebo kontaminovaného prostředí k péči o pacienta nebo environmentálních povrchů.

Zpočátku byla používána screeningová metoda na bázi kultivace, což je časově náročné a její provedení trvá od jednoho do pěti dnů. Bylo prokázáno, že testy PCR v reálném čase jsou nástrojem k detekci klinicky relevantních genů spojených s rezistencí na vankomycin.

3. Princip postupu

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit je určen k identifikaci a diferenciaci DNA z enterokoků rezistentních na vankomycin a dalších organismů, které jsou nositeli genů rezistence na vankomycin *vanA* a *vanB*. Po izolaci DNA se provádí identifikace rezistence na vankomycin amplifikací konzervovaného regionu genů *vanA* a *vanB* s použitím specifických primerů a fluorescenčně značené sondy.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit je na bázi 5' exonukleázové aktivity DNA polymerázy. V průběhu amplifikace DNA tento enzym štěpí sondu vázanou na komplementární sekvenci DNA a odděluje zřáhací barvivo od reportérového. Tato reakce generuje zvýšení fluorescenčního signálu, které je úměrné množství cílového templátu. Tato fluorescence je měřena na přístroji BD MAX™ System.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit obsahuje v každé zkumavce komponenty nezbytné pro test PCR v reálném čase PCR (specifické primery/sondy, dNTPS, pufr, polymerázu) ve stabilizovaném formátu a rovněž vnitřní kontrolu k monitorování procesu extrakce a/nebo inhibice polymerázové aktivity.

Cíl	Kanál	Gen
Geny rezistence na vankomycin	475/520	<i>vanA</i>
Geny rezistence na vankomycin	585/630	<i>vanB</i>
Vnitřní kontrolu (IC)	530/565	-

Tabulka 1. Cíl, kanál a geny.

4. Dodávané reagentie

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit obsahuje následující materiály a reagentie uvedené v tabulce 2:

Reagentie/materiál	Popis	Čárový kód	Množství
<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube	Směs enzymů, primerů a sond, pufru dNTP, stabilizátorů a vnitřní kontroly ve stabilizovaném formátu	1B fólie	2 sáčky po 12 průhledných zkumavkách
Rehydration Buffer tube	Roztok k rekonstituci stabilizovaného produktu	11 fólie	1 sáček s 24 průhlednými zkumavkami

Tabulka 2. Reagentie a materiály dodané ve VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit s kat. č. VS-VAN124 (444202).

5. Reagentie a vybavení, které dodá uživatel

Následující seznam obsahuje materiály a vybavení potřebné pro použití, které však nejsou obsaženy v soupravě VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Přístroj pro PCR v reálném čase: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref: 442825 nebo 442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Mikropipety (přesné v rozmezí od 2 do 1000 µl).
- Voda neobsahující nukleázu.

- Filtrační špičky.
- Bezpudivé jednorázové rukavice.

6. Přepravní a skladovací podmínky

- Soupravy lze přepravovat a uchovávat při teplotě 2-40 °C do data expirace, které je uvedeno na štítku.
- Po otevření hliníkových sáčků obsahujících reakční zkumavky lze používat až 28 dní.

7. Bezpečnostní opatření pro uživatele

- Produkt je určen pouze pro profesionální uživatele, jako jsou laboratorní nebo zdravotničtí pracovníci a laboranti vyškolení v metodách molekulární biologie.
- Pro použití k diagnostice *in vitro*.
- Nepoužívejte reagentie a/nebo materiály po datu expirace.
- Soupravu nepoužívejte, pokud je roztržený štítek, který uzavírá krabičku.
- Reagentie nepoužívejte, pokud je ochranná krabička při dodání otevřená nebo rozbitá.
- Reagentie nepoužívejte, pokud jsou ochranné sáčky při dodání otevřené nebo roztržené.
- Reagentie nepoužívejte, pokud není přítomen desikant nebo je uvnitř sáčků s reagentiemi rozsypaný.
- Neodstraňujte desikant ze sáčků s reagentiemi.
- Zavřete ochranné sáčky s reagentiemi zipovým uzávěrem okamžitě po každém použití. Před uzavřením odstraňte ze sáčků veškerý přebytečný vzduch.
- Reagentie nepoužívejte, pokud je fólie roztržená nebo poškozená.
- Nesměšujte reagentie z různých sáčků a/nebo souprav a/nebo šarží.
- Chraňte reagentie před vlhkostí. Delší vystavení působení vlhkosti může mít dopad na výkon produktu.
- Chraňte komponenty před světlem.
- Pokud se ve stejném celkovém prostoru laboratoře provádějí jiné PCR testy, je nutno věnovat péči zajištění, aby nedošlo ke kontaminaci VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit, veškerých dalších reagentií potřebných pro testování a BD MAX™ System. Vždy zabraňte mikrobiální kontaminaci reagentií a jejich kontaminaci ribonukleázou (RNázou)/deoxyribonukleázou (DNázou). Doporučuje se použití sterilních jednorázových pipetovacích špiček odolných vůči aerosolu nebo objemově dávkujících prostých RNázy/DNázy. Použijte pro každý vzorek novou špičku. Je nutno si vyměnit rukavice před manipulací s reagentiemi a kazetami.
- Nerozbíjejte po použití BD MAX™ PCR Cartridge, aby nedošlo ke kontaminaci prostředí amplikony. Utěsnění BD MAX™ PCR Cartridge je určeno k zabránění kontaminaci.
- Navrhněte jednosměrný pracovní postup. Měl by začínat v oblasti extrakce a pak se přesunout do oblasti amplifikace a detekce. Nevracejte vzorky, vybavení ani reagentie do oblastí, kde byl proveden předchozí krok.
- Dodržujte správné laboratorní postupy. Používejte ochranný oděv, jednorázové rukavice, brýle a ústenku. V pracovní oblasti nejezte, nepijte, nekuřte a neaplikujte kosmetické přípravky. Po dokončení testu si umyjte ruce.
- Se vzorky je nutno manipulovat jako s potenciálně infekčním a/nebo biologicky nebezpečným materiálem a to stejné platí pro všechny reagentie a materiály, které byly vystaveny vzorkům a je nutno s nimi zacházet podle národních bezpečnostních předpisů. Zavedte nezbytná bezpečnostní opatření v průběhu odběru, přepravy, uchovávání, manipulace a likvidace vzorků.

- Se vzorky a reagensii je nutno manipulovat v biologické bezpečnostní digestoři. Používejte osobní ochranné prostředky (OOP) vyhovující aktuálně platným předpisům pro manipulaci s potenciálně infekčními vzorky. Odpad likvidujte podle místních a státních předpisů.
- Doporučuje se pravidelná dekontaminace společně používaného vybavení, zejména mikropipet a pracovních ploch.
- V souladu s nařízením (ES) č. 1907/2006 (REACH) detekční soupravy pro PCR testy v reálném čase VIASURE nevyžadují materiálové bezpečnostní listy (Material Safety Data Sheets) vzhledem k tomu, že nejsou klasifikovány jako nebezpečné pro zdraví a životní prostředí, protože neobsahují látky a/nebo směsi, které splňují kritéria klasifikace nebezpečnosti, která uvádí Nařízení (ES) č. 1272/2008 (CLP) nebo jejichž koncentrace je vyšší než hodnota určená ve zmíněném nařízení pro jejich deklarování.
- Prostudujte si uživatelskou příručku BD MAX™ System, kde jsou uvedena další varování, bezpečnostní opatření a postupy.

8. Postup testování

8.1. Odběr, přeprava a uchování vzorku

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit byl testován na perianálních a/nebo rektálních stěrech okamžitě umístěných do transportního média ESwab™ (tekutý odběrový a transportní systém na bázi Amies) (Copan, Itálie). VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit byl také testován na suspenzi kolonií. Jiné typy vzorků musí validovat uživatel.

Odběr, uchování a přepravu vzorků je třeba provádět za podmínek validovaných uživatelem. Celkově je třeba perianální a/nebo rektální stěry odebírat a označovat patřičným způsobem do čistého transportního média ESwab™ a zpracovávat co nejdříve, aby byla zaručena kvalita testu. Vzorky je třeba přepravovat při teplotě 2 až 8 °C po dobu do 24 hodin při dodržení místních a státních předpisů pro přepravu patogenního materiálu. V případě dlouhodobé přepravy (více než 24 hodin) doporučujeme přepravovat při teplotě ≤-20 °C nebo nižší. Doporučuje se použít pro test čerstvé vzorky. Vzorky mohou být uchovávány při teplotě 25 °C po dobu 24 hodin, 2 až 8 °C po dobu do 144 hodin (6 dní) nebo zmrazené při -20 °C až 192 hodin (8 dní) nebo ideálně při -70 °C pro konzervaci. Je třeba se vyhnout opakovaným cyklům zmrazení a rozpuštění, aby nedošlo k degradaci vzorku a nukleových kyselin.

Fekální vzorky je nutno odebírat, přepravovat a uchovávat podle patřičných laboratorních zásad. Podrobnosti naleznete v zásadách CDC (Zásady pro odběr vzorků. Webová stránka <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) a v zásadách IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018)). A guide to utilization of the microbiology laboratory pro diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

8.2. Příprava vzorku a extrakce DNA

Provedte přípravu vzorku podle doporučení v návodu k použití použité extrakční soupravy BD MAX™ ExK™ TNA-2. Upozorňujeme, že jiné vzorky vyžadují přípravu před zpracováním. Je třeba, aby postupy přípravy extrakce specifické pro danou aplikaci vyvinul a validoval uživatel.

1. Copan ESwab™: Napipetujte 200 µl vzorku v ESwab™ do BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube a zavřete zkumavku víčkem se septem. Zajistěte úplné promíchání vortexováním vzorků 1 minutu při vysoké rychlosti. Pokračujte na BD MAX™ System Operation.
2. Kolonie: Odeberte dvě kolonie z kultivačního média a suspendujte je do 500 µl vody neobsahující nukleázu. Zajistěte úplné promíchání vortexováním. Přidejte 10 µl suspenze do BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube a zavřete zkumavku víčkem se septem. Zajistěte úplné promíchání vortexováním vzorků 1 minutu při vysoké rychlosti. Pokračujte na BD MAX™ System Operation.

8.3. Protokol PCR

Poznámka: Podrobné pokyny naleznete v uživatelské příručce BD MAX™ System.

8.3.1. Vytvoření programu PCR testu pro VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

Poznámka: Pokud jste již vytvořili test pro VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, můžete krok 8.3.1 přeskočit a přejít přímo ke kroku 8.3.2.

- 1) Na obrazovce „Run“ (Běh) systému BD MAX™ System zvolte záložku „Test Editor“ (Editor testu).
- 2) Klikněte na tlačítko „Create“ (Vytvořit).
- 3) V záložce Informace v okně „Test Name“ (Název testu) zadejte jméno svého test: tzn. VIASURE Vancomycin resistance.
- 4) V rozbalovací nabídce „Extraction Type“ (Typ extrakce) zvolte „ExK TNA-2“.
- 5) V rozbalovací nabídce „Master Mix Format“ (Formát Master Mix) zvolte „Type 5“ (Typ 5).
 - a. Poznámka: Produkt lze použít s dalším testem VIASURE pro BD MAX™, pak zvolte „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Duální Master Mix koncentrovaného lyofilizovaného MM s rehydratačním pufrům (typ 5)).
- 6) V položce „Sample extraction parameters“ (Parametry extrakce vzorku) zvolte „User defined“ (Definované uživatelem) a nastavte objem vzorku na 500 µl.
- 7) V položce „Ct Calculation“ (Výpočet Ct) zvolte možnost „Call Ct at Threshold Crossing“ (Volat Ct při křížení prahové hodnoty).
- 8) Pokud běží pod verzí softwaru 5.00 nebo vyšší, v položce „Custom Barcodes“ (Uživatelské čárové kódy) zvolte následující konfiguraci:
 - a. Snap-In 2 „Barcode“ (Čárový kód pozice zaklapnutí 2): 1B (ohledně Vancomycin resistance reaction tube).

- b. Snap-In 3 „Barcode“ (Čárový kód pozice zaklapnutí 3): 11 (ohledně zkumavky s rehydratačním puforem (Rehydration Buffer tube)).
- c. Snap-In 4 „Barcode“ (Čárový kód pozice zaklapnutí 4): další reakční zkumavka VIASURE (rozdílná fólie) pokud zvolíte formát „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Duální Master Mix koncentrovaný lyofilizovaný MM s rehydratačním puforem (typ 5)) (část 8.3.1).
- 9) V záložce „PCR settings“ (Nastavení PCR) zadejte následující parametry: „Channel Settings“ (Nastavení kanálu), „Gains“ (Výtěžky) a „Threshold“ (Prahová hodnota) (tabulka 3):
- a. Poznámka: Produkt lze použít v kombinaci s dalším testem VIASURE pro BD MAX™, „PCR Settings“ (Nastavení PCR) a „Test Steps“ (Kroky testu) je třeba provést pro zaklapávací pozici 2 (zelená) a zaklapávací pozici 4 (modrá).

Channel (Kanál)	Alias (Alias)	Gain (Výtěžek)	Threshold (Prahová hodnota)	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

Tabulka 3. „PCR settings“ (Nastavení PCR).

Poznámka: Doporučuje se nastavit výše uvedené prahové hodnoty pro každý kanál jako výchozí bod, ale konečná nastavení musí určit koncový uživatel v průběhu interpretace výsledků, aby bylo zajištěno, že prahové hodnoty spadají do exponenciální fáze fluorescenčních křivek a nad signál pozadí. Prahové hodnoty se mohou pro různé přístroje lišit vzhledem k různým intenzitám signálu.

- 10) V záložce „PCR settings“ (Nastavení PCR) zadejte rovněž následující parametry „Spectral Cross Talk“ (Spektrální rušení) (tabulka 4).

		False Receiving Channel (Falešně přijímající kanál)				
Channel (Kanál)		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Excitační kanál)	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	-

Tabulka 4. „Spectral cross-talk“ parametry (spektrálního křížení).

- 11) Na záložce „Test Steps“ (Kroky testu) zadejte protokol PCR (tabulka 5).

Step Name (Název kroku)	Profile Type (Typ profilu)	Cycles (Cykly)	Time (s) (Čas(y))	Temperature (Teplota)	Detect (Detekce)
Initial denaturation (Počáteční denaturace)	Výdrž	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturace a žhání/extenze (sběr dat))	2-teplota	45	10	95 °C	-
			58	60 °C	✓

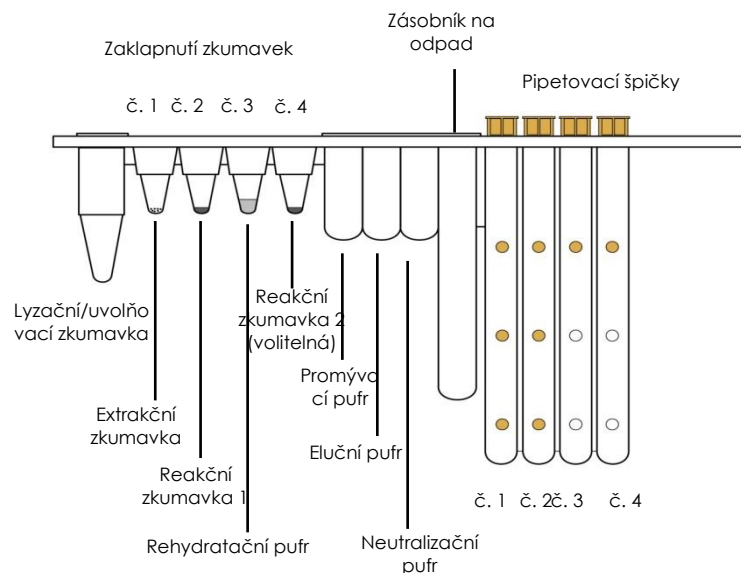
Tabulka 5. PCR protokol.

- 12) Klikněte na tlačítko „Save Test“ (Uložit test).

8.3.2. Nastavení stojanu BD MAX™

- 1) Pro každý vzorek, který má být tetován, vyjměte sjednocené reagenční proužky ze soupravy BD MAX™ ExK™ TNA-2. Jemně klepněte každým proužkem na tvrdý povrch, aby bylo zajištěno, že budou veškeré kapaliny na dně zkumavek a naplněny do stojanů na vzorky BD MAX™ System.
- 2) Vyndejte požadovaný počet BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (bílá fólie) z jejich ochranného sáčku. Zaklapněte extrakční zkumavku/y (bílá fólie) do příslušných pozic v proužku TNA (pozice zaklapnutí 1, bílé barevné označení na stojanu. Viz obrázek 1). Odstraňte přebytečný vzduch a zavřete sáček zipovým uzávěrem.
- 3) Určete a oddělte vhodný počet zkumavek *Vancomycin resistance* reaction tubes (fólie 1B) a zaklapněte je do jejich příslušných pozic v proužku (pozice zaklapnutí 2, zelené barevné označení na stojanu. Viz obrázek 1).
 - a. Odstraňte přebytečný vzduch a zavřete hliníkové sáčky zipovým uzávěrem.
 - b. Aby byla provedena správná rehydratace, zajištěte, aby byl lyofilizovaný produkt na dně zkumavky a neulpíval v horní oblasti zkumavky nebo na fóliovém uzávěru. Jemně klepněte každou zkumavkou na tvrdý povrch, aby bylo zajištěno, že bude veškerý produkt na dně zkumavky.
 - i. Poznámka: Pokud si zvolíte formát „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Duální Master Mix koncentrovaný lyofilizovaný MM s rehydratačním pufr (typ 5)) (část 8.3.1), určete a oddělte vhodný počet dalších reakčních zkumavek VIASURE (odlišná fólie) a zaklapněte je do jejich příslušných pozic (pozice zaklapnutí 4, modré barevné označení na stojanu. Viz obrázek 1). Odstraňte přebytečný vzduch a zavřete hliníkové sáčky zipovým uzávěrem.
- 4) Odeberte požadovaný počet zkumavek Rehydration Buffer tubes (folie 11) a zaklapněte je do jejich příslušných pozic v proužku (pozice zaklapnutí 3, bez barevného označení na stojanu. Viz obrázek 1). Odstraňte přebytečný vzduch a zavřete sáček zipovým uzávěrem.
 - a. Aby byl zajištěn správný transfer, zajištěte, aby byla kapalina na dně zkumavky a neulpívala v horní oblasti zkumavky nebo na fóliovém uzávěru. Jemně klepněte každou zkumavkou na tvrdý povrch, aby bylo zajištěno, že bude veškerý pufr na dně zkumavky.

Obrázek 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) ze soupravy BD MAX™ ExK™ TNA-2.



8.3.3. Nastavení přístroje BD MAX™

- 1) Na obrazovce „Run“ (Běh) softwaru BD MAX™ System v4.50A nebo vyšší zvolte záložku „Work List“ (Pracovní seznam).
- 2) V rozbalovací nabídce „Test“ (Test) vyberte možnost VIASURE *Vancomycin resistance* (pokud již není vytvořena, viz část 8.3.1).
- 3) Zvolte příslušné číslo šarže soupravy (je na vnější krabici použité extrakční soupravy) z rozbalovací nabídky (volitelně).
- 4) Zadejte identifikační číslo zkumavky s pufrem vzorku do okna „Sample Tube“ (Zkumavka vzorku) v „Work List“ (Pracovní seznam) buď načtením čárového kódu čtečkou nebo ručním zadáním.
- 5) Vyplňte ID vzorku/pacienta a/nebo okno Přístup v „Work List“ (Pracovní seznam) a klikněte na tlačítko „Save“ (Uložit). Pokračujte dokud nebudou zadány všechny zkumavky s pufrem vzorku. Zkontrolujte, zda se ID vzorku/pacienta a zkumavek s pufrem vzorku přesně shoduje.
- 6) Umístěte připravenou zkumavku s pufrem vzorku do BD MAX™ Rack(s).
- 7) Vložte stojan(y) do BD MAX™ System (stojan A je umístěn na levé straně BD MAX™ System a stojan B na pravé straně).
- 8) Umístěte požadovaný počet kazet BD MAX™ PCR Cartridge(s) do BD MAX™ System.
- 9) Zavřete dvířka BD MAX™ System.
- 10) Zahajte proceduru kliknutím na „Start Run“ (Spustit běh).

8.3.4. Zpráva BD MAX™

- 1) V hlavní nabídce klikněte na tlačítko „Results“ (Výsledky).
- 2) Buď dvojitě klikněte na svůj běh v seznamu nebo stiskněte „view button“ (tlačítko zobrazit).
- 3) Klikněte na „Print“ (Tisk), zvolte: „Run Details, Test Details and Plot...“ (Podrobnosti běhu, Podrobnosti testu a záznam...).
- 4) Klikněte na „Print or Export button“ (tlačítko Tisk nebo Export) na obrazovce „Run Reports“ (Zprávy o běhu).

9. Interpretace výsledků

Podrobný popis jak analyzovat data naleznete v uživatelské příručce BD MAX™ System.

Analýza dat se provádí s použitím softwaru BD MAX™ podle pokynů výrobce. Software BD MAX™ hlásí hodnoty Ct a amplifikační křivky pro každý kanál detektoru každého testovaného vzorku následujícím způsobem:

- Hodnota Ct 0 znamená, že software nevypočítal žádnou hodnotu Ct se specifikovanou prahovou hodnotou (viz tabulku 3). Amplifikační křivku vzorku ukazující hodnotu Ct „0“ je nutno zkontrolovat ručně.

- Hodnota Ct -1 znamená, že nedošlo k procesu amplifikace.

- Jakoukoli jinou hodnotu Ct je třeba interpretovat v korelaci s amplifikační křivkou a podle pravidel interpretace vozku, uvedených v tabulce 6.

Zkontrolujte signál vnitřní kontroly pro ověření správného fungování amplifikační směsi. Navíc zkontrolujte zda není hlášeno selhání pro BD MAX™ System.

-Výsledky je třeba číst a analyzovat s použitím následující tabulky:

vanA gen (475/520)	vanB gen (585/630)	Internal Control (530/565)	Interpretace
+	+	+/- ¹	DNA genů vanA a vanB detekována¹
+	-	+/- ¹	DNA genu vanA detekována, DNA genu vanB nedetekována¹
-	+	+/- ¹	DNA genu vanB detekována, DNA genu vanA nedetekována¹
-	-	+ ²	DNA genů vanA a vanB nedetekována²
-	-	- ²	Nevyřešeno (UNR) Výsledek získaný za přítomnosti inhibitorů v reakci PCR nebo když nastane obecný problém (nehlášený chybovým kódem) se zpracováním vzorku a/nebo kroky amplifikace.²
IND	IND	IND	Výsledek testu nelze určit (IND). Kvůli selhání BD MAX™ System. Výsledek testu zobrazen v případě, že je selhání systému spojeno s chybovým kódem.
INC	INC	INC	Neúplný výsledek testu (INC): Kvůli selhání BD MAX™ System. Výsledek testu zobrazen v případě, že se nezdařilo dokončit běh.

Tabulka 6. Interpretace vzorku.

+: Došlo k amplifikaci.

-: Nedošlo k amplifikaci.

1 Vzorek je považován za pozitivní, když je získaná hodnota Ct menší než 40. Vnitřní kontrola (IC) může a nemusí vykazovat signál amplifikace. Někdy není detekce IC nutná, protože vysoký počet kopií cíle může vyvolat preferenční amplifikaci cíleně specifických nukleových kyselin.

2 Vzorek je považován za negativní, pokud vzorek nevykazuje žádný signál amplifikace v detekčním systému, ale vnitřní kontrola je pozitivní (Ct menší než 40). Inhibice PCR reakce může být vyloučena amplifikací vnitřní kontroly. V případě nevyřešených výsledků (UNR), absence signálu vnitřní kontroly v negativním vzorku, se doporučuje test opakovat podle údajů uvedených níže.

OPAKOVÁNÍ POSTUPU TESTOVÁNÍ

Pokud je výsledek i nadále nejednoznačný, doporučuje se prostudovat si návod k použití, postup extrakce použitý uživatelem, ověřit správný výkon každého z kroků qPCR a přezkoumat parametry a zkontrolovat esovitý tvar křivky a intenzitu fluorescence.

POZNÁMKA: Je k dispozici dostatečný objem pro jedno opakování testu ze zkumavky s pufrem vzorku. Pro připravené BD MAX™ Sample Buffer Tubes uchovávané při teplotě 2–8 °C nebo 25 °C, je nutno test opakovat do 24 hodin.

POZNÁMKA: Nové vzorky mohou být testovány ve stejném běhu s opakovanými vzorky.

Je třeba, aby výsledek testu vyhodnotil zdravotník v kontextu anamnézy, klinických symptomů a dalších diagnostických testů.

10. Omezení testu

- Je třeba, aby výsledek testu vyhodnotil zdravotník v kontextu anamnézy, klinických symptomů a dalších diagnostických testů.
- Přestože lze tento test použít s jinými typy vzorků, byl validován pro perianální a/nebo rektální stěry odebrané s použitím transportního média ESwab™ a suspenze kolonií.
- Pro dobrý výkon testu musí být lyofilizovaný produkt na dně zkumavky a neulpívat v horní oblasti zkumavky nebo na fóliovém uzávěru. Jemně klepněte každou zkumavkou na tvrdý povrch, aby bylo zajištěno, že bude veškerý produkt na dně zkumavky.
- Vzhled reakční směsi je ve stabilizovaném formátu, normálně se nachází na dně zkumavky, rozdíl od obvyklého vzhledu (bez kónického tvaru, nehomogenní, menší/větší velikost a/nebo jiná barva než bělavá) nemění funkčnost testu.
- Kvalita testu závisí na kvalitě vzorku. Je nutno provést řádnou extrakci nukleové kyseliny z perianálních a/nebo rektálních vzorků a kolonie musí být extrahovány.
- Tento test je kvalitativní test a neposkytuje kvantitativní hodnoty ani neindikuje počet přítomných mikroorganismů.
- Mohou být detekovány extrémně nízké hladiny pod limitem detekce, výsledky však nemusí být reprodukovatelné.
- Existuje možnost falešně pozitivních výsledků způsobených křížovou kontaminací vzorky s podezřením na rezistenci na vankomycin obsahujícími vysoké koncentrace cílové DNA nebo kontaminací produkty PCR z předchozích reakcí.
- Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny různými faktory a jejich kombinacemi, včetně následujících:
 - Nesprávné metody odběru, přepravy a uchovávání vzorků a manipulace s nimi.
 - Nesprávné postupy zpracování (včetně extrakce DNA).
 - Degradace DNA v průběhu přepravy/skladování a/nebo zpracování vzorku.
 - Mutace nebo polymorfismus regionů vázajících primer nebo sondu mohou ovlivnit detekci nových nebo neznámých variant genu *vanA* gene a/nebo *vanB*.
 - Zátěž organismy rezistentními na vankomycin ve vzorku pod limitem detekce testu.
 - Přítomnost inhibitorů gPCR nebo jiných typů interferujících látek.
 - Nedodržení návodu k použití a postupu testu.
- Negativní signál IC nevylučuje přítomnost DNA genu *vanA* a/nebo DNA genu *vanB* v klinickém vzorku.
- Pozitivní výsledek testu nemusí nutně znamenat přítomnost životaschopných organismů rezistentních na vankomycin a neimplikuje, že jsou tyto organismy infekční nebo jsou původcem klinických symptomů. Pozitivní výsledek však znamená přítomnost cílových sekvencí rezistence na vankomycin.
- Negativní výsledky nevylučují infekci organismem rezistentním na vankomycin a nemají být používány jako výhradní základ k rozhodování o léčbě nebo jiného managementu pacienta.
- V případě, že je s použitím VIASURE *Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit* pro dosažení výsledku Nevyřešeno, Nelze určit nebo Neúplné, bude nutné provést test znovu. Nevyřešené výsledky mohou být způsobeny přítomností inhibitorů ve vzorku nebo nesprávnou rehydratací zkumavky s lyofilizovanou reakční směsí. Pokud dojde k selhání přístroje, budou získány výsledky Nelze určit nebo Nevyřešeno.

11. Kontrola kvality

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit obsahuje vnitřní kontrolu (IC) v každé reakční zkumavce, která potvrdí správný výkon techniky.

12. Výkonové charakteristiky

12.1. Klinické senzitivita a specificita

Klinický výkon VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit byl testován s použitím klinických vzorků (rektálních stěrů) od pacientů s podezřením na infekci VRE. Výsledky byly následující:

	Pracoviště	Typ vzorku	Pracovní postup	Cíl
1	Clinical Microbiology, Centre pro Infectious Diseases and Microbiology Laboratory services, NSW Health Pathology, Westmead Hospital (Sydney, Austrálie)	Rektální stěr	BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System	Gen VanA
				Gen VanB
				Geny VanA + VanB

Tabulka 7. Pracoviště, typ vzorku, pracovní postup a cíl.

Byly vypočítány skutečně pozitivní a negativní hodnoty, falešně pozitivní a negativní hodnoty, hodnoty senzitivity a specificity pro VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit ve vztahu k jednotlivým srovnávacím testům, jak je uvedeno v následující tabulce:

Pracoviště	Srovnávací test	Cíl	TP	TN	FP	FN	Senzitivita	Specificita
1	Vnitropodnikový PCR VRE (Westmead – WMD)	VanA	65	151	0	0	100 % (93 %-100 %)	100 % (96 %-100 %)
		VanB	36	179	1	0	100 % (87 % -100 %)	99 % (96 %-100 %)
		VanA+VanB	17	199	0	0	100 % (97 % -100 %)	100 % (97 % -100 %)

Tabulka 8. Byly vypočítány skutečně pozitivní a negativní hodnoty, falešně pozitivní a negativní hodnoty, hodnoty senzitivity a specificity pro VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Výsledky vykazují vysokou shodu pro detekci genů *vanA* a *vanB* s použitím VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit

Kromě toho byla vypočítána míra selhání zpracování vzorku. Počáteční počet nevyřešených situací (UNR) byl 3 (počáteční míra UNR: 1,39 %). Číslo UNR po opakování bylo 0 (konečná míra UNR: 0,00 %).

Pro vyhodnocení kompatibility VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit přizpůsobeného pro BD MAX™ s dalšími vzorky v jiné matici bylo provedeno vyhodnocení k ověření detekce suspenzí kolonií enterokoků rezistentních na vankomycin.

Byly připraveny různé suspenze kolonií přidáním dvou kolonií určené kultury do 500 µl vody neobsahující nukleázu. Pro toto stanovení byly použity kmeny CECT 5253 *Enterococcus faecium vanA*, CECT 8120 *Enterococcus faecalis*

vanB, NCTC 12201 *Enterococcus faecalis* vanA a NCTC 13632 *Enterococcus faecalis* vanA. Objem 10 μ l suspenze každé kolonie byl přidán přímo do zkumavky s puřem vzorku. Schéma postupu k provedení tohoto vyřhodnocení bylo: BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System.

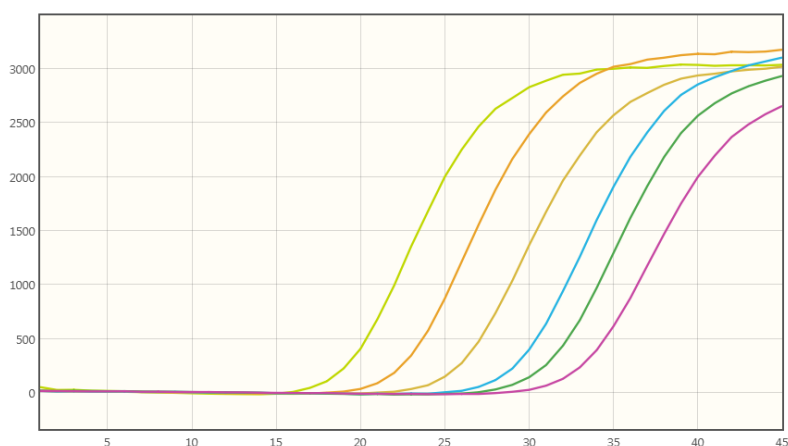
Získané výsledky ukázaly, ře suspenze kolonií CECT 5253, NCTC 12220 a NCTC 13632 byly pozitivní na gen vanA a suspenze kolonií CECT 8120 byla pozitivní na gen vanB.

Tyto výsledky ukazují, ře VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit může řádně detekovat geny vanA a vanB v suspenzích kolonií.

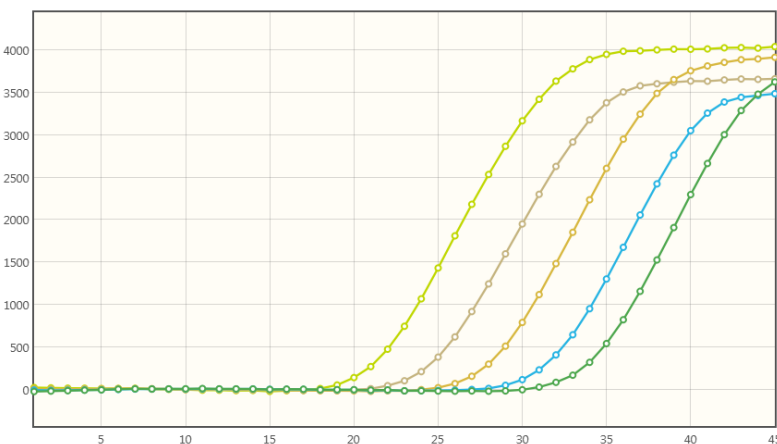
12.2. Analytická senzitivita

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit má limit detekce ≥ 4 jednotky tvořící kolonii na reakci (CFU/rxn) pro vanA a ≥ 10 jednotek tvořících kolonii na reakci (CFU/rxn) pro vanB (obrázky 2 a 3) s mírou pozitivity ≥ 95 % v perianálních a rektálních střeřech.

Obrázek 2. Běř temřlátu sřerie ředění genu vanA ($3.62 \cdot 10^4$ - 3.62 CFU/rxn) na BD MAX™ System (kanál 475/520 (FAM)).



Obrázek 3. Běř temřlátu sřerie ředění genu vanB gene ($5.65 \cdot 10^4$ - 9.98 CFU /rxn) na BD MAX™ System (kanál 585/630 (ROX)).



12.3. Analytická specifivita

Specifivita testu ba rezistenci na vankomycin byla potvrřena testováním panelu sestávajícího z různých antimikrobiálně rezistentních organismů a různé mikroorganismy reprezentujícíř nejobyklejši enterické

patogeny nebo floru přítomnou v tenkém střevě. Mezi žádnými z následujících mikroorganismů nebyla detekována zkřížená reaktivita s výjimkou cílených patogenů pro každý test:

Testování zkřížené reaktivity					
Sérotypy adenoviru 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) a KPC-2 produkující izolát <i>Klebsiella pneumonia</i>	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	Typ VanC <i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	Typ VanC2 <i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	Norovirus GI a GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrovirus genotyp I-VIII	-	Typ VanA <i>Enterococcus faecalis</i>	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Typ VanB <i>Enterococcus faecalis</i>	- / +	Rotavirus A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	Typ VanA <i>Enterococcus faecium</i>	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	Typ VanB <i>Enterococcus faecium</i>	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	Typy VanB a VanC <i>Enterococcus gallinarum</i>	- / +	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	Typ VanC <i>Enterococcus gallinarum</i>	-	<i>Salmonella paratyphi B</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	Typ VanC1 <i>Enterococcus gallinarum</i>	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Enterohemoragické <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
VIM-1 produkující izolát <i>Citrobacter braakii</i>	-	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-	Sapovirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Enteropathogenní <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
KPC-3 a VIM-4 produkující izolát komplexu <i>Citrobacter freundii</i>	-	Enterotoxigenické <i>Escherichia coli</i>	-	OXA-48 produkující izolát <i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	OXA-244 produkující izolát <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	TEM-1 (non-ESBL) a IMP-1 produkující izolát <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	Methicilin-resistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (mecC)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Methicilin-resistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) kmen N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	Methicilin-resistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Methicilin-resistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) kmen (oxa ^R , PVL-pozitivní, spa typ t310)	-
SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) a OXA-48 produkující izolát <i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i> rezistentní na clarithromycin (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
TEM-1 (non-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) a NDM-1 produkující izolát <i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i> rezistentní na clarithromycin (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
NDM-7 produkující izolát komplexu <i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
Typ VanA <i>Enterococcus avium</i>	+ / -	SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 a OXA-48 produkující izolát <i>Klebsiella pneumonia</i>	-		

Tabulka 9. Referenční patogenní mikroorganismy použité v této studii.

12.4. Analytická reaktivita











Reaktivita VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit pro gen *vanA* byla vyhodnocována proti DNA extrahované z kmenů typu *vanA Enterococcus avium*, typu *vanA Enterococcus faecalis* (NCTC 13632, NCTC 12201) a typu *vanA Enterococcus faecium* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202) vykázala pozitivní výsledky.

Reaktivita VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit pro gen *vanB* byla vyhodnocována proti DNA extrahované z kmenů typu *vanB Enterococcus faecalis* (ATCC 51299, CECT 8120), *vanB*- type *Enterococcus faecium* (IOWA 2) a *vanB* a *vanC Enterococcus gallinarum* (ENT20120142) vykázala pozitivní výsledky.

Bibliography/Literatura

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 (CDC). Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) in Healthcare Settings. Available from: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/vre/vre.html#:~:text=CDC%20works%20with%20healthcare%20facilities,high%20numbers%20of%20VRE%20infections> Accessed January 2021.
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.

Symbols for IVD components and reagents/ Symboly pro komponenty IVD a reagentie

 In vitro diagnostic device Diagnostický prostředek <i>in vitro</i>	 Keep dry Uchovávejte v suchu	 Use by Datum spotřeby	 Manufacturer Výrobce	 Batch code Číslo šarže
 Consult instructions for use Čtěte návod k použití	 Temperature limitation Teplotní omezení	 Contains sufficient for <n> test Obsahuje dostatečné množství pro <n> testů	 Unique Device Identification Jednoznačná identifikace prostředku	 Catalogue number Katalogové číslo

Trademarks

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

All other trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Change control / Řízení změn		
Version No. / Verze č.	Changes / Změny	Fecha / Date
00	Unification of all instructions for use associated with the different catalogue references in a single format / Sjednocení všech návodu k použití spojených s různými katalogovými čísly do jednotného formátu.	27/05/2021

Table A 2. Control change table / Tabulka řízení změn.

Revision: 27th April 2021.

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev01

