

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Vancomycin resistance
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Disse brugsanvisninger gælder for følgende reference:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERENCE
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. / Reference til det produkt, der skal anvendes sammen med BD MAX™-systemet.

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

Indhold

1.	Anvendelsesformål	19
2.	Oversigt og forklaring.....	19
3.	Procedurens princip.....	20
4.	Leverede reagenser	20
5.	Reagenser og udstyr, der skal leveres af brugeren	20
6.	Transport- og opbevaringsforhold.....	21
7.	Særlige forholdsregler for brugere	21
8.	Analysemetode.....	22
8.1.	Indsamling, opbevaring og transport af prøver.....	22
8.2.	Klargøring af prøver og DNA-ekstraktion.....	22
8.3.	PCR-protokol.....	23

9.	Tolkning af resultater	26
10.	Begrænsninger i testen.....	28
11.	Kvalitetskontrol.....	29
12.	Ydelseskarakteristika	29
12.1.	Klinisk sensitivitet og specificitet	29
12.2.	Analytisk sensitivitet	30
12.3.	Analytisk specificitet.....	30
12.4.	Analytisk reaktivitet	32
	Bibliography/Bibliografi.....	33
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboler til in vitro diagnostiske reagenser og produkter	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.

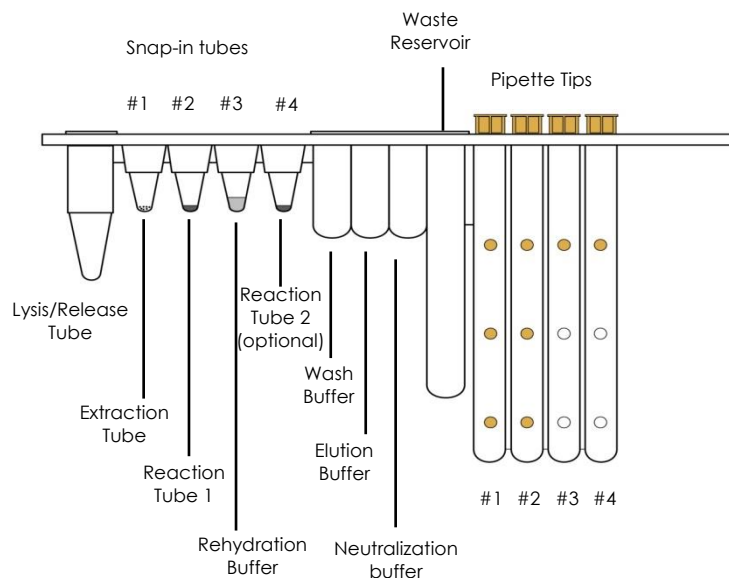
- 12) Click the "Save Test" button.

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 (3.62×10^4 - 3.62 CFU/rxn) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

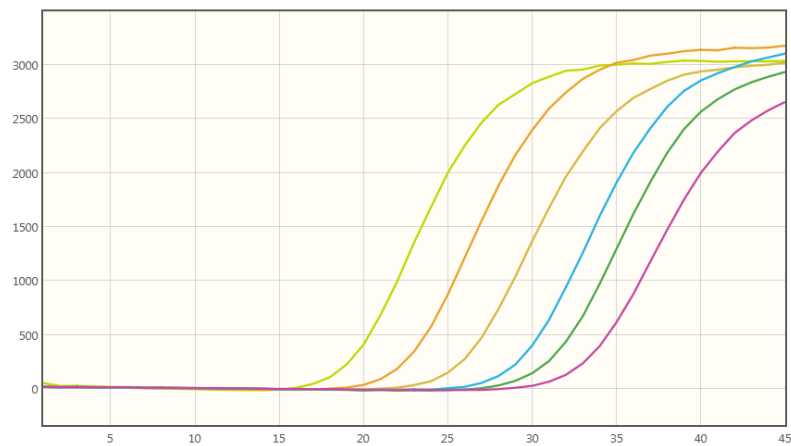
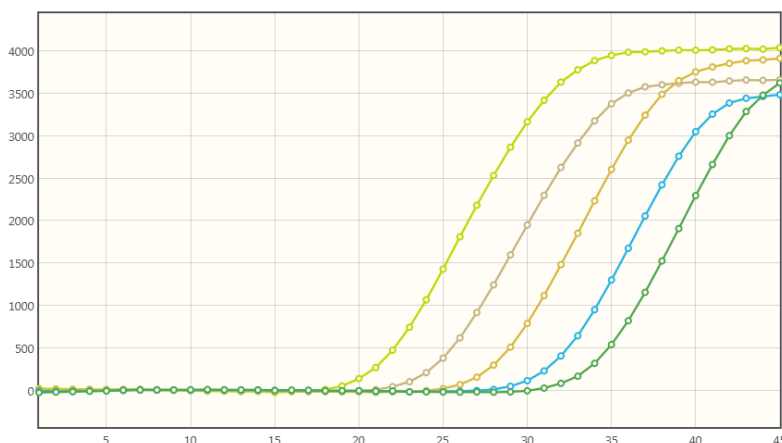


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene (5.65×10^4 - 9.98 CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the vancomycin resistance assay was confirmed by testing a panel consisting of different antimicrobial resistant organisms and different microorganisms representing the most common enteric

pathogens or flora present in the intestine. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay:

Cross-reactivity testing					
Adenovirus serotypes 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL), and KPC-2 producing <i>Klebsiella 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.

DANSK

1. Anvendelsesformål

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit er designet til specifik detektion og differentiering af *vanA*- og *vanB*-gener, der kan være forbundet med vancomycinresistente enterokokker (VRE) direkte fra perianale og/eller rektale pødepinde og kolonier. Denne test er beregnet som en hjælp til identifikation af vancomycin-resistente organismer i kombination med patientens kliniske tegn og symptomer og epidemiologiske risikofaktorer. Analysen anvender BD MAX™-systemet til automatisk ekstraktion af DNA og efterfølgende realtids-PCR med anvendelse af de medfølgende reagenser kombineret med universelle reagenser og engangsartikler til BD MAX™-systemet. DNA fra perianale og/eller rektale pødepinde og kolonier påvises ved hjælp af fluorescerende reporterfarvesonder, der er specifikke for *vanA*- og *vanB*-gener.

2. Oversigt og forklaring

Enterokokker er almindelige kommensale organismer, der findes i mave-tarmkanalen og de kvindelige kønsorganer. For nylig er de anerkendt som opportunistiske patogener forårsager nosokomielle infektioner såsom urinvejsinfektioner, hudinfektioner, luftvejsinfektioner, endocarditis og sepsis i kompromitteret vært.

Vancomycin er et glykopeptidantibiotikum, der hæmmer cellevægssyntesen og anvendes til behandling af svære grampositive bakterieinfektioner. Vancomycinresistente enterokokker (VRE) blev først rapporteret i England og Frankrig i 1986 og er nu spredt til hospitaler over hele verden.

Resistensen over for vancomycin er en kompleks proces og kræver tilstedeværelse af forskellige genklynger. De kan hovedsageligt opdeles i to typer afhængigt af de pentapeptidprækursorer, der produceres af vancomycinresistensgener; prækursoren, der ender på D-Alanine-D-Serine (*VanC*-, *VanE*-, *VanG*-, *VanL*- og *VanN*-type) eller ender på D-Alanine-D-Lactate (*VanA*-, *VanB*-, *VanD*- og *VanM*-type). Disse pentapeptidprækursorer viste lav affinitet til glykopeptiderne og overførte vancomycinresistens til enterokokker.

Den første type vancomycinresistens i enterokokker er iboende resistens (dvs. forbundet med *vanC*-genet). Isolater af *Enterococcus gallinarum* og *E. casseliflavus/E. flavescens* udviser en iboende, lav resistens over for vancomycin. Den anden type er erhvervet resistens (dvs. *vanA*- eller *vanB*-gener) og enterokokker kan blive resistente ved erhvervelse af mobile genetiske elementer (transposoner og plasmider) fra en anden *Enterococcus* art eller organisme. Mest almindeligt ses denne resistens hos *E. faecium* og *E. faecalis*, men er også blevet anerkendt hos *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* og flere andre enterokok arter. *vanA*- og *vanB*-gener er ansvarlige for høje eller moderate niveauer af vancomycinresistens.

Overførsel af vancomycinresistente enterokokker (VRE) kan ske ved direkte kontakt med kropsvæsker fra koloniserede eller inficerede patienter (blod, sårdrænage, urin, afføring, septum og andet) eller ved indirekte kontakt via hænderne på sundhedspersonale eller via kontamineret patientplejestyk eller overflader i omgivelserne.

I første omgang var screeningsmetoden kulturbaseret, hvilket er tidskrævende og tager generelt fra en til fem dage at gennemføre. Realtids-PCR-analyser har vist sig at være et værktøj til påvisning af klinisk relevante gener forbundet med vancomycinresistens.

3. Procedurens princip

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit er designet til identifikation og differentiering af DNA fra vancomycinresistente enterokokker og andre organismer, der bærer vancomycinresistensgenerne *vanA* og *vanB*. Efter DNA-isolering foretages identifikationen af vancomycinresistens ved amplifikation af en bevaret region af *vanA*- og *vanB*-generne ved hjælp af specifikke primere og en fluorescensmærket sonde.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit er baseret på 5' exonuklease-aktivitet fra DNA-polymerase. Under DNA-forstærkningen spalter dette enzym proben, som er bundet til den komplementære DNA-sekvens og adskiller quencher-farvestoffet fra rapportøren. Denne reaktion genererer en stigning i det fluorescerende signal, som er proportional med mængden på målskabelonen. Denne fluorescens måles af BD MAX™-systemet.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit indeholder i hvert rør alle de komponenter, der er nødvendige til at foretage PCR-analyser i realtid (specifikke primere/prober, dNTPs, buffer, polymerase) i et stabiliseret format samt en intern kontrol til overvågning af ekstraktionsprocessen og/eller hæmning af polymeraseaktiviteten.

Mål	Kanal	Gen
Vancomycinresistensgenerne	475/520	<i>vanA</i>
Vancomycinresistensgenerne	585/630	<i>vanB</i>
Internt Kontrolgen (IC)	530/565	-

Tabel 1. Mål, kanal og gener.

4. Leverede reagenser

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit indeholder følgende materialer og reagenser, som er beskrevet i Tabel 2:

Reagens/Materiale	Beskrivelse	Stregkode	Mængde
<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube	En blanding af enzymer, primerprober, buffere, dNTP'er, stabilisatorer og interne kontroller i stabiliseret format	1B folie	2 poser med 12 transparent rør
Rehydration Buffer tube	Opløsning til rekonstitution af det stabiliserede produkt	11 folie	1 pose med 24 transparent rør

Tabel 2. Reagenser og materialer leveret i VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit con Cat. N°. VS-VAN124 (444202).

5. Reagenser og udstyr, der skal leveres af brugeren

Følgende liste omfatter materialer og udstyr, der er nødvendige til brug, men ikke inkluderet i VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Realtids-PCR-instrument: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref: 442825 o 442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.

- Mikropipetter (nøjagtighed mellem 2 og 1000 µl).
- Nukleasefrit vand.
- Filterspidser.
- Pulverfrie engangshandsker.

6. Transport- og opbevaringsforhold

- Sættene kan sendes og opbevares ved 2 - 40 °C, indtil den udløbsdato, der er angivet på etiketten.
- Efter åbning af aluminiumsposerne, som indeholder reaktionsrørene, kan de anvendes i op til 28 dage

7. Særlige forholdsregler for brugere

- Produktet er tiltænkt professionelle brugere, såsom laboratorie- eller sundhedspersonale og teknikere, der er uddannet i molekylærbiologiske teknikker.
- Til *in vitro*-diagnostisk brug.
- Brug ikke reagenser og/eller materialer, hvis udløbsdatoen er overskredet.
- Brug ikke sættet, hvis etiketten, der forseglers den ydre æske, er i stykker.
- Brug ikke reagenser, hvis beskyttelsesæsken er åben eller i stykker ved ankomsten.
- Brug ikke reagenser, hvis beskyttelsesposerne er åbne eller i stykker ved modtagelsen.
- Brug ikke reagenser, hvis tørremidlet ikke er til stede eller er i stykker inden i reagensposerne.
- Tørremidlet må ikke fjernes fra reagensposerne.
- Luk straks de beskyttende poser med reagenser med lynlåsforseglingen efter hver brug. Fjern eventuel overskydende luft i poserne inden forsegling.
- Brug ikke reagenser, hvis folien er blevet ødelagt eller beskadiget.
- Reagenser fra forskellige poser og/eller sæt og/eller partier må ikke blandes.
- Beskyt reagenser mod fugt. Længerevarende eksponering for fugt kan påvirke produktets ydeevne.
- Hold komponenterne væk fra lys.
- I tilfælde, hvor andre PCR-tests udføres i det samme generelle område af laboratoriet, skal det omhyggeligt sikres, at VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit, eventuelle yderligere reagenser, der er påkrævede til testen og BD MAX™-systemet ikke er kontamineret. Undgå altid mikrobiel kontaminering og kontaminering af reagenser med ribonuklease (RNase)/deoxyribonuklease (DNase). Det anbefales at anvende sterile RNase/DNase-fri aerosolresistente engangspipettespidser eller positive fortrængningspipettespidser. Brug en ny spids til hver prøve. Handsker skal udskiftes før håndtering af reagenser og kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge).
- For at undgå kontaminering af miljøet med amplikationer må BD MAX™ PCR Cartridge ikke brydes fra hinanden efter brug. Forseglingerne på BD MAX™ PCR Cartridge er designet til at forhindre kontaminering.
- Tilrettelæg en ensrettet arbejdsgang. Den skal begynde i ekstraktionsområdet og derefter flyttes til forstærknings- og detektionsområdet. Prøver, udstyr og reagenser må ikke returneres til det område, hvor det foregående trin blev udført.
- Følg god laboratoriepraksis. Brug beskyttelsestøj, engangshandsker, beskyttelsesbriller og maske. Man må ikke spise, drikke ryge eller anvende kosmetiske produkter i arbejdsområdet. Vask hænder efter endt test.
- Prøverne skal behandles som potentielt smitsomme og / eller biofarligt samt alle reagenser og materialer, der er blevet eksponeret for prøverne, og skal håndteres i overensstemmelse med de nationale

sikkerhedsforskrifter. Træf de nødvendige forholdsregler under indsamling, transport, opbevaring, behandling og bortskaffelse af prøver.

- Prøver og reagenser skal håndteres i et biologisk sikkerhedsskab. Anvend personlige værnemidler (PPE) i overensstemmelse med gældende retningslinjer for håndtering af potentielt smitsomme prøver. Affald bortskaffes i overensstemmelse med lokale retningslinjer.
- Regelmæssig dekontaminering af almindeligt anvendt udstyr anbefales, især mikropipetter og arbejdsflader.
- I overensstemmelse med Forordning (EF) nr. 1907/2006 (REACH), kræver "VIASURE Real Time PCR Detection Kits" ikke materialesikkerhedsdatablade (Material Safety Data Sheets) som en del af deres klassificering som værende ufarlige for helbredet og miljøet, fordi de ikke indeholder stoffer og/eller blandinger, som opfylder kriterierne for fareklassificering iht. forordning (EF) nr. 1272/2008 (CLP), eller forefindes i koncentrationer, der er højere end den værdi, der er angivet i den nævnte forordning til deres erklæring.
- Se brugervejledningen til BD MAX™-systemet for yderligere advarsler, forholdsregler og procedurer.

8. Analysemetode

8.1. Indsamling, opbevaring og transport af prøver

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit er blevet valideret på perianale og/eller rektale podepinde, der straks blev anbragt i ESwab™ transportmedium (opsamlings- og transportsystem baseret på flydende Amies) (Copan, Italien). VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit er også blevet valideret på kolonisuspension. Andre typer prøver skal valideres af brugeren.

Prøveudtagning, opbevaring og transport skal vedligeholdes i overensstemmelse med de betingelser, der er valideret af brugeren. Generelt bør perianale og/eller rektale podepinde indsamles og i et rent ESwab™ transportmedie, mærkes korrekt og behandles snarest muligt for at garantere testens kvalitet. Prøverne skal transporteres ved 2 til 8 °C i op til 24 timer i henhold til lokale og nationale bestemmelser for transport af patogenet materiale. Ved langtidstransport (mere end 24 timer) anbefaler vi forsendelse ved ≤-20 °C eller lavere. Det anbefales at anvende friske prøver til testen. Prøverne kan opbevares ved 25 °C i op til 24 timer, 2-8 °C i op til 144 timer (6 dage), nedfryses ved -20 °C i op til 192 timer (8 dage) eller ideelt ved -70 °C for konservering. Gentagne fryse-tø-cykler bør undgås for at forhindre nedbrydning af prøven og nukleinsyrer.

Fækalprøverne skal indsamles, transporteres og opbevares i overensstemmelse med relevante laboratorieretningslinjer. For yderligere oplysninger henvises til CDC guideline (CDC-retningslinjer for prøveudtagning. Websted <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) og IDSA-retningslinjerne (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S.,... & Pritt, B. S. (2018). En vejledning i anvendelse af mikrobiologilaboratoriet til diagnosticering af smitsomme sygdomme: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Kliniske infektionssygdomme*, 67(6), e1-e94).

8.2. Klargøring af prøver og DNA-ekstraktion

Udfør prøveklargøringen i henhold til anbefalingerne i brugsanvisningen til det anvendte ekstraktionskit, BD MAX™ ExK™ TNA-2. Bemærk, at nogle andre prøver kan kræve forbehandling. Brugeren skal udvikle og validere ekstraktions- og præparationsprocedurer, der er specifikke til formålet.

1. Copan ESwab™: Der pipetteres 200 µl ESwab™ -prøver opsamlet i virale transportmedier i et BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube (prøvebufferrør), og røret lukkes med en septumhætte. Der sikres fuldstændig blanding ved at hvirvle prøven ved høj hastighed i 1 minut. Fortsæt til BD MAX™ System Operation.
2. Kolonier: Tag to kolonier fra det dyrkede medium og suspender dem til 500 µl nukleasefrit vand. Sørg for fuldstændig blanding ved hvirvling. Der pipetteres 10 µl opløsning over i et prøvebufferrør Sample Buffer Tube (prøvebufferrør) og røret lukkes med en septumhætte. Der sikres fuldstændig blanding ved at hvirvle prøven ved høj hastighed i 1 minut. Fortsæt til BD MAX™ System Operation.

8.3. PCR-protokol

Bemærk: Der henvises til brugervejledningen til BD MAX™-systemet for at få detaljerede instruktioner.

8.3.1. Oprettelse af PCR-testprogram for VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

Bemærk: Hvis du allerede har oprettet testen til VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, kan du springe trin 8.3.1 over og gå direkte til 8.3.2.

- 1) Vælg fanen "Test Editor" (Testredigering) på skærmen "Run" (Kør) på BD MAX™-systemet.
- 2) Klik på knappen "Create" (Opret).
- 3) Navngiv din test i fanen Basic Information (Grundlæggende oplysninger) i vinduet "Test Name" (Testnavn): dvs. VIASURE Vancomycin resistance.
- 4) Vælg "Extraction Type" (Ekstraktionstype) i rullemenuen "ExK TNA-2".
- 5) Vælg "Type 5" i rullemenuen "Master Mix Format"
 - a. Bemærk: Produktet kan anvendes i kombination med en ekstra VIASURE til BD MAX™ test, og vælg derefter "Dual Master Mix Concentrated Lyofized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) I "Sample extraction parameters" (Parametre for prøveekstraktion) vælges "User defined" (Brugerdefineret), og prøvevolumen justeres til 500 µl.
- 7) I "Ct Calculation" (Ct-beregning) vælges "Call Ct at Threshold Crossing" (Beregn Ct når tærsklen krydses).
- 8) Hvis du kører softwareversion 5.00 eller nyere, skal du vælge følgende konfiguration i "Custom Barcodes" (Brugerdefinerede strekkoder):
 - a. "Snap-In 2 Barcode" (Snap-In 2-strekkode): 1B (vedrørende Vancomycin resistance reaction tube)
 - b. "Snap-In 3 Barcode" (Snap-In 3-strekkode): 11 (vedrørende Rehydration Buffer tube)
 - c. "Snap-In 4 Barcode" (Snap-In 4-strekkode): et andet VIASURE-reaktionsrør (forskellig folie), hvis du vælger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Afsnit 8.3.1).

9) Indtast følgende parametre på fanen "PCR settings" (PCR-indstillinger): "Channel Settings" (Kanalindstillinger), "Gains" (Stigninger) og "Threshold" (Tærskel) (Tabel 3).

- a. Bemærk: Produktet kan anvendes i kombination med en ekstra VIASURE til BD MAX™-test, PCR-indstillinger og testtrin skal gennemføres for position 2 (grøn) og position 4 (blå).

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Stigning)	Threshold (Tærskel)	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

Tabel 3. PCR settings (PCR-indstillinger)

Bemærk: Det anbefales som udgangspunkt at fastsætte ovennævnte minimumstærskelværdier for hver kanal, men de endelige indstillinger skal fastlægges af slutbrugeren under resultatfortolkningen for at sikre, at tærskelværdierne falder inden for fluorescenskurvernes eksponentielle fase og over ethvert baggrundssignal. Tærskelværdien for forskellige instrumenter kan variere på grund af forskellige signalintensiteter.

10) I fanen "PCR settings" (PCR-indstillinger) indtastes følgende parametre samt "Spectral Cross Talk" (Spektral krydstale) (tabel 4)

		False Receiving Channel (Falsk modtagekanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Excitationskanal)	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

Tabel 4. Parametre "Spectral cross-talk" (Parametre for spektral krydstale.).

11) Indtast PCR-protokollen (tabel 5) på fanen "Test Steps" (Testtrin).

Step Name (Trinnavn)	Profile Type (Profiltype)	Cycles (Cyklusser)	Time (s) (Tid (sek.))	Temperature (Temperatur)	Detect (Detekter)
Initial denaturation (Indledende denaturering)	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing (Denaturering og annotering)/Extension (Data collection)(udvidelse (dataindsamling))	2-Temperatur	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

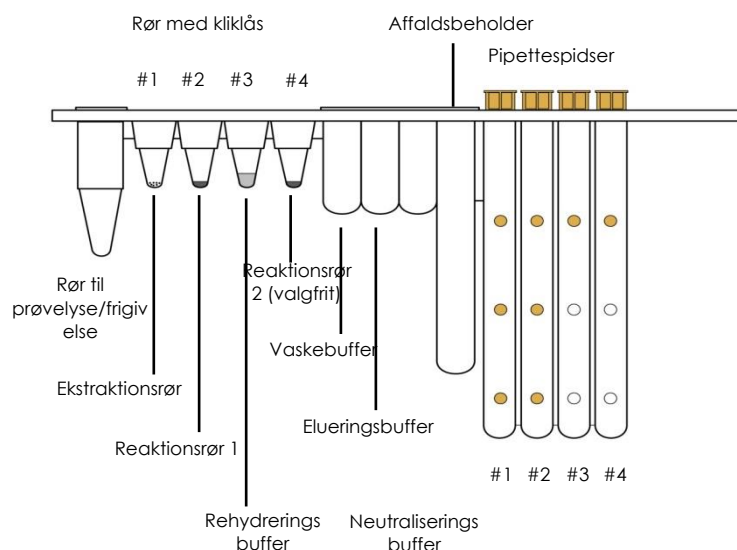
Tabel 5. PCR-protokol.

12) Klik på knappen "Save Test" (Gem test).

8.3.2. Opsætning af BD MAX™-stativ

- 1) For hver prøve, der skal testes, fjernes en Unitized Reagent Strips fra BD MAX™ ExK™ TNA-2 kit. Bank forsigtigt hver strimmel mod en hård overflade for at sikre, at alle væskerne ligger i bunden af rørene, og anbring dem i BD MAX™-systemets prøvestativer.
- 2) Fjern det påkrævede antal BD MAX™ ExK TNA-ekstraktionsrør (B4) (hvid folie) fra deres beskyttelsespose. Sæt udtræksrøret (-rørene) (hvid folie) i de tilsvarende positioner i TNA-strimlen (fastgør position 1, hvid farvekodning på stativet. Se Figur 1). Fjern overskydende luft, og luk aluminiumsposerne med lynlåsforseglingen.
- 3) Identificer og adskil det rette antal *Vancomycin resistance* reaction tube (1B folie), og klik dem på plads i deres tilsvarende positioner på strimmel (Klik-position 2, grøn farvekodning på stativet. Se Figur 1).
 - a. Fjern overskydende luft, og luk aluminiumsposerne med lynlåsforseglingen.
 - b. Rehydreringen udføres korrekt ved at sørge for, at det frysetørrede produkt ligger i bunden af røret og ikke er i kontakt med rørets top eller folieforseglingen. Bank forsigtigt hvert rør mod en hård overflade for at sikre, at alt produktet er i bunden af røret.
 - i. Bemærk: Hvis du vælger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilised MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (afsnit 8.3.1), bestemmes og adskilles det passende antal ekstra VIASURE reaktionsrør (forskellig folie) og klikkes fast i deres tilsvarende positioner i strimlen (klik-position 4, blå farvekodning på stativet. Se Figur 1). Fjern overskydende luft, og luk aluminiumsposerne med lynlåsforseglingen.
- 4) Fjern det nødvendige antal Rehydration Buffer tubes (1I folie), og klik dem fast på deres tilsvarende pladser på strimlen (klik-position 3, ikke-farvet kodning på stativet. Se Figur 1). Fjern overskydende luft, og luk aluminiumsposerne med lynlåsforseglingen.
 - a. For at sikre, at overførslen udføres korrekt, skal man sørge for, at væsken ligger i bunden af røret og ikke er i kontakt med rørets top eller folieforseglingen. Bank forsigtigt hvert rør mod en hård overflade for at sikre, at alt produktet er i bunden af røret.

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



8.3.3. BD MAX™ Instrumentopsætning

- 1) Vælg fanen "Work List" (Arbejdsliste) på skærmen "Run" (Kør) på BD MAX™ Systemssoftware v4.50A eller nyere.
- 2) Vælg VIASURE *Vancomycin resistance* i rullemenuen "Test" (hvis det ikke allerede er oprettet, se afsnit 8.3.1).
- 3) Vælg det relevante lotnummer for kittet (fremgår af ekstraktionskittets udvendige æske) fra rullemenuen (valgfrit).
- 4) Indtast prøvebufferrørets identifikationsnummer i vinduet Sample tube (Prøverør) på Worklist (Arbejdsliste), enten ved at scanne strekkoden med scanneren eller ved manuel indtastning.
- 5) Udfyld vinduet Specimen/Patient ID og/eller Accession på Worklist (arbejdsliste), og klik på knappen "Save" (Gem). Fortsæt, indtil alle prøvebufferrør er indtastet. Sørg for, at prøve-/patient-id'et og prøvebufferrørene matcher nøjagtigt.
- 6) Anbring det klargjorte prøvebufferrør i BD MAX™-stativet/stativerne.
- 7) Sæt stativet/stativerne i BD MAX™-systemet (stativ A er placeret i venstre side af BD MAX™-systemet og stativ B i højre side).
- 8) Anbring det nødvendige antal BD MAX™ PCR Cartridges i BD MAX™-systemet.
- 9) Luk lågen til BD MAX™-systemet.
- 10) Klik på "Start Run" (Start procedure) for at starte proceduren.

8.3.4. BD MAX™ rapport

- 1) Klik på knappen "Results" (Resultater) i hovedmenuen.
- 2) Dobbeltklik enten på din kørsel på listen, eller tryk på knappen "View" (Vis).
- 3) Klik på "Print" (Udskriv), vælg: "Run Details, Test Details and Plot..." (Kør detaljer, testdetaljer og tegn grafik).
- 4) Klik på knappen "Print or Export" (Udskriv eller Eksporter) eller på skærmen "Run Reports" (Kør rapporter).

9. Tolkning af resultater

For en detaljeret beskrivelse af, hvordan man analyserer data, se BD MAX™-systemets brugervejledning.

Analysen af data udføres som BD MAX™-software i overensstemmelse med producentens anvisninger. BD MAX™-softwaren rapporterer Ct-værdier og stigningskurver for hver detektor kanal for hver prøve, og testes på følgende måde:

- En Ct-værdi på 0 angiver, at der ikke blev beregnet nogen Ct-værdi af softwaren ved den angivne tærskelværdi (se tabel 3). En forstærkningskurve for prøven, der viser en Ct-værdi på "0", skal kontrolleres manuelt.
- Ct-værdien -1 angiver, at ingen forstærkningskurve er forekommet.
- Enhver anden Ct-værdi skal fortolkes i sammenhæng med forstærkningskurve og i overensstemmelse med retningslinjerne for tolkning af prøven som anført i Tabel 6.

Kontrollér, at det indvendige styresignal fungerer korrekt for amplifikationsblandingen. Desuden skal du kontrollere, at der ikke foreligger nogen rapport over BD MAX™ Systemfejl.

-Resultaterne skal læses og analyseres ved hjælp af følgende tabel:

vanA-gen (475/520)	vanB -gen (585/630)	Intern kontrol (530/565)	Fortolkning
+	+	+/- ¹	vanA og vanB genes-DNA påvist ¹
+	-	+/- ¹	vanA gene-DNA påvist, vanB gene-DNA ikke påvist ¹
-	+	+/- ¹	vanB gene-DNA påvist, vanA gene-DNA ikke påvist ¹
-	-	+ ²	vanA og vanB genes-DNA ikke påvist ²
-	-	- ²	Resultatet Unresolved (uløst) (UNR) optræder under tilstedeværelse af hæmmere i PCR-reaktionen eller når der opstår et overordnet problem (der ikke rapporteres med en fejlkode) under prøvebehandlingen og/eller forstærkningstrinnene ² .
IND	IND	IND	Analyseresultatet er Indeterminate (ubestemmeligt) (IND). Skyldes en fejl i BD MAX™-systemet. Analyseresultat, der vises i tilfælde af en instrumentfejl, der knyttet til en fejlkode.
INC	INC	INC	Analyseresultatet er Incomplete (ufuldstændigt) (INC). Skyldes fejl i BD MAX™-systemet. Analyseresultatet vises, hvor en fuldstændig kørsel ikke kunne gennemføres.

Tabel 6. Prøvefortolkning.

+: Der opstod forstærkning

-: Der opstod ingen forstærkning

1. En prøve betragtes som positiv, hvis Ct-værdien er mindre end 40. Den interne kontrol kan vise et forstærkningssignal, fordi et stort antal målkopier kan medføre præferentiel forstærkning af målspecifikke nukleinsyrer i stedet for den interne kontrol. I disse tilfælde er undersøgelse af IC ikke nødvendig.

2 En prøve betragtes som negativ, hvis prøven viser intet forstærkningssignal, men den interne kontrol er positiv (Ct mindre end 40). En hæmning af PCR-reaktioner kan udelukkes ved forstærkningen af intern kontrol. I tilfælde af uløste resultater (UNR), manglende internt kontrolsignal i en negativ prøve anbefales det at gentage analysen ved følgende indikationer angivet nedenfor:

GENTAG TESTPROCEDUREN

I tilfælde af et fortsat tvetydigt resultat anbefales det at gennemgå brugsanvisningen, den ekstraktionsproces, som brugeren anvender; til at verificere den korrekte ydeevne for hvert RT-qPCR-trin og gennemgå parametrene og kontrollere kurvens sigmoide form og fluorescensintensiteten.

BEMÆRK: Der er tilstrækkelig volumen til rådighed til én gentagen test fra prøvebufferrøret. For klargjorte BD MAX™ Sample Buffer Tubes, der opbevares ved 2–8 °C eller 25 °C, skal der udføres ny testning inden for 24 timer.

BEMÆRK: Nye prøver kan afprøves i samme omgang med gentagne prøver.

Resultaterne af testen bør vurderes af en læge på baggrund af anamnese, kliniske symptomer og andre diagnostiske tests.

10. Begrænsninger i testen

- Resultaterne af testen bør vurderes af en læge på baggrund af anamnese, kliniske symptomer og andre diagnostiske tests.
- Selv om denne test kan bruges sammen med andre typer prøver er den blevet valideret med nasofaryngeale/orofaryngeale podedindsprøver og spytpøverne begge indsamlet i VTM.
- For god testydeevne skal det frysetørrede produkt være i bunden af glasset og ikke klæbe til det øverste område af glasset eller folieforseglingen. Bank forsigtigt hvert rør mod en hård overflade for at sikre, at alt produktet er i bunden af røret.
- Et udseende af reaktionsblandingen i stabiliseret format, som normalt findes i bunden af røret, forskelligt fra det sædvanlige (uden konisk form, inhomogent, mindre/større i størrelse og/eller farve forskellig fra hvidlig) ændrer ikke testens funktionalitet.
- Testens kvalitet afhænger af prøvens kvalitet; korrekt ekstraheret nukleinsyre fra luftvejsprøver skal ekstraheres.
- Denne test er en kvalitativ test og giver ikke kvantitative værdier eller angiver antallet af tilstedeværende organismer.
- Meget lave målniveauer under detektionsgrænsen kan påvises, men resultaterne er muligvis ikke reproducerbare.
- Der er mulighed for falske-positive resultater som følge af krydskontaminering af vancomycinresistensmistænkte prøver, der indeholder høje koncentrationer af mål-DNA eller er kontamineret med PCR-produkter fra tidligere reaktioner.
- Falsk-negative resultater kan skyldes flere faktorer og kombinationer heraf, herunder:
 - Forkerte metoder til indsamling, transport, opbevaring og/eller håndtering af prøver.
 - Forkerte behandlingsprocedurer (herunder DNA-ekstraktion).
 - Nedbrydning af det DNA under forsendelse/opbevaring og/eller behandling af prøver.
 - Mutationer eller polymorfismer i primer- eller sondebindingsområder kan påvirke påvisningen af nye eller ukendte *vanA* og / eller *vanB* -varianter.
 - En belastning med vancomycinresistente organismer i prøven under detektionsgrænsen for analysen.
 - Tilstedeværelsen af RT-qPCR-hæmmere eller andre typer interfererende stoffer.
 - Manglende overholdelse af brugsanvisningen og analyseproceduren.
- Et negativt IC-signal udelukker ikke tilstedeværelsen af *vanA*-gen- og/eller *vanB*-gen-DNA i en klinisk prøve.
- Et positivt testresultat indikerer ikke nødvendigvis tilstedeværelsen af levedygtige vancomycin-resistente organismer og betyder ikke, at disse organismer er smitsomme eller forårsager kliniske symptomer. Et positivt resultat indikerer imidlertid tilstedeværelsen af vancomycinresistance-sekvenser.
- Negative resultater udelukker ikke infektion med vancomycinresistente organismer, og bør ikke anvendes som eneste grundlag for behandling eller andre beslutninger om patientbehandling.
- I tilfælde af uløste eller ufuldstændige resultater med VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit er det nødvendigt at gentage testen. Uløste resultater kan skyldes tilstedeværelsen af antistoffer i prøven eller forkert rehydrering af frysetørrede reaktionsblandingsrør. Hvis der opstår en instrumentfejl, kan det medføre ubestemmelige eller ufuldstændige resultater.

11. Kvalitetskontrol

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit indeholder en intern kontrol (IC) i hver reaktion, hvilket bekræfter korrekt udførelse af teknikken.

12. Ydelseskarakteristika

12.1. Klinisk sensitivitet og specificitet

Den kliniske ydeevne fra VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit blev testet ved hjælp af kliniske prøve (rektal-podepindsprøver) fra patienter med mistanke om VRE-infektion. Resultaterne var følgende:

	Center	Prøvetype	Arbejdsgang	Mål
1	Clinical Microbiology, Centre for Infectious Diseases and Microbiology Laboratory services, NSW Health Pathology, Westmead Hospital (Sydney, Australien)	Rektal podepind	BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System	VanA-gen
				VanB-gen
				VanA- + VanB-gener

Tabel 7. Sted, prøvetype, arbejdsgang og mål.

Sand-positive og -negative værdier, falsk-positive og -negative værdier, følsomhed, specificitetsværdier for VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit blev beregnet i forhold til hver komparatoranalyse som vist i de følgende tabeller:

Center	Komparatoranalyse	Mål	TP	TN	FP	FN	Følsomhed	Specificitet
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 %)

Tabel 8. Ægte positive (TP) og negative (TN) værdier, falsk-positive (FP) og -negative (FN) værdier, følsomhed og specificitet for VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Resultaterne viser en høj følsomhed og specificitet til at detektere vanA- og vanB-gener ved hjælp af VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Derudover blev fejlfrekvensen for prøvebehandlingskontrol beregnet. Det oprindelige antal uløste reaktioner (UNR) var 3 (Initial UNR-rate: 1,39 %). Antallet af UNR efter gentagelse var 0 (endelig UNR-rate: 0,00 %).

For at evaluere kompatibiliteten af VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit tilpasset til BD MAX™ blev der foretaget en evaluering for at verificere påvisningen af vancomycin-resistente enterokokkolonisuspensioner.

Forskellige kolonisuspensioner blev fremstillet ved at tilføje to kolonier af en bestemt kultur i 500 µl nukleasefrit vand. De stammer, der blev anvendt til denne evaluering, var CECT 5253 *Enterococcus faecium* vanA, CECT 8120 *Enterococcus faecalis* vanB, NCTC 12201 *Enterococcus faecalis* vanA og NCTC 13632 *Enterococcus faecalis* vanA. Der blev tilsat 10 µl af hver kolonisuspension direkte til sample buffer tube. Den flowchart, der blev brugt til at foretage denne evaluering, var: BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System.

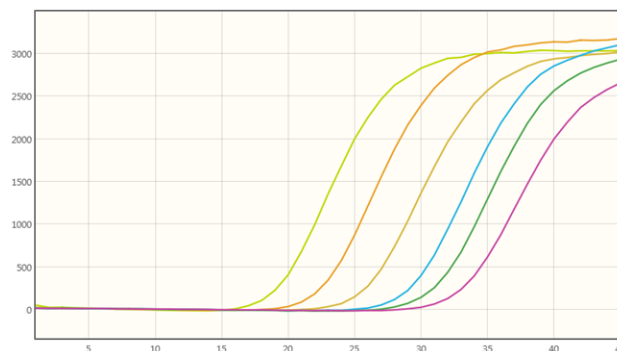
De opnåede resultater viste, at kolonisuspensioner af CECT 5253, NCTC 12201 og NCTC 13632 var positive for vanA-genet, og kolonisuspensioner på CECT 8120 var positive for vanB-genet.

Disse resultater viser, at VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit korrekt kan detektere vanA- og vanB-gener i kolonisuspensioner.

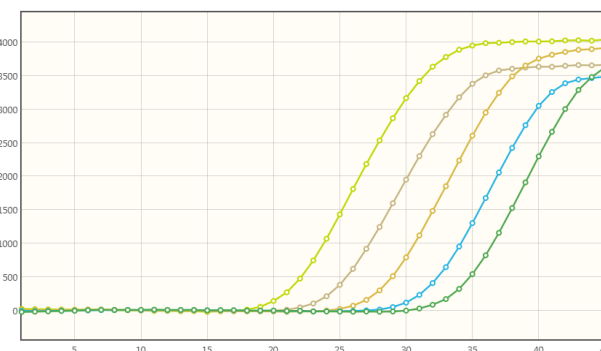
12.2. Analytisk sensitivitet

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har en detektionsgrænse på ≥ 4 kolonidannende enheder pr. reaktion (CFU/rxn) for vanA og ≥ 10 CFU/rxn for vanB (Figur 2 og 3) med en positiv rate på ≥ 95 % for perianale og rektale pødeprøver.

Figur 2. Fortyndingsserier af vanA-gen ($3.62 \cdot 10^4$ - 3.62 CFU/rxn) prøvekørsel på BD MAX™ System (475/520 (FAM) kanal).



Figur 3. Fortyndingsserier af vanB-gen ($5.65 \cdot 10^4$ - 9.98 CFU /rxn) prøvekørsel på BD MAX™ System (585/630 (ROX) kanal).



12.3. Analytisk specificitet

Specificiteten af vancomycinresistensanalysen blev bekræftet ved at teste et panel bestående af forskellige antimikrobielt resistente organismer og forskellige mikroorganismer, der repræsenterer de mest almindelige

enteropatogener eller flora i tarmen. Der blev ikke påvist krydsreaktivitet mellem nogen af følgende testede mikroorganismer, undtagen for de målpatogenerne i hver analyse:

Krydsreaktivitetstest					
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 producerende <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>	-	VanC-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 casseliflavus</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 --typer <i>Enterococcus gallinarum</i>	- / +	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	VanC --type <i>Enterococcus gallinarum</i>	-	<i>Salmonella paratyphi B</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	VanC I- 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>	-	Enterohæmoragisk <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
VIM-1-producerende <i>Citrobacter braakii</i> -isolat	-	Enteroinvasiv <i>Escherichia coli</i>	-	Sapovirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Enterepatogen <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
KPC-3 og VIM-4-producerende <i>Citrobacter freundii</i> -komplekst isolat	-	Enterotoksogen <i>Escherichia coli</i>	-	OXA-48 producerende <i>Serratia marcescens</i> -isolat	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	OXA-244 producerende <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	TEM-1 (ikke-ESBL) og IMP-1-producerende <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>	-	Methicillin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Methicillin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) stamme N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	Methicillin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) stamme ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Methicillin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) stamme (oxa ^R , PVL-positiv, spa-type t310)	-
SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) og OXA-48 producerende <i>Enterobacter cloacae</i> -isolat	-	<i>Helicobacter pylori</i> Clarithromycin-resistent (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
TEM-1 (ikke-ESBL), SHV-12 (ikke-ESBL), CTX-M-15 (ESBL) og NDM-1-producerende <i>Enterobacter cloacae</i> isolat	-	<i>Helicobacter pylori</i> Clarithromycin-resistent (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
NDM-7-producerende <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 producerende <i>Klebsiella pneumoniae</i> -isolat	-		

Tabel 9. Reference patogener mikroorganismer, som anvendes i denne undersøgelse.

12.4. Analytisk reaktivitet











Reaktiviteten for VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit for vanA-genet blev evalueret mod DNA-ekstraheret fra 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, der viste positive resultater.

Reaktiviteten for VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit for vanB -genet blev evalueret mod DNA, der var blevet ekstraheret fra vanB-type *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299, CECT 8120), vanB- type *Enterococcus faecium* (IOWA 2) og vanB og vanC *Enterococcus gallinarum* (ENT20120142) stammer, der viser positive resultater.

Bibliography/Bibliografi

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/ Symboler til in vitro diagnostiske reagenser og produkter

 In vitro diagnostic device In vitro-diagnostisk udstyr	 Keep dry Opbevares tørt	 Use by Anvendes inden	 Manufacturer Producent	 Batch code Batch-kode
 Consult instructions for use Se brugsanvisning	 Temperature limitation Temperaturbegrænsning	 Contains sufficient for <n> tests Indeholder nok til <n> tests	 Unique Device Identification Unik identifikation af enheden	 Catalogue number Katalognummer

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 / Ændringskontrol		
Version No. / Versions Nr.	Changes / Ændringer	Date / Dato
00	Unification of all instructions for use associated with the different catalogue references in a single format / Konsolidering af alle betjeningsvejledninger, der er knyttet til de forskellige katalogreferencer i et enkelt format	21/06/2021

Table A 2. Control change table / Tabel over ændringskontrol.

Revision: 21st June 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

