

**VIASURE**

Real Time PCR Detection Kit



***Vancomycin resistance***  
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Estas instrucciones de uso aplican para la siguiente referencia:

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIA
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. / Referencia del producto para ser utilizado con el Sistema BD MAX™.

## Content

1.	Intended use.....	4
2.	Summary and Explanation .....	4
3.	Principle of the procedure .....	5
4.	Reagents provided .....	5
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user .....	5
6.	Transport and storage conditions.....	6
7.	Precautions for users .....	6
8.	Test procedure .....	7
9.	Result interpretation .....	11
10.	Limitations of the test .....	12
11.	Quality control.....	13
12.	Performance characteristics.....	14

## Contenido

1.	Uso previsto.....	18
2.	Introducción y explicación .....	18
3.	Procedimiento.....	19
4.	Reactivos suministrados.....	19
5.	Material requerido y no suministrado .....	20
6.	Condiciones de transporte y almacenamiento.....	20
7.	Precauciones para el usuario .....	20
8.	Procedimiento del test .....	21
9.	Interpretación de resultados.....	26
10.	Limitaciones del test .....	27
11.	Control de calidad .....	29
12.	Características del test.....	29
	Bibliography/Bibliografía .....	33
	Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i> .....	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  $-20^{\circ}\text{C}$  for up to 192 hours (8 days) or ideally at  $-70^{\circ}\text{C}$  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™ TNA-2 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.
2. Colonies: Pick up two colonies from the cultured medium and suspend them into 500 µL nuclease free water. Ensure complete mixing by vortexing. Add 10 µL of the suspension into a BD MAX™ TNA-2 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

## 8.3. PCR protocol

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

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

Note: If you have already created the 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	680/715
Excitation Channel	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Table 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.

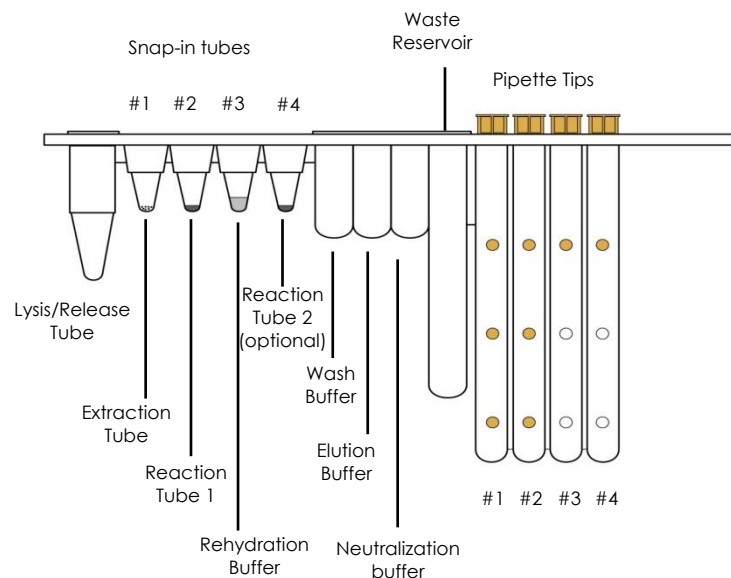
- 12) Click the "Save Test" button.

### 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:

<b>vanA gene (475/520)</b>	<b>vanB gene (585/630)</b>	<b>Internal control (530/565)</b>	<b>Interpretation</b>
+	+	+/- <sup>1</sup>	<b>vanA and vanB genes DNA Detected<sup>1</sup></b>
+	-	+/- <sup>1</sup>	<b>vanA gene DNA Detected, vanB gene DNA Not Detected<sup>1</sup></b>
-	+	+/- <sup>1</sup>	<b>vanB gene DNA Detected, vanA gene DNA Not Detected<sup>1</sup></b>
-	-	+ <sup>2</sup>	<b>vanA and vanB genes DNA Not Detected<sup>2</sup></b>
-	-	- <sup>2</sup>	<b>Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs.<sup>2</sup></b>
IND	IND	IND	<b>Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.</b>
INC	INC	INC	<b>Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.</b>

Table 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  $\geq 4$  colony-forming unit per reaction (CFU/rxn) for *vanA* and  $\geq 10$  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 ( $3.62 \times 10^4$ - $3.62$  CFU/rxn) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

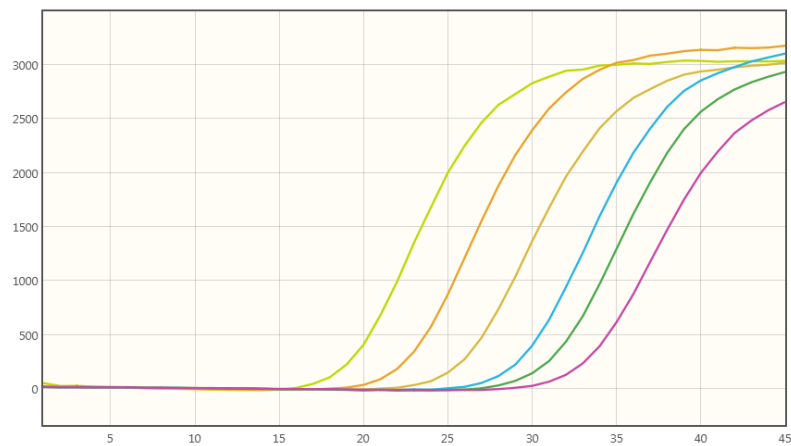
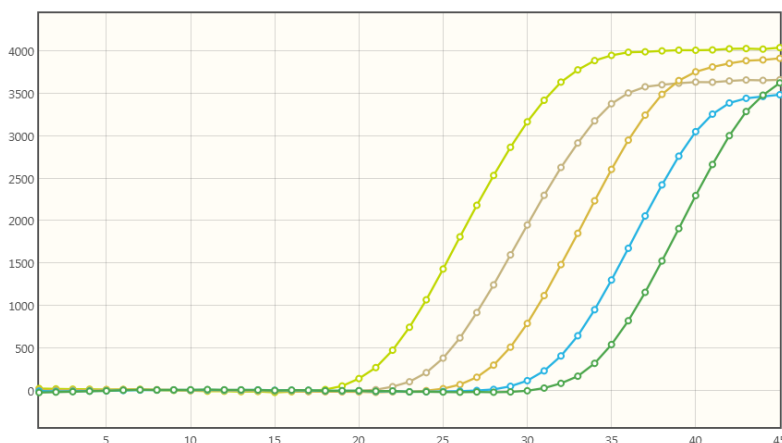


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene ( $5.65 \times 10^4$ - $9.98$  CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



## 12.3. Analytical specificity

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

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

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

## ESPAÑOL

### 1. Uso previsto

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección y diferenciación específica de los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a vancomicina (ERV) directamente a partir de hisopos perianales y/o rectales y colonias. El uso previsto del test es facilitar la identificación de organismos resistentes a la vancomicina en combinación con los signos y síntomas clínicos del paciente y los factores de riesgo epidemiológico. Este test utiliza el sistema BD MAX™ para llevar a cabo la extracción del DNA y posterior PCR a tiempo real utilizando los reactivos suministrados junto con los reactivos universales y desechables del sistema BD MAX™. El DNA extraído a partir de hisopos perianales y/o rectales y colonias, es detectado utilizando una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar los genes *vanA* y *vanB*.

### 2. Introducción y explicación

Los enterococos son organismos comensales comunes que se encuentran en el tracto gastrointestinal y en los genitales femeninos. Recientemente se les reconoce como patógenos oportunistas que causan infecciones nosocomiales como infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel, infecciones respiratorias, endocarditis y sepsis en individuos inmunocomprometidos.

La vancomicina es un antibiótico glucopéptido que inhibe la síntesis de la pared celular y se usa para tratar infecciones graves por bacterianas gram-positivas. Los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) se describieron por primera vez en Inglaterra y Francia en 1986, habiéndose extendido en la actualidad a través de los hospitales de todo el mundo.

La resistencia a la vancomicina es un proceso complejo y necesita la presencia de diferentes grupos de genes. Principalmente, se pueden dividir en dos tipos dependiendo de los precursores pentapéptidos producidos por genes de resistencia a la vancomicina; el precursor que termina en D-Alanina-D-Serina (tipo VanC, VanE, VanG, VanL y VanN) o el que termina en D-Alanine-D-Lactate (tipo VanA, VanB, VanD y VanM). Estos precursores pentapéptidos muestran una baja afinidad por los glucopéptidos, confiriendo así la resistencia a la vancomicina en los enterococos.

El primer tipo de resistencia a la vancomicina en los enterococos se considera resistencia intrínseca (ej. Asociada con el gen *vanC*). Aislados de *Enterococcus gallinarum* y *E. casseliflavus/E. flavescens* muestran esta resistencia inherente a la vancomicina de bajo nivel. Mientras que, el segundo tipo es la resistencia adquirida (ej. relacionada con los genes *vanA* o *vanB*). En este caso, los enterococos pueden volverse resistentes mediante la adquisición de elementos genéticos móviles (transposones y plásmidos) de otra especie de *Enterococcus* u organismo. Más comúnmente, esta resistencia se observa en *E. faecium* y *E. faecalis*, pero también se ha reconocido en *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* y otras especies de enterococos. Los genes *vanA* y *vanB* son responsables de una resistencia a la vancomicina alta o moderada.

La transmisión de enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) puede ocurrir por contacto directo con fluidos corporales de pacientes colonizados o infectados (sangre, drenaje de heridas, orina, heces, esputo y otros) o por contacto indirecto a través de las manos de los trabajadores de la salud, o a través de equipos de cuidado de pacientes o superficies ambientales contaminadas.

Inicialmente, el método de detección más comúnmente aplicado se basó en técnicas de cultivo, que conllevan mucho tiempo y generalmente toman de uno a cinco días para completarse. Para acortar el tiempo de detección y mejorar la sensibilidad, los ensayos de PCR en Tiempo Real han demostrado ser una herramienta para la detección de genes clínicamente relevantes asociados con la resistencia a la vancomicina.

### 3. Procedimiento

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación del DNA que codifica los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) y otros organismos portadores de estos genes que confieren resistencia a la vancomicina. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de la resistencia a vancomicina se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes *vanA* y *vanB*.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en el equipo BD MAX™.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para controlar el proceso de extracción y/o la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
Genes de resistencia a la vancomicina	475/520	<i>vanA</i>
Genes de resistencia a la vancomicina	585/630	<i>vanB</i>
Control Interno (CI)	530/565	-

Tabla 1. Diana, canal y genes.

### 4. Reactivos suministrados

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 2:

Reactivo/Material	Descripción	Código de barras	Cantidad
<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Sellado 1B	2 sobres de 12 tubos transparentes
Rehydration Buffer tube	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Sellado 11	1 sobre de 24 tubos transparentes

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit con Cat. N°. VS-VAN124 (444202).

## 5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref: 442825 o 442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vórtex.
- Micropipetas (entre 2 y 1000 µL).
- Agua libre de nucleasas.
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

## 6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El kit puede usarse hasta 28 días después de abrir las bolsas de aluminio que contienen los tubos de reacción.

## 7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los reactivos si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los reactivos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los reactivos con el cierre zip inmediatamente después de cada uso. Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Proteger y conservar los componentes alejados de la luz.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, el kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-2, cualquier otro reactivo adicional que se necesite para realizar el ensayo y el sistema BD

MAX™ no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiológica o con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles, desechables, libres de RNasa/DNasa, y de barrera para aerosoles o de desplazamiento positivo. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos y las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge).

- Para evitar la contaminación del medio ambiente por amplicones, no rompa las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) después de usarlo. Los sellos de las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) están diseñados para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, manipulación y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) n° 1907/2006 (REACH), "VIASURE Real Time PCR Detection Kits" no requieren ficha de datos de seguridad debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) n° 1272/2008 (CLP) o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.
- Consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener información sobre advertencias, precauciones y procedimientos adicionales.

## 8. Procedimiento del test

### 8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit ha sido testado en hisopos perianales y/o rectales colocados inmediatamente en el medio de transporte líquido ESwab™ (sistema de recolección y transporte de base líquida Amies modificado) (Copan, Italia). VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit también ha sido testado en suspensión de colonias. Otros tipos de muestras deben ser validadas por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, los hisopos perianales y/o rectales deben recogerse y etiquetarse adecuadamente en un medio de transporte limpio de ESwab™ y ser procesados con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los especímenes deben ser transportados entre 2-8°C hasta 24 horas, conforme a la

normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Para transportes largos de duración mayor de 24 horas, se recomienda realizar el envío a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  o menos. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras se pueden almacenar a  $25^{\circ}\text{C}$  hasta 24 horas, 2 a  $8^{\circ}\text{C}$  hasta 144 horas (6 días), congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta 192 horas (8 días) o idealmente a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su conservación durante un tiempo prolongado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras fecales deben ser recogidas, transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas. Para más detalle, consulte la guía CDC (Specimen collection guidelines. Sitio web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> y la guía IDSA (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. Preparación de la muestra y extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra según las recomendaciones del fabricante, detalladas en el instructivo del kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-2. Hay que puntualizar que otro tipo de muestras pueden requerir una etapa de tratamiento previo. La aplicación de procedimientos de extracción específicos debe ser desarrollada y validada por el usuario.

1. Copan ESwab™: pipetear 200  $\mu\text{L}$  de la muestra en ESwab™ en el "Sample Buffer Tube" (Tubo de tampón de muestra) del kit BD MAX™ TNA-2 y cerrar bien el tubo con el tapón perforable. Agitar la muestra con vortex a gran velocidad durante 1 minuto. Proceder con BD MAX™ System Operation.
2. Colonias: Picar dos colonias del medio de cultivo y resuspenderlas en 500  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Agitar mediante vorteo. Añadir 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión en el "Sample Buffer Tube" (Tubo de tampón de muestra) del kit BD MAX™ TNA-2. Cerrar bien el tubo con el tapón perforable. Agitar la muestra con vortex a gran velocidad durante 1 minuto. Proceder con BD MAX™ System Operation.

## 8.3. Protocolo PCR

Nota: Por favor, consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener instrucciones más detalladas.

### 8.3.1. Programación de la prueba VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

Nota: Si ya ha creado el test para VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, puede omitir el paso 8.3.1 e ir directamente al 8.3.2.

- 1) En la pantalla "Run" (Correr) del Sistema BD MAX™, seleccionar la pestaña "Test Editor" (Editor de prueba).
- 2) Hacer click en el botón "Create" (Crear).
- 3) En la pantalla de "Basic Information" (Información básica), en la ventana "Test Name" (Nombre del test), escribir el nombre del test: ej. VIASURE Vancomycin resistance.

- 4) En el menú desplegable "Extraction Type" (Tipo de extracción), seleccionar "ExK TNA-2".
- 5) En el menú desplegable "Master Mix Format" (Formato master mix), elegir "Type 5" (Tipo 5).
  - a. Nota: El producto puede ser usado junto con otros productos VIASURE para BD MAX™, en este caso seleccionar "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizada concentrada Master Mix dual con tampón de rehidratación – Tipo 5).
- 6) En "Sample extraction parameters" (Parámetros de extracción de muestra) seleccionar "User defined" (Definido por usuario) y ajustar el volumen de la muestra a 500 µL.
- 7) En "Ct Calculation" (Cálculo Ct) seleccionar "Call Ct at Threshold Crossing" (Análisis de Ct con cruce del umbral).
- 8) Si se está ejecutando la versión de software 5.00 o superior, en "Custom Barcodes" (Códigos de barra personalizados) seleccionar la siguiente configuración:
  - a. Snap-In 2 "Barcode" (Código de barras): 1B (en relación a *Vancomycin resistance* reaction tube).
  - b. Snap-In 3 "Barcode" (Código de barras): 11 (en relación a Rehydration Buffer tube).
  - c. Snap-In 4 "Barcode" (Código de barras): otro tubo de reacción VIASURE (sellado diferente) si se elige el formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Sección 8.3.1) (MM liofilizada concentrada Master Mix dual con tampón de rehidratación – Tipo 5).
- 9) En la pestaña "PCR settings" (Configuración PCR) introducir los siguientes parámetros: "Channel Settings" (Configuración de los canales), "Gains" (Ganancias) y "Threshold" (Umbral) (Tabla 3).
  - a. Nota: El producto puede ser usado junto con otros productos VIASURE para BD MAX™, en este caso completar "PCR Settings" (Configuración PCR) y "Test Steps" (Pasos de la prueba) para ambas posiciones, Snap-In 2 (verde) y Snap-In 4 (azul).

Channel (Canal)	Alias (Alias)	Gain (Ganancia)	Threshold (Umbral)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	vanA	50	200	0	40
530/565 (HEX)	Cl	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

Tabla 3. PCR settings (Configuración PCR).

Nota: Se recomienda establecer como valor mínimo de partida de *threshold* los indicados anteriormente para cada canal. Sin embargo, el usuario final debe ajustar los valores de *threshold* finales durante la interpretación del resultado para garantizar que el *threshold* se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de *threshold* puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal.

- 10) En la pestaña "PCR settings" (Configuración PCR) introducir también los parámetros "Spectral Cross Talk" (Cross-talk espectral) (Tabla 4).

		False Receiving Channel (Canal de falsa recepción)					
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal de excitación)	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	-	

Tabla 4. Parámetros "Spectral cross-talk" (Cross-talk espectral).

- 11) En la pestaña "Test Steps" (Pasos de la prueba), introducir el protocolo de PCR (Tabla 5).

Step Name (Nombre de la etapa)	Profile Type (Tipo de perfil)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Tiempo (s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Detección)
Initial denaturation (Desnaturalización inicial)	Choque térmico	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Desnaturalización y alineamiento/extensión (recogida de datos))	2- Temperaturas	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabla 5. Protocolo PCR.

- 12) Hacer click en el botón "Save Test" (Guardar prueba).

### 8.3.2. Preparación de la gradilla del sistema BD MAX™

- Para cada muestra, coger una tira de reactivos individual del kit de extracción (BD MAX™ ExK TNA-2 kit). Golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos y colocar la tira de reactivos en la gradilla del sistema BD MAX™.
- Determinar y separar el número de tubos de reactivo de extracción necesarios (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (sello blanco)) de su bolsa protectora. Colocar el tubo de reactivo de extracción (sello blanco) en su posición correspondiente dentro de la tira de reactivos TNA (Posición 1. Código de color blanco en la gradilla. Ver Figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar las bolsas protectoras con el zip.
- Calcular y separar el número adecuado de *Vancomycin resistance* reaction tube (sello 1B) y colocarlos en su posición correspondiente de la tira (Posición 2. Código de color verde en la gradilla. Ver Figura 1).
  - Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres de aluminio con el zip.
  - Para llevar a cabo una rehidratación correcta, asegurarse que el producto liofilizado esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido al área superior del tubo o del sellado del tubo. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.

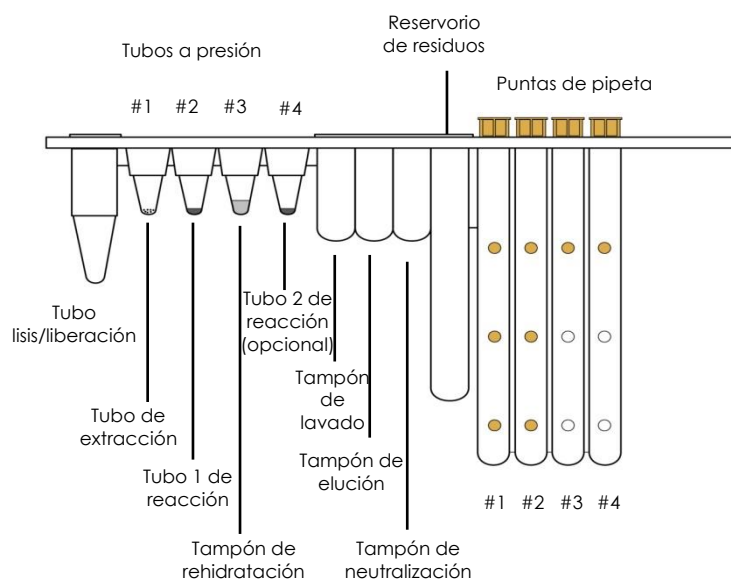
Nota: Si elige el formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Sección 8.3.1) (MM liofilizada concentrada Master Mix dual con tampón de rehidratación – Tipo 5), calcular y separar el número adecuado de



tubos de reacción de los test VIASURE adicionales (sellado diferente) y colocarlos en su posición correspondiente dentro de la tira (Posición 4. Código de color azul en la gradilla. Ver Figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres de aluminio con el zip.

- 4) Coger el número necesario de Rehydration Buffer tubes (sello 11) y colocarlos en su posición correspondiente dentro de la tira (Posición 3. Sin código de color en la gradilla. Ver Figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres con el zip.
  - a. Para llevar a cabo una transferencia correcta, asegúrese de que el líquido esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido a la parte superior del tubo o al sello del mismo. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.

Figura 1. Tira de reactivos individuales BD MAX™ TNA Reagent (TNA)) del kit de extracción BD MAX™ ExK TNA-2 kit.



### 8.3.3. Configuración del instrumento BD MAX™

- 1) Seleccionar la pestaña "Work List" (Lista de trabajo) en la pantalla "Run" (Correr) utilizando el software v4.50A o uno superior del sistema BD MAX™.
- 2) En el menú desplegable "Test" (Test), seleccionar VIASURE *Vancomycin resistance* (si todavía no está creado, consultar la sección 8.3.1).
- 3) Seleccionar en el menú desplegable el número de lote del kit de extracción empleado (situado en el estuche exterior). Este paso es opcional.
- 4) Introducir el número de identificación/el código de barras del "Sample Buffer Tube" (Tubo de tampón de muestra) BD MAX™ ExK TNA-2 en la ventana de "Sample tube" (Tubo de muestra) dentro de la pestaña "Work list" (Lista de trabajo), ya sea escaneando el código de barras con el lector o mediante entrada manual.
- 5) Introducir la identificación de la muestra/paciente y/o "Accession" (Acceso) en la pestaña "Work list" (Lista de trabajo) y haga clic en el botón "Save" (Guardar). Continúe hasta que se introduzcan todos los tubos de tampón de muestra. Asegúrese de que la identificación muestra/paciente y los tubos de tampón de muestra estén correctamente colocados.

- 6) Colocar el tampón de muestra preparado en la(s) gradilla(s) del sistema BD MAX™.
- 7) Colocar la(s) gradilla(s) en el sistema BD MAX™ (la gradilla A se encuentra en el lado izquierdo del sistema BD MAX™ y la gradilla B en el lado derecho).
- 8) Colocar el número necesario de BD MAX™ PCR Cartridges en el sistema BD MAX™.
- 9) Cerrar la puerta del sistema BD MAX™.
- 10) Presionar "Start Run" (Empezar a correr) para comenzar con el procedimiento.

### 8.3.4. Informe BD MAX™

- 1) En el menú principal, hacer click en el botón "Results" (Resultados).
- 2) Hacer doble click en la prueba incluida en la lista de ensayos o seleccionar la prueba y presionar el botón "view" (Ver).
- 3) Hacer click en el botón "Print" (Imprimir), seleccionar: "Run Details, Test Details and Plot..." (Detalles de ejecución, detalles de prueba y gráfica ...)
- 4) Hacer click en el botón "Print or Export" (Imprimir o exportar) de la pantalla "Run Report" (Sacar informe).

## 9. Interpretación de resultados

Para una descripción detallada de cómo analizar los datos, consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™.

El análisis de los datos se realiza con el software del sistema BD MAX™ de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. El software del sistema BD MAX™ proporciona los valores de Ct y muestra las curvas de amplificación para cada uno de los canales de detección de cada muestra que se analiza de la siguiente manera:

- Un valor de Ct de 0 indica que el software no calculó ningún valor de Ct con el umbral especificado (ver Tabla 3). Si la curva de amplificación muestra un "0" como valor de Ct, es necesario analizarla manualmente.
- Un valor de Ct de -1 indica que no ha habido proceso de amplificación.
- Cualquier otro valor de Ct debería de ser interpretado en correlación con la curva de amplificación y según las pautas de interpretación descritas en la Tabla 6.

Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. Además, comprobar que no hay ningún fallo del sistema BD MAX™.

Los resultados deben leerse y analizarse utilizando la siguiente tabla:

Gen <i>vanA</i> (475/520)	Gen <i>vanB</i> (585/630)	Control Interno (530/565)	Interpretación
+	+	+/- <sup>1</sup>	<b><i>vanA</i> y <i>vanB</i> genes DNA Detectado<sup>1</sup></b>
+	-	+/- <sup>1</sup>	<b><i>vanA</i> gen DNA Detectado, <i>vanB</i> gen DNA No Detectado<sup>1</sup></b>
-	+	+/- <sup>1</sup>	<b><i>vanB</i> gen DNA Detectado, <i>vanA</i> gen DNA No Detectado<sup>1</sup></b>
-	-	+ <sup>2</sup>	<b><i>vanA</i> y <i>vanB</i> genes DNA No Detectado<sup>2</sup></b>
-	-	- <sup>2</sup>	<b>Resultado no resuelto (UNR) debido a la presencia de inhibidores en la reacción de PCR o a un problema general (no informado por un código de error) durante el procesamiento de la muestra y/o la etapa de amplificación<sup>2</sup></b>
IND	IND	IND	<b>Resultado indeterminado (IND) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de un fallo del instrumento vinculado a un código de error.</b>
INC	INC	INC	<b>Resultado de ensayo incompleto (INC) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de que no se complete la prueba.</b>

Tabla 6. Interpretación.

+: curva de amplificación  
-: sin curva de amplificación

**1** Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40. El control interno endógeno (CI) puede mostrar o no una señal de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

**2** Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta (Ct menor de 40). La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno. En caso de ausencia de la señal de control interno en muestras negativas (Resultado no resuelto-UNR), se recomienda repetir el ensayo según las siguientes indicaciones.

#### REPETIR PROCEDIMIENTO DEL TEST

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario; verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

NOTA: El tubo de muestra ("Sample Buffer Tube") que se suministra presenta suficiente volumen como para repetir la prueba una segunda vez. Si los tubos de muestra BD MAX™ son almacenados a 2–8°C o 25°C, la nueva prueba debe realizarse dentro de las 24 horas siguientes a su preparación.

NOTA: Se pueden probar en el mismo ensayo muestras nuevas y muestras repetidas.

El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

## 10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con hisopos perianales y/o rectales recolectados en el medio de transporte líquido ESwab™, y suspensiones de colonias.
- Para tener un buen rendimiento de la prueba, el producto liofilizado debe encontrarse en la parte inferior del tubo y no adherido a la parte superior del tubo o al sello de aluminio. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras de hisopos rectales y/o perianales y de las colonias.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con muestras sospechosas de resistencia a vancomicina, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
  - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
  - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
  - Degradación del DNA durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
  - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de los genes *vanA* y/o *vanB*.
  - Una carga de organismos resistentes a vancomicina en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
  - La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes.
  - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Una señal del CI negativa no impide la presencia de DNA de los genes *vanA* y/o *vanB* en una muestra clínica.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de organismos resistentes a vancomicina viables y no implica que estos organismos sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias diana de resistencia a vancomicina.
- Resultados negativos no excluyen padecer la infección por organismos resistentes a vancomicina y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente.
- En el caso de obtener con VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit resultados no resueltos, indeterminados o incompletos se requiere volver a testar de nuevo. Los no resueltos pueden deberse a la presencia de inhibidores en la muestra o debido a una rehidratación incorrecta del tubo de mezcla de reacción liofilizada. Si hay un fallo en el instrumento, se podrán obtener resultados indeterminados o incompletos.

## 11. Control de calidad

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene un control interno (CI) en cada tubo de reacción que confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

## 12. Características del test

### 12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

La sensibilidad y especificidad clínica de VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit fue evaluada empleando muestras clínicas (hisopos rectales) procedentes de pacientes con sospecha de infección con ERV. En la siguiente tabla se incluye un resumen de las localizaciones, tipos de muestra y flujo de trabajo aplicado:

	Centro	Tipo de muestra	Flujo de trabajo	Diana
1	Clinical Microbiology, Centre for Infectious Diseases and Microbiology Laboratory services, NSW Health Pathology, Westmead Hospital (Sydney, Australia)	Hisopo rectal	BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System	Gen VanA
				Gen VanB
				Gen VanA+VanB

Tabla 7. Resumen de los centros, tipos de muestra y flujo de trabajo llevado a cabo durante las evaluaciones clínicas.

Los valores positivo y negativo, falso positivo y negativo, sensibilidad y especificidad para VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit se calcularon en relación con cada ensayo comparador, tal como se muestra en la siguiente tabla:

Centro	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad
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%)

Tabla 8. Valores positivo y negativo verdaderos, valores positivo y negativo falsos, sensibilidad y especificidad, para VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Estos resultados muestran una alta concordancia para detectar los genes *vanA* y *vanB* genes utilizando VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Además de esto, la tasa de fallo del procesamiento de la muestra fue calculada. El número inicial de reacciones no resueltas (UNR) fue 3 (Tasa de UNR inicial: 1,39%). El número de UNR después de la repetición fue 0 (Tasa de UNR final: 0,00%)

Con el fin de evaluar la compatibilidad de VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit adaptado para BD MAX™ con otras matrices de muestras diferentes, se llevó a cabo una evaluación para verificar la detección de enterococos resistentes a vancomicina en suspensiones de colonias.

Se prepararon suspensiones de diferentes colonias añadiendo dos colonias de un cultivo determinado en 500 µl de agua libre de nucleasas. Las cepas utilizadas para esta evaluación fueron CECT 5253 *Enterococcus faecium* *vanA*, CECT 8120 *Enterococcus faecalis* *vanB*, NCTC 12201 *Enterococcus faecalis* *vanA* y NCTC 13632 *Enterococcus faecalis* *vanA*. Se añadió directamente un volumen de 10 µl de cada una de las suspensiones de colonias al tubo de tampón de muestra. El flujo de trabajo utilizado fue el siguiente: BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System.

Los resultados obtenidos mostraron que las suspensiones de colonias de CECT 5253, NCTC 12220 y NCTC 13632 fueron positivas para el gen *vanA* y la suspensión de colonias de CECT 8120 fue positiva para el gen *vanB*.

Estos resultados muestran que VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit puede detectar de manera apropiada los genes *vanA* y *vanB* en suspensiones de colonias.

## 12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tiene un límite de detección de  $\geq 4$  unidades formadoras de colonias por reacción (UFC/rxn) para *vanA* y de  $\geq 10$  unidades formadoras de colonias por reacción (UFC/rxn) para *vanB* (Figuras 2 y 3) con una tasa de aceptación  $\geq$  del 95% en hisopos perianales y rectales.

Figura 2. Diluciones seriadas de gen *vanA* ( $3.62 \cdot 10^4$ - $3.62$  UFC/rxn). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

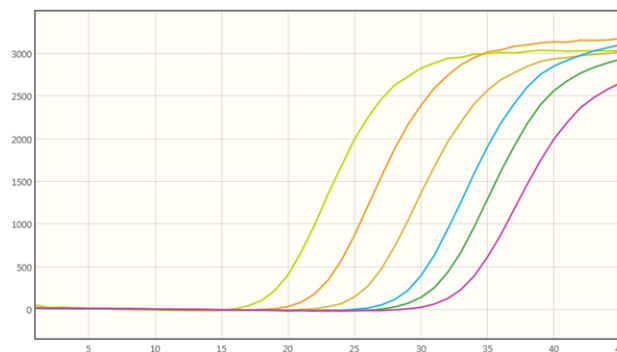
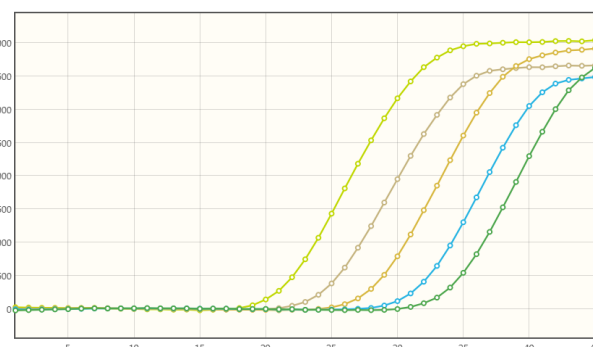


Figura 3. Diluciones seriadas de gen *vanB* ( $5.65 \cdot 10^4$ - $9.98$  UFC/rxn). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 585/630 (ROX)).



### 12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de resistencia a vancomicina fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos resistentes a los antimicrobianos y diferentes microorganismos que representan los patógenos entéricos más comunes o la flora presente en el intestino. No se detectan reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto los patógenos específicos de cada ensayo:

Prueba de reactividad cruzada					
Adenovirus serotipos 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	Aislado de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productor de TEM-1 (no ESBL), SHV-1 (no ESBL), CTX-M-2 (ESBL), y KPC-2	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> genotipo VanC	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> genotipo VanC2	-	Norovirus GI y GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrovirus Genotipos I-VIII	-	<i>Enterococcus faecalis</i> genotipo VanA	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> genotipo VanB	- / +	Rotavirus A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> genotipo VanA	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> genotipo VanB	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> genotipos VanB y VanC	- / +	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> genotipo VanC	-	<i>Salmonella paratyphi B</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> genotipo VanC1	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Aislado de <i>Citrobacter braakii</i> productor de VIM-1	-	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	-	Sapovirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Aislado de <i>Citrobacter freundii</i> -complex productor de KPC-3 y VIM-4	-	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	-	Aislado de <i>Serratia marcescens</i> productor de OXA-48	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	Aislado de <i>Escherichia coli</i> productor de OXA-244	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	Aislado de <i>Escherichia coli</i> productor de TEM-1 (no ESBL) y IMP-1	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina (mecC)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina (MRSA) cepa N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina (MRSA) cepa (oxa <sup>R</sup> , PVL positiva, spa tipo t310)	-
Aislado de <i>Enterobacter cloacae</i> productor de SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-	<i>Helicobacter pylori</i> resistente a claritromicina (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
Aislado de <i>Enterobacter cloacae</i> productor de TEM-1 (no ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	-	<i>Helicobacter pylori</i> resistente a claritromicina (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Aislado de <i>Enterobacter cloacae</i> -complex productor de NDM-7	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Enterococcus avium</i> genotipo VanA	+ / -	Aislado de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productor de SHV-1 (no ESBL), KPC-3, y OXA-48	-		

Tabla 9. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

## 12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit para gen *vanA* se evaluó frente a DNA extraído de las cepas *Enterococcus avium* genotipo *vanA*, *Enterococcus faecalis* genotipo *vanA* (NCTC 13632, NCTC 12201) y *Enterococcus faecium* genotipo *vanA* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202), mostrando un resultado positivo.











La reactividad de VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit para gen *vanB* se evaluó frente a DNA extraído de las cepas *Enterococcus faecalis* genotipo *vanB* (ATCC 51299, CECT 8120), *Enterococcus faecium* genotipo *vanB* (IOWA 2) y *Enterococcus gallinarum* genotipo *vanB* y *vanC* (ENT20120142), mostrando un resultado positivo.



## Bibliography/Bibliografía

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/ Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

 <b>IVD</b>	<i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Keep dry Almacenar en lugar seco	 Use by Fecha de caducidad	 Manufacturer Fabricante	 <b>LOT</b> Batch code Número de lote
 <b>i</b>	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	 Temperature limitation Limitación de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	 <b>UDI</b> Unique Device Identification Identificación única de dispositivo	 <b>REF</b> Catalogue number Número de referencia

## 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.

<b>Control de Cambios / Change Control</b>		
<b>Versión / Version nº</b>	<b>Cambios / Changes</b>	<b>Fecha / Date</b>
00	Unification of all instructions for use associated with the different catalogue references in a single format / Unificación de todas las instrucciones de uso asociadas a las diferentes referencias de catálogo en un único formato.	19/04/2021

Table A 2. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

Revision: 19<sup>th</sup> 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](http://www.certest.es)

*One step ahead*



F-566 rev01

