

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Vancomycin resistance
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Αυτές οι οδηγίες χρήσης ισχύουν για τα εξής

PRODUCT / ΠΡΟΪΟΝ	REFERENCE / ΚΩΔΙΚΟΣ
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. / Αναφορά για τα προϊόντα που χρησιμοποιούνται με το BD MAX™ System.

Content

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

Περιεχόμενο

1.	Προβλεπόμενη χρήση	19
2.	Σύνοψη και επεξήγηση	19
3.	Αρχή της διαδικασίας.....	20
4.	Παρεχόμενα αντιδραστήρια	20
5.	Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που παρέχονται από τον χρήστη.....	21
6.	Συνθήκες μεταφοράς και αποθήκευσης	21
7.	Προφυλάξεις για τους χρήστες	21
8.	Διαδικασία του τεστ	22
8.1.	Συλλογή, μεταφορά και αποθήκευση δειγμάτων.....	22
8.2.	Προετοιμασία δείγματος και εξαγωγή DNA	23
8.3.	Πρωτόκολλο PCR	23

9.	Ερμηνεία αποτελεσμάτων	27
10.	Περιορισμοί του τεστ	29
11.	Ποιοτικός έλεγχος	30
12.	Χαρακτηριστικά απόδοσης	30
12.1.	Κλινική ευαισθησία και ειδικότητα	30
12.2.	Ευαισθησία ανάλυσης	31
12.3.	Αναλυτική ειδικότητα.....	32
12.4.	Αναλυτική αντιδραστικότητα	33
	Bibliography/ Βιβλιογραφία	34
	Symbols for IVD components and reagents/ Σύμβολα για στοιχεία και αντιδραστήρια IVD.....	34
	Trademarks.....	34

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™ 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.

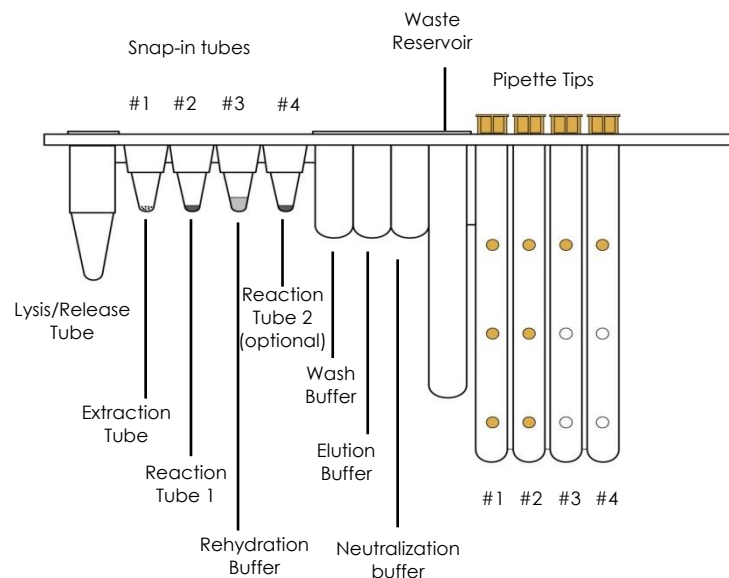
- 12) Click the "Save Test" button.

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:

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).

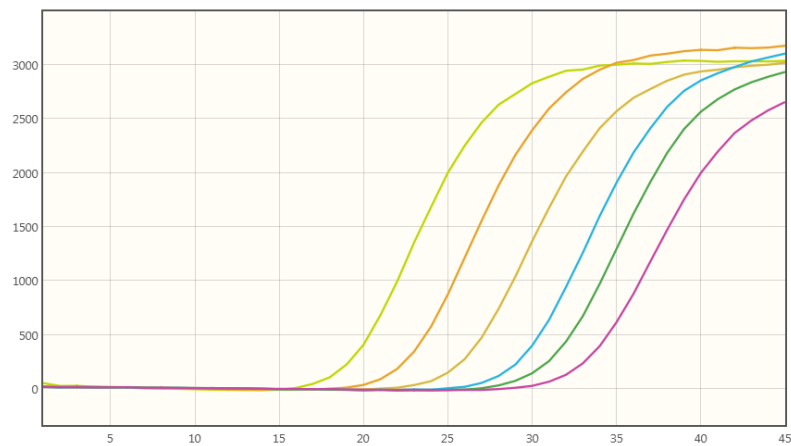
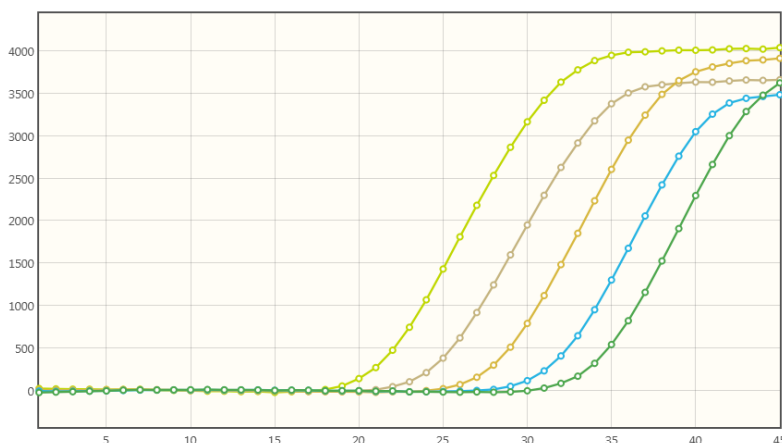


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene (5.65×10^4 - 9.98 CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



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 pneumoniae</i> isolate	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	VanC- type <i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	VanC2- type <i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	Norovirus GI and GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrovirus Genotype I-VIII	-	VanA-type <i>Enterococcus faecalis</i>	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	VanB-type <i>Enterococcus faecalis</i>	- / +	Rotavirus A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	VanA- type <i>Enterococcus faecium</i>	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	VanB- type <i>Enterococcus faecium</i>	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	VanB and VanC- types <i>Enterococcus gallinarum</i>	- / +	<i>Salmonella paratyphi</i> A	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	VanC – type <i>Enterococcus gallinarum</i>	-	<i>Salmonella paratyphi</i> B	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	VanC1- type <i>Enterococcus gallinarum</i>	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
VIM-1 producing <i>Citrobacter braakii</i> isolate	-	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-	Sapovirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
KPC-3 and VIM-4 producing <i>Citrobacter freundii</i> -complex isolate	-	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	-	OXA-48 producing <i>Serratia marcescens</i> isolate	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	OXA-244 producing <i>Escherichia coli</i> isolate	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	TEM-1 (non-ESBL) and IMP-1 producing <i>Escherichia coli</i> isolate	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (mecC)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) strain N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) strain (oxa ^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 pneumoniae</i> isolate	-		

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit for *vanA* gene was evaluated against 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.

ΕΛΛΗΝΙΚΑ

1. Προβλεπόμενη χρήση

Το VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit είναι σχεδιασμένο για την ειδική ανίχνευση και διαφοροποίηση των γονιδίων *vanA* και *vanB*, τα οποία μπορεί να σχετίζονται με τους ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη εντερόκοκκους (VRE), απευθείας από περιπρωκτικά ή/και ορθικά επιχρίσματα και αποικίες. Αυτό το τεστ προορίζεται για χρήση ως βοήθημα στην ταυτοποίηση των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη οργανισμών σε συνδυασμό με τις κλινικές ενδείξεις και τα συμπτώματα του ασθενούς, καθώς και τους παράγοντες επιδημιολογικού κινδύνου. Η ανάλυση χρησιμοποιεί το BD MAX™ System για την αυτοματοποιημένη εξαγωγή του DNA και της επακόλουθης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε πραγματικό χρόνο, αξιοποιώντας τα αντιδραστήρια που παρέχονται σε συνδυασμό με καθολικά αντιδραστήρια και αναλώσιμα για το BD MAX™ System. Το DNA από περιπρωκτικά ή/και ορθικά επιχρίσματα και αποικίες ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας φθορίζοντες ανιχνευτές χρωστικής αναφοράς, ειδικούς για τα γονίδια *vanA* και *vanB*.

2. Σύνοψη και επεξήγηση

Οι εντερόκοκκοι είναι κοινοί συμβιωτικοί οργανισμοί, οι οποίοι εντοπίζονται στο γαστρεντερικό σύστημα και τα θηλυκά γεννητικά όργανα. Προσφάτως έχουν αναγνωριστεί ως ευκαιριακά παθογόνα, τα οποία προκαλούν νοσοκομειακές λοιμώξεις, όπως ουρολοιμώξεις, δερματικές λοιμώξεις, αναπνευστικές λοιμώξεις, ενδοκαρδίτιδα και σηψαιμία, σε κατεσταλμένο ξενιστή.

Η βανκομυκίνη είναι ένα γλυκοπεπτιδικό αντιβιοτικό, το οποίο αναστέλλει τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση σοβαρών Gram-θετικών βακτηριακών λοιμώξεων. Οι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη εντερόκοκκοι (VRE) αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στην Αγγλία και τη Γαλλία το 1986 και πλέον έχουν εξαπλωθεί σε νοσοκομεία σε ολόκληρο τον κόσμο.

Η αντοχή στη βανκομυκίνη είναι μια περίπλοκη διεργασία, η οποία απαιτεί την παρουσία διαφορετικών συμπλεγμάτων γονιδίων. Χωρίζονται κατά κύριο λόγο σε δύο τύπους, ανάλογα με τα πρόδρομα πενταπεπτίδια που παράγονται από τα γονίδια αντοχής στη βανκομυκίνη: το πρόδρομο που λήγει σε D-Αλανίνη-D-Σερίνη (τύπος VanC-, VanE-, VanG-, VanL- και VanN-) ή σε D-Αλανίνη-D-Γαλακτικό (τύπος VanA-, VanB-, VanD- και VanM-). Αυτά τα πρόδρομα πενταπεπτίδια έδειξαν χαμηλό βαθμό συγγένειας με τα γλυκοπεπτίδια και προσέδωσαν αντοχή στη βανκομυκίνη στους εντερόκοκκους.

Ο πρώτος τύπος αντοχής στη βανκομυκίνη στους εντερόκοκκους είναι η ενδογενής αντοχή (δηλ. αυτή που σχετίζεται με το γονίδιο *vanC*). Απομονωμένα στελέχη των *Enterococcus gallinarum* και *E. casseliflavus/E. flavescens* παρουσιάζουν μια ενδογενή, χαμηλού επιπέδου αντοχή στη βανκομυκίνη. Ο δεύτερος τύπος είναι η επίκτητη αντοχή (δηλ. γονίδια *vanA* ή *vanB*), στην οποία οι εντερόκοκκοι καθίστανται ανθεκτικοί αποκτώντας μεταθετά γενετικά στοιχεία (τρανσποζόνια και πλασμίδια) από άλλα είδη εντερόκοκκου ή οργανισμούς. Η αντοχή αυτή παρατηρείται συχνότερα στα *E. faecium* και *E. faecalis*, αλλά έχει επίσης ταυτοποιηθεί στα *E. raffinosus*, *E. anium*, *E. durans* και αρκετά άλλα είδη εντερόκοκκου. Τα γονίδια *vanA* και *vanB* είναι υπεύθυνα για τα υψηλά ή μέτρια επίπεδα αντοχής στη βανκομυκίνη.

Η μετάδοση ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντερόκοκκων (VRE) μπορεί να γίνει μέσω άμεσης επαφής με σωματικά υγρά από ασθενείς που έχουν αποικιστεί ή παρουσιάσει λοίμωξη (αίμα, παροχέτευση τραύματος, ούρα, κόπρανα,

πύελα και άλλα) ή με έμμεση επαφή μέσω των χεριών των επαγγελματιών υγείας ή από μολυσμένο εξοπλισμό περίθαλψης ασθενών ή επιφανειών του περιβάλλοντος.

Αρχικά, η μέθοδος ελέγχου που εφαρμόστηκε βασιζόταν σε καλλιέργεια, η οποία είναι χρονοβόρα και χρειάζεται γενικά από μία έως πέντε ημέρες για να ολοκληρωθεί. Οι αναλύσεις PCR σε πραγματικό χρόνο έχουν δείξει ότι αποτελούν ένα εργαλείο ανίχνευσης των κλινικά συναφών γονιδίων που σχετίζονται με την αντοχή στη βανκομυκίνη.

3. Αρχή της διαδικασίας

Το VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit είναι σχεδιασμένο για την ταυτοποίηση και διαφοροποίηση του DNA από ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη εντερόκοκκους και άλλους οργανισμούς που φέρουν τα γονίδια αντοχής στη βανκομυκίνη *vanA* και *vanB*. Μετά την απομόνωση του DNA, η ταυτοποίηση της αντοχής στη βανκομυκίνη γίνεται μέσω της ενίσχυσης μιας συντηρημένης περιοχής των γονιδίων *vanA* και *vanB*, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές και έναν ανιχνευτή φθορίζουσας σήμανσης.

Το VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit βασίζεται στη δραστηριότητα εξωνουκλεάσης 5' της πολυμεράσης DNA. Κατά την ενίσχυση του DNA, αυτό το ένζυμο διασπά τον ανιχνευτή που συνδέεται με τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA, διαχωρίζοντας τη χρωστική απόσβεσης από τον ανιχνευτή αναφοράς. Αυτή η αντίδραση δημιουργεί αύξηση στο σήμα φθορισμού που είναι ανάλογη με την ποσότητα του προτύπου-στόχου. Η μέτρηση του φθορισμού αυτού γίνεται στο BD MAX™ System.

Το VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit περιέχει σε κάθε σωληνάριο όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο (ειδικοί εκκινητές/ανιχνευτές, dNTPS, ρυθμιστικό διάλυμα, πολυμεράση) σε σταθεροποιημένη μορφή, καθώς και έναν εσωτερικό μάρτυρα για την παρακολούθηση της διαδικασίας εξαγωγής ή/και της αναστολής της δραστηριότητας της πολυμεράσης.

Στόχος	Κανάλι	Γονίδιο
Γονίδια αντοχής στη βανκομυκίνη	475/520	<i>vanA</i>
Γονίδια αντοχής στη βανκομυκίνη	585/630	<i>vanB</i>
Εσωτερικός μάρτυρας (IC)	530/565	-

Πίνακας 10. Στόχος, κανάλι και γονίδια.

4. Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Το VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit περιλαμβάνει τα ακόλουθα υλικά και αντιδραστήρια που παρατίθενται αναλυτικά στον Πίνακα 2:

Αντιδραστήριο/Υλικό	Περιγραφή	Γραμμωτός κώδικας	Ποσότητα
<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube	Ένα μείγμα ενζύμων, ανιχνευτών-εκκινητών, ρυθμιστικού διαλύματος, dNTPs, σταθεροποιητών και εσωτερικού μάρτυρα σε σταθεροποιημένη μορφή	Αλουμινόχαρτο 1B	2 σακούλες των 12 διάφανων σωληναρίων
Rehydration Buffer tube	Διάλυμα για την ανασύσταση του σταθεροποιημένου προϊόντος	Αλουμινόχαρτο 11	1 σακούλα των 24 διάφανων σωληναρίων

Πίνακας 11. Αντιδραστήρια και υλικά που παρέχονται στο VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit με Αρ. Κατ. VS-VAN124 (444202).

5. Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που παρέχονται από τον χρήστη

Στην ακόλουθη λίστα περιλαμβάνονται τα υλικά και ο εξοπλισμός που απαιτούνται για τη χρήση, αλλά δεν περιλαμβάνονται στο VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Όργανο PCR σε πραγματικό χρόνο: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Αναφ: 442825 ή 442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Αναφ: 437519).
- Στρόβιλος.
- Μικροπιπέτες (ακρίβεια μεταξύ 2 και 1000 µL).
- Νερό χωρίς νουκλεάσες.
- Άκρα φίλτρου.
- Γάντια μίας χρήσης χωρίς πούδρα.

6. Συνθήκες μεταφοράς και αποθήκευσης

- Τα κιτ μπορούν να αποσταλούν και να αποθηκευτούν σε θερμοκρασίες 2-40°C έως την ημερομηνία λήξης η οποία δηλώνεται στην ετικέτα.
- Μετά το άνοιγμα των θηκών αλουμινίου που περιέχουν τους σωλήνες αντίδρασης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για έως και 28 ημέρες.

7. Προφυλάξεις για τους χρήστες

- Το προϊόν προορίζεται για χρήση μόνο από επαγγελματίες, όπως επαγγελματίες και τεχνικούς εργαστηρίου ή νοσηλευτικού ιδρύματος οι οποίοι έχουν εκπαιδευτεί σε μοριακές βιολογικές τεχνικές.
- Για διαγνωστικούς σκοπούς *in vitro*.
- Μην χρησιμοποιείτε ληγμένα αντιδραστήρια ή/και υλικά.
- Μην χρησιμοποιείτε το κιτ εάν έχει ανοιχτεί η ετικέτα που σφραγίζει το εξωτερικό κουτί.
- Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν το προστατευτικό κουτί είναι ανοιχτό ή σπασμένο κατά την άφιξη.
- Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν οι προστατευτικές θήκες είναι ανοιχτές ή σπασμένες κατά την άφιξη.
- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια εάν δεν υπάρχει το αποξηραντικό ή αν είναι σπασμένο μέσα στις θήκες των αντιδραστηρίων.
- Μην αφαιρείτε το αποξηραντικό από τις θήκες αντιδραστηρίων.
- Κλείστε αμέσως τα προστατευτικά σακουλάκια των αντιδραστηρίων με το φερμουάρ σφράγισης μετά από κάθε χρήση. Αφαιρέστε τυχόν πλεονάζοντα αέρα από τα σακουλάκια πριν από τη σφράγιση.
- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια εάν το αλουμινοχαρτό έχει ανοιχτεί ή έχει υποστεί ζημιά.
- Μην αναμιγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικά σακουλάκια ή/και κιτ ή/και παρτίδες.
- Προστατεύστε τα αντιδραστήρια από την υγρασία. Η παρατεταμένη έκθεση σε υγρασία μπορεί να επηρεάσει την απόδοση του προϊόντος.
- Διατηρήστε τα στοιχεία μακριά από το φως.
- Σε περιπτώσεις κατά τις οποίες διεξάγονται άλλα τεστ PCR στην ίδια γενική περιοχή του εργαστηρίου, πρέπει να είστε ιδιαίτερα προσεκτικοί ώστε να εξασφαλίσετε ότι το VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, το κBD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit, τυχόν πρόσθετα αντιδραστήρια που απαιτούνται για τον έλεγχο και το BD MAX™ System δεν έχουν μολυνθεί. Αποφύγετε πάση θυσία τη μόλυνση των

αντιδραστηρίων από μικρόβια και ριβονουκλεάση (RNase)/δεοξυριβονουκλεάση (DNase). Συνιστάται η χρήση στείρων άκρων πιπέτας μίας χρήσης χωρίς ριβονουκλεάση (RNase)/δεοξυριβονουκλεάση (DNase), ανθεκτικών σε αεροζόλ ή θετικής μετατόπισης. Χρησιμοποιήστε νέο άκρο για κάθε δείγμα. Θα πρέπει να αλλάζετε γάντια πριν από το χειρισμό των αντιδραστηρίων και των δοχείων.

- Για την αποφυγή μόλυνσης του περιβάλλοντος από αμπλικόνια, μην αποσυναρμολογήσετε το δοχείο BD MAX™ PCR Cartridge μετά τη χρήση. Οι δακτύλιοι στεγανοποίησης του δοχείου BD MAX™ PCR Cartridge έχουν σχεδιαστεί για την αποφυγή της μόλυνσης.
- Σχεδιάστε μια μονόδρομη ροή εργασιών. Θα πρέπει να ξεκινά από την περιοχή εξαγωγής και να συνεχίζει στην περιοχή ενίσχυσης και ανίχνευσης. Μην επιστρέφετε δείγματα, εξοπλισμό και αντιδραστήρια στην περιοχή στην οποία πραγματοποιήθηκε το προηγούμενο βήμα.
- Ακολουθήστε τις καλές πρακτικές εργαστηρίου. Φορέστε προστατευτικά ρούχα, χρησιμοποιήστε γάντια μίας χρήσης, γυαλιά και μάσκα. Μην τρώτε, πίνετε, καπνίζετε ή χρησιμοποιείτε καλλυντικά προϊόντα στην περιοχή εργασίας. Πλύνετε τα χέρια σας μετά την ολοκλήρωση του τεστ.
- Τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά μολυσματικά ή/και βιολογικά επικίνδυνα υλικά, όπως επίσης και όλα τα αντιδραστήρια και τα υλικά που έχουν εκτεθεί στα δείγματα και ο χειρισμός τους πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους εθνικούς κανονισμούς ασφαλείας. Λάβετε τις απαραίτητες προφυλάξεις κατά τη συλλογή, τη μεταφορά, την αποθήκευση, τον χειρισμό και την απόρριψη των δειγμάτων.
- Ο χειρισμός των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται σε θάλαμο βιολογικής ασφάλειας. Χρησιμοποιείτε personal protective equipment (PPE) που συνάδει με τις τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες, για τον χειρισμό των δυνητικά μολυσματικών δειγμάτων. Η διάθεση των αποβλήτων πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους ισχύοντες τοπικούς και περιφερειακούς κανονισμούς.
- Συνιστάται η τακτική απολύμανση του συνήθως χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού, ειδικά στις μικροπιπέτες και τις επιφάνειες εργασίας.
- Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) Αρ. 1907/2006 (REACH), δεν απαιτούνται δελτία δεδομένων ασφαλείας (Safety Data Sheets) για τα κιτ "VIASURE Real Time PCR Detection Kits", λόγω της ταξινόμησής τους ως μη επικίνδυνων για την υγεία και το περιβάλλον, εφόσον δεν περιέχουν ουσίες ή/και μείγματα που να ανταποκρίνονται στα κριτήρια ταξινόμησης ουσιών ως επικίνδυνων, όπως αυτά παρουσιάζονται στον Κανονισμό (ΕΚ) Αρ. 1272/2008 (CLP), ή οι ουσίες/τα μείγματα δεν περιέχονται σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από την τιμή που καθορίζεται στον προαναφερθέντα κανονισμό για τη δήλωσή τους.
- Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του BD MAX™ System για πρόσθετες προειδοποιήσεις, προφυλάξεις και διαδικασίες.

8. Διαδικασία του τεστ

8.1. Συλλογή, μεταφορά και αποθήκευση δειγμάτων

Το VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit έχει δοκιμαστεί σε περιπρωκτικά ή/και ορθικά επιχρίσματα, τα οποία τοποθετούνται αμέσως σε μέσο μεταφοράς ESwab™ (σύστημα συλλογής και μεταφοράς που βασίζεται σε liquid Amies) (Coran, Ιταλία). Το VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit έχει επίσης δοκιμαστεί σε εναιωρήματα αποικιών. Οι διαφορετικοί τύποι δειγμάτων θα πρέπει να επικυρωθούν από τον χρήστη.

Τα δείγματα συλλογής, αποθήκευσης και μεταφοράς πρέπει να διατηρούνται σύμφωνα με τις συνθήκες που επικυρώνονται από τον χρήστη. Συνολικά, τα περιπρωκτικά ή/και ορθικά επιχρίσματα πρέπει να συλλέγονται και να

επισημαίνονται κατάλληλα σε καθαρό υλικό μεταφοράς ESwab™ και να υποβάλλονται σε επεξεργασία το συντομότερο δυνατό ώστε να διασφαλιστεί η ποιότητα του τεστ. Τα δείγματα πρέπει να μεταφέρονται σε θερμοκρασίες από 2 έως 8°C για έως και 24 ώρες, σύμφωνα με τους τοπικούς και εθνικούς κανονισμούς για τη μεταφορά παθογόνου υλικού. Για μακροπρόθεσμη μεταφορά (περισσότερες από 24 ώρες), προτείνουμε την αποστολή σε θερμοκρασία $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ή χαμηλότερη. Προτείνεται η χρήση νέων δειγμάτων για το τεστ. Τα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν στους 25°C για έως και 24 ώρες, στους 2 έως 8°C για έως και 144 ώρες (6 ημέρες), κατεψυγμένα στους -20°C για έως και 192 ώρες (8 ημέρες) ή ιδανικά στους -70°C για συντήρηση. Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ψύξης-απόψυξης πρέπει να αποφεύγονται προκειμένου να αποφευχθεί η υποβάθμιση του δείγματος και των νουκλεϊκών οξέων.

Τα δείγματα κοπράνων πρέπει να συλλέγονται, να μεταφέρονται και να φυλάσσονται σύμφωνα με τις κατάλληλες κατευθυντήριες οδηγίες του εργαστηρίου. Για λεπτομέρειες ανατρέξτε στην οδηγία CDC (Specimen collection guidelines. Ιστοσελίδα <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) και στο 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. Προετοιμασία δείγματος και εξαγωγή DNA

Εκτελέστε την προετοιμασία του δείγματος σύμφωνα με τις συστάσεις στις οδηγίες χρήσης του kit εξαγωγής που χρησιμοποιείται, BD MAX™ ExC™ TNA-2. Σημειώστε ότι ορισμένα άλλα δείγματα μπορεί να απαιτούν προεπεξεργασία. Πρέπει να αναπυχθούν και να επικυρωθούν από τον χρήστη οι διαδικασίες προετοιμασίας εξαγωγής για συγκεκριμένες εφαρμογές.

1. Copan ESwab™: Χορηγήστε με πιπέττα 200 μL του δείγματος ESwab™ σε BD MAX™ ExC™ TNA-2 Sample Buffer Tube και κλείστε τον σωλήνα με πώμα διαφράγματος. Εξασφαλίστε την πλήρη ανάμιξη στροβιλίζοντας το δείγμα σε υψηλή ταχύτητα για 1 λεπτό. Προχωρήστε στη διαδικασία BD MAX™ System Operation.
2. Αποικίες: Συλλέξτε δύο αποικίες από το υλικό της καλλιέργειας και εναιωρήστε τις σε 500 μL νερό χωρίς νουκλεάσες. Διασφαλίστε την πλήρη ανάμιξη στροβιλίζοντας το δείγμα. Προσθέστε 10 μL του εναιωρήματος σε BD MAX™ ExC™ TNA-2 Sample Buffer Tube και κλείστε τον σωλήνα με πώμα διαφράγματος. Εξασφαλίστε την πλήρη ανάμιξη στροβιλίζοντας το δείγμα σε υψηλή ταχύτητα για 1 λεπτό. Προχωρήστε στη διαδικασία BD MAX™ System Operation.

8.3. Πρωτόκολλο PCR

Σημείωση: Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του BD MAX™ System για αναλυτικές οδηγίες.

8.3.1. Δημιουργία προγράμματος τεστ PCR για το VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

Σημείωση: Αν έχετε ήδη δημιουργήσει το τεστ για το VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, μπορείτε να παραλείψετε το βήμα 8.3.1 και να μεταβείτε απευθείας στο βήμα 8.3.2.

- 1) Στην οθόνη "Run" (Εκτέλεση) του BD MAX™ System, επιλέξτε την καρτέλα "Test Editor" (Επεξεργασία τεστ).
- 2) Κάντε κλικ στο κουμπί "Create" (Δημιουργία).

- 3) Στην καρτέλα "Basic Information" (Βασικές πληροφορίες), εντός του παραθύρου "Test Name" (Όνομα τεστ), δώστε ένα όνομα στο τεστ: δηλ. VIASURE *Vancomycin resistance*.
- 4) Στο αναπτυσσόμενο μενού "Extraction Type" (Τύπος εξαγωγής), επιλέξτε "Exk TNA-2".
- 5) Στο αναπτυσσόμενο μενού "Master Mix Format" (Μορφή κύριας ανάμειξης), επιλέξτε "Type 5" (Τύπος 5).
 - α. Σημείωση: Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με πρόσθετο τεστ VIASURE για BD MAX™ και στη συνέχεια να επιλέξετε "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Συμπυκνωμένο λυοφιλοποιημένο MM διπλής κύριας ανάμειξης με ρυθμιστικό διάλυμα επανυδάτωσης (Τύπος 5)).
- 6) Στην περιοχή "Sample extraction parameters" (Παράμετροι εξαγωγής δείγματος), επιλέξτε "User defined" (Καθορισμός από τον χρήστη) και προσαρμόστε τον όγκο του δείγματος σε 500 µL.
- 7) Στην περιοχή "Ct Calculation" (Υπολογισμός Ct), επιλέξτε "Call Ct at Threshold Crossing" (Κλήση Ct κατά την υπέρβαση κατώφλιου).
- 8) Εάν χρησιμοποιείτε την έκδοση λογισμικού 5.00 ή μεταγενέστερη, επιλέξτε τα ακόλουθα στο "Custom Barcodes" (Προσαρμοσμένοι γραμμωτοί κώδικες):
 - α. "Snap-In 2 Barcode" (Γραμμωτός κώδικας θέσης προσάρτησης 2): 1B (αφορά το σωληνάριο αντίδρασης αντοχής στη βανκομυκίνη).
 - β. "Snap-In 3 Barcode" (Γραμμωτός κώδικας θέσης προσάρτησης 3): 11 (αφορά το σωληνάριο Rehydration Buffer tube)
 - γ. "Snap-In 4 Barcode" (Γραμμωτός κώδικας θέσης προσάρτησης 4): ένα άλλο σωληνάριο αντίδρασης VIASURE (διαφορετικό αλουμινόχαρτο) αν επιλέξετε τη μορφή "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Συμπυκνωμένο λυοφιλοποιημένο MM διπλής κύριας ανάμειξης με ρυθμιστικό διάλυμα επανυδάτωσης (Τύπος 5)) (Ενότητα 8.3.1).
- 9) Στην καρτέλα "PCR settings" (Ρυθμίσεις PCR), εισαγάγετε τις ακόλουθες παραμέτρους: "Channel Settings" (Ρυθμίσεις καναλιού), "Gains" (Αυξήσεις) και "Threshold" (Κατώφλιο) (Πίνακας 3).
 - α. Σημείωση: Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με πρόσθετο τεστ VIASURE για BD MAX™. Οι "PCR Settings" (Ρυθμίσεις PCR) και τα "Test Steps" (Βήματα τεστ) θα πρέπει να ολοκληρωθούν για τη Θέση προσάρτησης 2 (πράσινο) και τη Θέση προσάρτησης 4 (μπλε).

Channel (Κανάλι)	Alias (Ψευδώνυμο)	Gain (Αύξηση)	Threshold (Κατώφλιο)	Ct Min (Ελάχιστο Ct)	Ct Max (Μέγιστο Ct)
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

Πίνακας 12. PCR settings (Ρυθμίσεις PCR).

Σημείωση: Συνιστάται να ορίσετε τις ελάχιστες τιμές κατώφλιου που αναφέρονται παραπάνω για κάθε κανάλι ως σημείο εκκίνησης, αλλά οι τελικές ρυθμίσεις πρέπει να καθορίζονται από τον τελικό χρήστη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι τα κατώφλια εμπίπτουν εντός της εκθετικής φάσης των καμπυλών φθορισμού και πάνω από οποιοδήποτε σήμα υποβάθρου. Η τιμή κατώφλιου μπορεί να διαφέρει για διαφορετικά όργανα λόγω των διαφορετικών εντάσεων σήματος.

- 10) Στην καρτέλα “PCR settings” (Ρυθμίσεις PCR), εισαγάγετε επίσης τις ακόλουθες παραμέτρους “Spectral Cross Talk” (Φασματική συνακρόαση) (Πίνακας 4).

		False Receiving Channel (Εσφαλμένο κανάλι υποδοχής)				
Channel (Κανάλι)		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Κανάλι διέγερσης)	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	-

Πίνακας 13. Παράμετροι spectral cross-talk (φασματικής συνακρόασης).

- 11) Στην καρτέλα “Test Steps” (Βήματα τεστ), εισαγάγετε το πρωτόκολλο PCR (Πίνακας 5).

Step Name (Όνομα βήματος)	Profile Type (Τύπος προφίλ)	Cycles (Κύκλοι)	Time (s) (Χρόνοι (δ.))	Temperature (Θερμοκρασία)	Detect (Ανίχνευση)
Initial denaturation (Αρχική μετουσίωση)	Κράτηση	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Μετουσίωση και ανόπηση/επέκταση (Συλλογή δεδομένων))	2-Θερμοκρασία	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Πίνακας 14. Πρωτόκολλο PCR.

- 12) Κάντε κλικ στο κουμπί “Save Test” (Αποθήκευση τεστ).

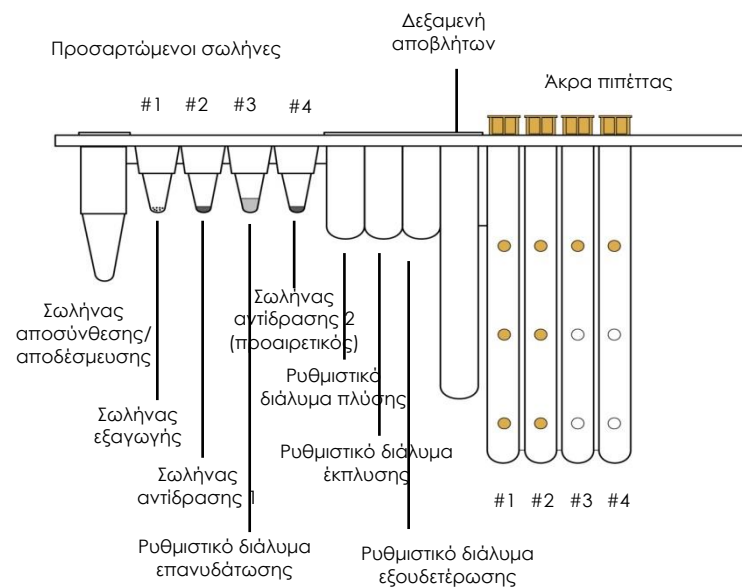
8.3.2. Ρύθμιση ραφιών BD MAX™

- 1) Για κάθε δείγμα προς έλεγχο, αφαιρέστε ένα Unitized Reagent Strip από το BD MAX™ ExK™ TNA-2 kit. Χτυπήστε απαλά κάθε λωρίδα σε μια σκληρή επιφάνεια για να βεβαιωθείτε ότι όλα τα υγρά βρίσκονται στο κάτω μέρος των σωλήνων και τοποθετήστε τις στα ράφια δειγμάτων του BD MAX™ System.
- 2) Αφαιρέστε τον απαιτούμενο αριθμό σωλήνων εξαγωγής BD MAX™ ExK™ TNA (B4) (λευκό αλουμινόχαρτο) από το προστατευτικό σακουλάκι. Προσαρτήστε τους σωλήνες εξαγωγής (λευκό αλουμινόχαρτο) στις αντίστοιχες θέσεις στη λωρίδα TNA (Θέση προσάρτησης 1, κωδικοποίηση λευκού χρώματος στο ράφι. Ανατρέξτε στην Εικόνα 1). Αφαιρέστε τον πλεονάζοντα αέρα και κλείστε το σακουλάκι με φερμουάρ σφράγισης.
- 3) Προσδιορίστε και διαχωρίστε τον κατάλληλο αριθμό από σωληνάρια αντίδρασης αντοχής στη βανοκυκίνη (αλουμινόχαρτο 1B) και προσαρτήστε τα στις αντίστοιχες θέσεις στη λωρίδα (Θέση προσάρτησης 2, κωδικοποίηση πράσινου χρώματος στο ράφι. Ανατρέξτε στην Εικόνα 1).
 - a. Αφαιρέστε τον πλεονάζοντα αέρα και κλείστε τα αλουμινένια σακουλάκια με το φερμουάρ σφράγισης.
 - b. Για τη διεξαγωγή της σωστής επανυδάτωσης, βεβαιωθείτε ότι το λυοφιλοποιημένο προϊόν βρίσκεται στο κάτω μέρος του σωλήνα και δεν είναι προσκολλημένο στην επάνω περιοχή του

σωλήνα ή στη σφράγιση του αλουμινόχαρτου. Χτυπήστε απαλά κάθε σωληνάριο σε μια σκληρή επιφάνεια για να βεβαιωθείτε ότι όλο το προϊόν βρίσκεται στον πυθμένα του σωληναρίου.

- i. Σημείωση: Αν επιλέξετε τη μορφή "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Συμπυκνωμένο λυοφιλοποιημένο MM διπλής κύριας ανάμειξης με ρυθμιστικό διάλυμα επανυδάτωσης (Τύπος 5)) (Ενότητα 8.3.1), προσδιορίστε και διαχωρίστε τον κατάλληλο αριθμό πρόσθετων σωλήνων VIASURE reaction tubes (διαφορετικό αλουμινόχαρτο) και προσαρτήστε στις αντίστοιχες θέσεις στη λωρίδα (Θέση προσάρτησης 4, κωδικοποίηση μπλε χρώματος στο ράφι. Ανατρέξτε στην Εικόνα 1). Αφαιρέστε τον πλεονάζοντα αέρα και κλείστε τα αλουμινένια σακουλάκια με το φερμουάρ σφράγισης.
- 4) Αφαιρέστε τον απαιτούμενο αριθμό σωλήνων Rehydration Buffer tubes (αλουμινόχαρτο 11) και προσαρτήστε στις αντίστοιχες θέσεις στη λωρίδα (Θέση προσάρτησης 3, κωδικοποίηση χωρίς χρώμα στο ράφι. Ανατρέξτε στην Εικόνα 1). Αφαιρέστε τον πλεονάζοντα αέρα και κλείστε το σακουλάκι με φερμουάρ σφράγισης.
- a. Για να εξασφαλιστεί η σωστή μεταφορά, βεβαιωθείτε ότι το υγρό βρίσκεται στο κάτω μέρος του σωλήνα και δεν είναι προσκολλημένο στην επάνω περιοχή του σωλήνα ή στη σφράγιση του αλουμινόχαρτου. Χτυπήστε απαλά κάθε σωληνάριο σε μια σκληρή επιφάνεια για να βεβαιωθείτε ότι όλο το ρυθμιστικό διάλυμα βρίσκεται στον πυθμένα του σωληναρίου.

Εικόνα 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) από το BD MAX™ ExK TNA-2 kit.



8.3.3. Ρύθμιση οργάνων BD MAX™

- 1) Επιλέξτε την καρτέλα "Work List" (Λίστα εργασίας) στην οθόνη "Run" (Εκτέλεση) στο λογισμικό BD MAX™ System έκδ. 4.50A ή μεταγενέστερης.
- 2) Στο αναπτυσσόμενο μενού "Test" (Τεστ), επιλέξτε VIASURE *Vancomycin resistance* (αν δεν έχει δημιουργηθεί ήδη, ανατρέξτε στην ενότητα 8.3.1).
- 3) Επιλέξτε τον κατάλληλο αριθμό παρτίδας kit (βρίσκεται στο εξωτερικό κουτί του kit εξαγωγής που χρησιμοποιείται) από το αναπτυσσόμενο μενού (προαιρετικά).

- 4) Εισαγάγετε τον αριθμό αναγνώρισης του Sample Buffer Tube στο παράθυρο "Sample Tube" (σωλήνων δείγματος) της "Work List" (Λίστα εργασίας), είτε με σάρωση του γραμμωτού κώδικα με τον σαρωτή με χειροκίνητη καταχώριση.
- 5) Συμπληρώστε το παράθυρο δείγματος/ταυτότητας ασθενούς ή/και ένταξης της "Work List" (Λίστα εργασίας) και κάντε κλικ στο κουμπί "Save" (Αποθήκευση). Συνεχίστε έως ότου καταχωριστούν όλα τα Sample Buffer Tubes. Βεβαιωθείτε ότι το δείγμα/η ταυτότητα ασθενούς και τα Sample Buffer Tube έχουν αντιστοιχιστεί με ακρίβεια.
- 6) Τοποθετήστε το προετοιμασμένο Sample Buffer Tube στο(α) BD MAX™ Rack(s).
- 7) Τοποθετήστε το(α) ράφι(α) στο BD MAX™ System (Το ράφι A τοποθετείται στην αριστερή πλευρά του BD MAX™ System και το ράφι B στη δεξιά πλευρά).
- 8) Τοποθετήστε τον απαιτούμενο αριθμό δοχείων BD MAX™ PCR Cartridges στο BD MAX™ System.
- 9) Κλείστε τη θύρα του BD MAX™ System.
- 10) Κάντε κλικ στην επιλογή "Start Run" (Έναρξη εκτέλεσης) για να ξεκινήσει η διαδικασία.

8.3.4. Έκθεση BD MAX™

- 1) Στο κύριο μενού, κάντε κλικ στο κουμπί "Results" (Αποτελέσματα).
- 2) Κάντε διπλό κλικ στην εκτέλεση στη λίστα ή πατήστε το κουμπί "View" (Προβολή).
- 3) Κάντε κλικ στην επιλογή "Print" (Εκτύπωση) και επιλέξτε: "Run Details, Test Details and Plot..." (Λεπτομέρειες εκτέλεσης, λεπτομέρειες τεστ και ακολουθία...)
- 4) Κάντε κλικ στο κουμπί "Print or Export" (Εκτύπωση ή Εξαγωγή) στην οθόνη "Run Reports" (Εκτέλεση εκθέσεων)

9. Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Για λεπτομερή περιγραφή του τρόπου ανάλυσης δεδομένων, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του BD MAX™ System.

Η ανάλυση των δεδομένων γίνεται από το λογισμικό BD MAX™ σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το λογισμικό BD MAX™ αναφέρει τιμές Ct και καμπύλες ενίσχυσης για κάθε κανάλι ανιχνευτή κάθε δείγματος που ελέγχεται με τον ακόλουθο τρόπο:

- Η τιμή Ct 0 υποδεικνύει ότι δεν υπολογίστηκε τιμή Ct από το λογισμικό με το καθορισμένο κατώφλιο (βλ. Πίνακα 3). Η καμπύλη ενίσχυσης του δείγματος που εμφανίζει την τιμή Ct "0" πρέπει να ελεγχθεί χειροκίνητα.

- Η τιμή Ct -1 υποδεικνύει ότι δεν έχει πραγματοποιηθεί διαδικασία ενίσχυσης.

- Οποιαδήποτε άλλη τιμή Ct πρέπει να ερμηνεύεται σε συσχετισμό με την καμπύλη ενίσχυσης και σύμφωνα με τις οδηγίες ερμηνείας δείγματος που περιγράφονται στον Πίνακα 6.

Ελέγξτε το σήμα εσωτερικού μάρτυρα για να επαληθεύσετε τη σωστή λειτουργία του μείγματος ενίσχυσης.

Επιπλέον, βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχει έκθεση της αποτυχίας του BD MAX™ System.

-Τα αποτελέσματα θα πρέπει να διαβάζονται και να αναλύονται χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο πίνακα:

Γονίδιο <i>vanA</i> (475/520)	Γονίδιο <i>vanB</i> (585/630)	Εσωτερικός μάρτυρας (530/565)	Ερμηνεία
+	+	+/- ¹	Ανιχνεύτηκε DNA γονιδίων <i>vanA</i> και <i>vanB</i> ¹
+	-	+/- ¹	Ανιχνεύτηκε DNA γονιδίου <i>vanA</i> , Δεν ανιχνεύτηκε DNA γονιδίου <i>vanB</i> ¹
-	+	+/- ¹	Ανιχνεύτηκε DNA γονιδίου <i>vanB</i> , Δεν ανιχνεύτηκε DNA γονιδίου <i>vanA</i> ¹
-	-	+ ²	Δεν ανιχνεύτηκε DNA γονιδίων <i>vanA</i> και <i>vanB</i> ²
-	-	- ²	Μη επιλυμένο (UNR) αποτέλεσμα που λαμβάνεται παρουσία αναστολέων στην αντίδραση PCR ή όταν προκύψει γενικό πρόβλημα (το οποίο δεν αναφέρεται από κωδικό σφάλματος) με τα βήματα επεξεργασίας ή/και ενίσχυσης δείγματος. ²
IND	IND	IND	Άσαφές αποτέλεσμα ανάλυσης (IND). Λόγω αποτυχίας του BD MAX™ System. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης εμφανίζεται σε περίπτωση αποτυχίας οργάνου που συνδέεται με κωδικό σφάλματος.
INC	INC	INC	Ατελές αποτέλεσμα ανάλυσης (INC). Λόγω αποτυχίας του BD MAX™ System. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης εμφανίζεται σε περίπτωση αποτυχίας πλήρους εκτέλεσης.

Πίνακας 15. Ερμηνεία δείγματος.

+: Προέκυψε ενίσχυση

-: Δεν προέκυψε ενίσχυση

1 Ένα δείγμα θεωρείται θετικό εάν η τιμή Ct που λαμβάνεται είναι μικρότερη από 40. Ο εσωτερικός μάρτυρας (IC) μπορεί να εμφανίζει ή όχι ένα σήμα ενίσχυσης. Ορισμένες φορές, η ανίχνευση IC δεν είναι απαραίτητη, επειδή ένας μεγάλος αριθμός αντιγράφων στόχου μπορεί να προκαλέσει προτιμησιακή ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων συγκεκριμένου στόχου.

2 Ένα δείγμα θεωρείται αρνητικό, εάν το δείγμα δεν εμφανίζει σήμα ενίσχυσης στο σύστημα ανίχνευσης, αλλά ο εσωτερικός μάρτυρας είναι θετικός (Ct μικρότερο από 40). Μια αναστολή της αντίδρασης PCR μπορεί να αποκλειστεί με την ενίσχυση του εσωτερικού μάρτυρα. Σε περίπτωση μη επιλυμένων αποτελεσμάτων (UNR), απουσία σήματος εσωτερικού μάρτυρα σε αρνητικό δείγμα, συνιστάται να επαναλάβετε την ανάλυση ακολουθώντας τις παρακάτω οδηγίες.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΑΝΑΛΗΠΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Σε περίπτωση συνεχών αμφίσημων αποτελεσμάτων, συνιστάται να ελέγξετε τις οδηγίες χρήσης και τη διαδικασία εξαγωγής που χρησιμοποιεί ο χρήστης, για να επιβεβαιώσετε την ορθή εκτέλεση κάθε βήματος qPCR και των αντίστοιχων παραμέτρων, καθώς και να ελέγξετε το σιγμοειδές σχήμα της καμπύλης και την ένταση του φθορισμού.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Υπάρχει διαθέσιμος αρκετός όγκος για μία επαναληπτική ανάλυση από το Sample Buffer Tube. Για προετοιμασμένους σωλήνες BD MAX™ Sample Buffer Tubes που φυλάσσονται στους 2–8 °C ή 25°C, η επαναληπτική ανάλυση πρέπει να πραγματοποιείται εντός 24 ωρών.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Μπορούν να αναλυθούν και νέα δείγματα μαζί με τα επαναληπτικά δείγματα.

Τα αποτελέσματα του τεστ θα πρέπει να αξιολογούνται από έναν επαγγελματία υγείας στο πλαίσιο του ιατρικού ιστορικού, των κλινικών συμπτωμάτων και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων.

10. Περιορισμοί του τεστ

- Τα αποτελέσματα του τεστ θα πρέπει να αξιολογούνται από έναν επαγγελματία υγείας στο πλαίσιο του ιατρικού ιστορικού, των κλινικών συμπτωμάτων και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων.
- Αν και αυτή η ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί με άλλους τύπους δειγμάτων, έχει επικυρωθεί με περιπρωκτικά ή/και ορθικά επιχρίσματα που συλλέγονται χρησιμοποιώντας το μέσο μεταφοράς ESwab™, και εναιωρήματα αποικιών.
- Για την ορθή εκτέλεση του τεστ, το λυοφιλοποιημένο προϊόν πρέπει να βρίσκεται στο κάτω μέρος του σωλήνα και να μην είναι προσκολλημένο στην επάνω περιοχή του σωλήνα ή στη σφράγιση του αλουμινόχαρτου. Χτυπήστε απαλά κάθε σωληνάριο σε μια σκληρή επιφάνεια για να βεβαιωθείτε ότι όλο το προϊόν βρίσκεται στον πυθμένα του σωληναρίου.
- Η εμφάνιση του μίγματος της αντίδρασης σε σταθεροποιημένη μορφή, συνήθως στον πυθμένα του σωληναρίου, η οποία διαφέρει από τη συνήθη (χωρίς κωνικό σχήμα, ανομοιογενής, μικρότερο/μεγαλύτερο μέγεθος ή/και χρώμα που διαφέρει από το λευκωπό), δεν τροποποιεί τη λειτουργικότητα του τεστ.
- Η ποιότητα του τεστ εξαρτάται από την ποιότητα του δείγματος. Πρέπει να υπάρχει νουκλεϊκό οξύ που έχει εξαχθεί σωστά από περιπρωκτικά ή/και ορθικά επιχρίσματα και αποικίες.
- Το τεστ αυτό είναι ποιοτικό, δηλαδή δεν παρέχει ποσοτικές τιμές και δεν υποδεικνύει τον αριθμό των υπαρχόντων μικροοργανισμών.
- Ενδέχεται να εντοπιστούν εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα στόχου, κάτω από το όριο ανίχνευσης, αλλά τα αποτελέσματα ενδέχεται να μην είναι δυνατόν να αναπαραχθούν.
- Υπάρχει πιθανότητα για ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω διασταυρούμενης μόλυνσης από ύποπτα δείγματα αντοχής στη βανκομυκίνη που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις DNA-στόχου ή μόλυνσης εξαπίας προϊόντων PCR από προηγούμενες αντιδράσεις.
- Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν από διάφορους παράγοντες και τους συνδυασμούς τους, όπως:
 - Ακατάλληλες μέθοδοι συλλογής, μεταφοράς, αποθήκευσης ή/και χειρισμού των δειγμάτων.
 - Ακατάλληλες διαδικασίες επεξεργασίας (συμπεριλαμβανομένης της εξαγωγής DNA).
 - Υποβάθμιση του DNA κατά την αποστολή, την αποθήκευση ή/και την επεξεργασία του δείγματος.
 - Μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί στις περιοχές δέσμευσης εκκινητών ή ανιχνευτών που μπορεί να επηρεάσουν την ανίχνευση νέων ή άγνωστων παραλλαγών των γονιδίων *vanA* ή/και *vanB*.
 - Φορτίο ανθεκτικών στη βανκομυκίνη οργανισμών στο δείγμα, κάτω από το όριο ανίχνευσης για την ανάλυση.
 - Παρουσία αναστολέων qPCR ή άλλων τύπων ουσιών που δημιουργούν παρεμβολές.
 - Μη τήρηση των οδηγιών χρήσης και της διαδικασίας ανάλυσης.
- Ένα αρνητικό σήμα IC δεν αποκλείει την παρουσία DNA του γονιδίου *vanA* ή/και *vanB* σε ένα κλινικό δείγμα.
- Ένα θετικό αποτέλεσμα δεν υποδεικνύει κατ' ανάγκη την παρουσία βιώσιμων ανθεκτικών στη βανκομυκίνη μικροοργανισμών ή ότι οι εν λόγω μικροοργανισμοί είναι μολυσματικοί ή αποτελούν τους αιτιολογικούς παράγοντες για τα κλινικά συμπτώματα. Ωστόσο, ένα θετικό αποτέλεσμα υποδεικνύει την παρουσία αλληλουχιών-στόχων αντοχής στη βανκομυκίνη.
- Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη μόλυνση από ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη οργανισμούς και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως η μοναδική βάση για τη θεραπεία ή για άλλες αποφάσεις διαχείρισης ασθενών.

- Σε περίπτωση εμφάνισης Μη επιλυμένων, Ασαφών ή Ατελών αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας το VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, θα χρειαστεί επανάληψη του τεστ. Μη επιλυμένα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στην παρουσία αναστολέων στο δείγμα ή σε λανθασμένη επανυδάτωση λυοφιλοποιημένου σωλήνα μείγματος αντίδρασης. Εάν υπάρχει βλάβη οργάνου, θα προκύψουν Ασαφή ή Ατελή αποτελέσματα.

11. Ποιοτικός έλεγχος

Το VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit περιέχει εσωτερικό μάρτυρα (IC) σε κάθε σωλήνα αντίδρασης, ο οποίος επιβεβαιώνει τη σωστή εκτέλεση της τεχνικής.

12. Χαρακτηριστικά απόδοσης

12.1. Κλινική ευαισθησία και ειδικότητα

Η κλινική επίδοση του VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit έχει δοκιμαστεί χρησιμοποιώντας κλινικά δείγματα (ορθικά επίχρισματα) από ασθενείς με υποψία λοίμωξης VRE. Τα αποτελέσματα είχαν ως εξής:

	Κέντρο	Τύπος δείγματος	Ροή εργασιών	Στόχος
1	Clinical Microbiology, Centre for Infectious Diseases and Microbiology Laboratory services, NSW Health Pathology, Westmead Hospital (Σίδνεϋ, Αυστραλία)	Ορθικό επίχρισμα	BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System	Γονίδιο <i>VanA</i>
				Γονίδιο <i>VanB</i>
				Γονίδια <i>VanA</i> + <i>VanB</i>

Πίνακας 16. Κέντρο, τύπος δείγματος, ροή εργασιών και στόχος.

Οι αληθώς θετικές και αρνητικές τιμές, οι ψευδώς θετικές και αρνητικές τιμές, η ευαισθησία και η ειδικότητα του VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit υπολογίστηκαν σε σχέση με κάθε συγκριτική ανάλυση, όπως παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα:

Κέντρο	Συγκριτική ανάλυση	Στόχος	TP	TN	FP	FN	Ευαισθησία	Ειδικότητα
1	In-house PCR VRE (Westmead – WMD)	<i>VanA</i>	65	151	0	0	100% (93%-100%)	100% (96%-100%)
		<i>VanB</i>	36	179	1	0	100% (87% - 100%)	99% (96%-100%)
		<i>VanA+VanB</i>	17	199	0	0	100% (97% - 100%)	100%(97% -100%)

Πίνακας 17. Αληθώς θετικές (TP) και αρνητικές (TN) τιμές, ψευδώς θετικές (FP) και αρνητικές (FN) τιμές, ευαισθησία και ειδικότητα του VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό συμφωνίας για την ανίχνευση των γονιδίων *vanA* και *vanB* με χρήση του VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Υπολογίστηκε επιπλέον το ποσοστό αποτυχίας ελέγχου επεξεργασίας δειγμάτων. Ο αρχικός αριθμός μη επιλυμένων αντιδράσεων (UNR) ήταν 3 (Αρχικό ποσοστό UNR: 1,39%). Ο αριθμός των UNR μετά την επανάληψη ήταν 0 (Τελικό ποσοστό UNR: 0,00%).

Για την αξιολόγηση της συμβατότητας του προσαρμοσμένου για το BD MAX™ VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit με άλλα διαφορετικά δείγματα μήτρας, εκτελέστηκε ένας έλεγχος επαλήθευσης της ανίχνευσης ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εναιωρημάτων αποικιών εντερόκοκκου.

Προετοιμάστηκαν διαφορετικά εναιωρήματα αποικιών, μέσω προσθήκης δύο αποικιών μιας καθορισμένης (determinate) καλλιέργειας σε 500 μl νερού χωρίς νουκλεάσες. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη αξιολόγηση ήταν τα CECT 5253 *Enterococcus faecium vanA*, CECT 8120 *Enterococcus faecalis vanB*, NCTC 12201 *Enterococcus faecalis vanA* και NCTC 13632 *Enterococcus faecalis vanA*. Ένας όγκος 10 μl από κάθε εναιώρημα αποικίας προστέθηκε απευθείας στο σωληνάριο ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος. Το διάγραμμα ροής που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση αυτής της αξιολόγησης ήταν: BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System.

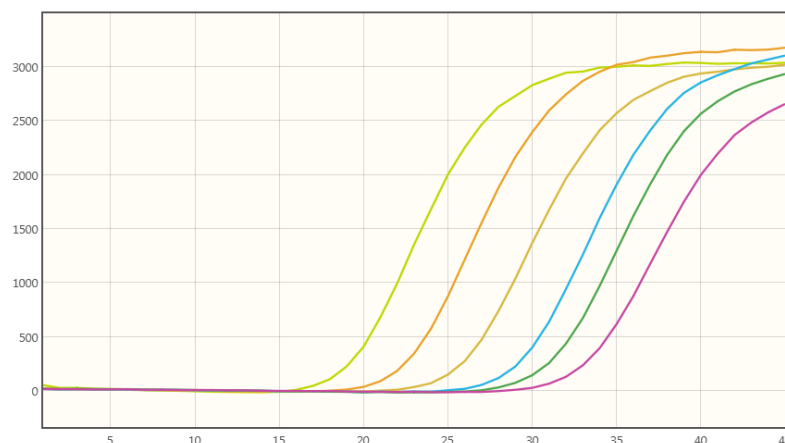
Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, έδειξαν ότι τα εναιωρήματα αποικιών των CECT 5253, NCTC 12220 και NCTC 13632 ήταν θετικά στο γονίδιο *vanA* και το εναιώρημα αποικίας του CECT 8120 ήταν θετικό στο γονίδιο *vanB*.

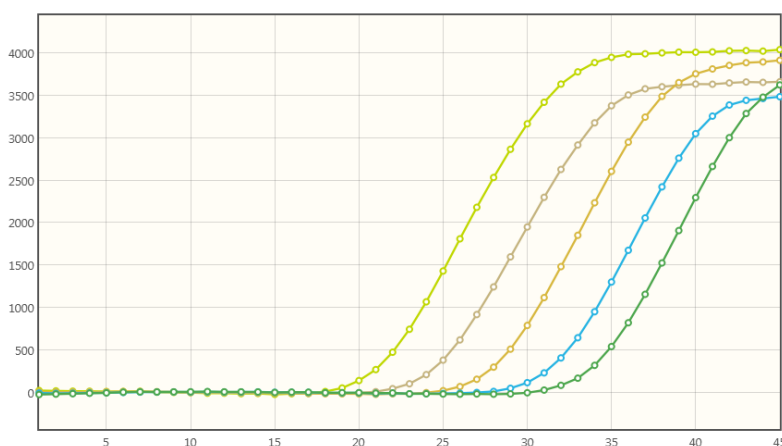
Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit μπορεί να ανιχνεύσει σωστά τα γονίδια *vanA* και *vanB* σε εναιωρήματα αποικιών.

12.2. Ευαισθησία ανάλυσης

Το VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit έχει όριο ανίχνευσης ≥ 4 μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά αντίδραση (CFU/rxn) για το *vanA* και ≥ 10 μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά αντίδραση (CFU/rxn) για το *vanB* (Εικόνες 2 και 3), με θετικό ποσοστό $\geq 95\%$ σε περιπρωκτικά και ορθικά επιχρίσματα.

Εικόνα 2. Σειρά αραιώσεως της εκτέλεσης προτύπου γονιδίου *vanA* ($3,62 \cdot 10^4$ - $3,62$ CFU/rxn) στο BD MAX™ System (κανάλι 475/520 (FAM)).



Εικόνα 3. Σειρά αραιώσης της εκτέλεσης προτύπου γονιδίου *vanB* ($5,65 \cdot 10^4$ -9,98 CFU/γκπ) στο BD MAX™ System (κανάλι 585/630 (ROX)).

12.3. Αναλυτική ειδικότητα

Η ειδικότητα της ανάλυσης αντοχής στη βανκομυκίνη επιβεβαιώθηκε εξετάζοντας ένα πάνελ αποτελούμενο από διαφορετικούς, ανθεκτικούς σε αντιμικροβιακά οργανισμούς και διαφορετικούς μικροοργανισμούς που αντιπροσωπεύουν τα πιο κοινά εντερικά παθογόνα ή τη χλωρίδα που υπάρχει στο έντερο. Δεν ανιχνεύθηκε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των ακόλουθων μικροοργανισμών που εξετάστηκαν, με εξαίρεση τα παθογόνα-στόχους κάθε ανάλυσης:

Έλεγχος διασταυρούμενης αντιδραστικότητας					
Ορότυποι αδενοϊού 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	Απομονωμένο στέλεχος <i>Klebsiella pneumoniae</i> που παράγει TEM-1 (μη ESBL), SHV-1 (μη ESBL), CTX-M-2 (ESBL) και KPC-2	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> τύπου VanC	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> υποείδος <i>hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> τύπου VanC2	-	Νορϊός GI και GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Αστροϊός γονοτύπου I-VIII	-	<i>Enterococcus faecalis</i> τύπου VanA	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacterioides fragilis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> τύπου VanB	- / +	Ροταϊός A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> τύπου VanA	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> τύπου VanB	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> τύπου VanB και VanC	- / +	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i> υποείδος <i>jejuni</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> τύπου VanC	-	<i>Salmonella paratyphi B</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> τύπου VanC1	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Εντεροαιμορραγική <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Απομονωμένο στέλεχος <i>Citrobacter braakii</i> που παράγει VIM-1	-	Εντεροισβολική <i>Escherichia coli</i>	-	Σαπιός	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Εντεροπαθογόνος <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Απομονωμένο στέλεχος συμπλέγματος <i>Citrobacter freundii</i> που παράγει KPC-3 και VIM-4	-	Εντεροτοξιγόνος <i>Escherichia coli</i>	-	Απομονωμένο στέλεχος <i>Serratia marcescens</i> που παράγει OXA-48	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	Απομονωμένο στέλεχος <i>Escherichia coli</i> που παράγει OXA-244	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-

<i>Clostridium difficile</i> 027	-	Απομονωμένο στέλεχος <i>Escherichia coli</i> που παράγει TEM-1 (μη ESBL) και IMP-1	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> υποείδος <i>aureus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	Ανθεκτικός στη μεθικιλίνη <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>mecC</i>)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Ανθεκτικό στη μεθικιλίνη στέλεχος <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	Ανθεκτικό στη μεθικιλίνη <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Ανθεκτικό στη μεθικιλίνη στέλεχος <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) (<i>oxa^R</i> , PVL-θετικό, <i>sra</i> type t310)	-
Απομονωμένο στέλεχος <i>Enterobacter cloacae</i> που παράγει SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) και OXA-48	-	Ανθεκτικό στην κλαριθρομυκίνη <i>Helicobacter pylori</i> (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
Απομονωμένο στέλεχος <i>Enterobacter cloacae</i> που παράγει TEM-1 (μη ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) και NDM-1	-	Ανθεκτικό στην κλαριθρομυκίνη <i>Helicobacter pylori</i> (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Απομονωμένο στέλεχος συμπλέγματος <i>Enterobacter cloacae</i> που παράγει NDM-7	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Enterococcus avium</i> τύπου <i>VanA</i>	+ / -	Απομονωμένο στέλεχος <i>Klebsiella pneumoniae</i> που παράγει SHV-1 (μη ESBL), KPC-3 και OXA-48	-		

Πίνακας 18. Παθογόνοι μικροοργανισμοί αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη.

12.4. Αναλυτική αντιδραστικότητα











Η αντιδραστικότητα του VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit ως προς το γονίδιο *vanA* αξιολογήθηκε σε DNA που εξήχθη από στελέχη *Enterococcus avium* τύπου *vanA*, *Enterococcus faecalis* τύπου *vanA* (NCTC 13632, NCTC 12201) και *Enterococcus faecium* τύπου *vanA* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202), παρουσιάζοντας θετικά αποτελέσματα.

Η αντιδραστικότητα του VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit ως προς το γονίδιο *vanB* αξιολογήθηκε σε DNA που εξήχθη από στελέχη *Enterococcus faecalis* τύπου *vanB* (ATCC 51299, CECT 8120), *Enterococcus faecium* τύπου *vanB* (IOWA 2) και *Enterococcus gallinarum* τύπου *vanB* και *vanC* (ENT20120142), παρουσιάζοντας θετικά αποτελέσματα.

Bibliography/ Βιβλιογραφία

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/ Σύμβολα για στοιχεία και αντιδραστήρια IVD

 IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device Διαγνωστική συσκευή <i>In vitro</i>	 Keep dry Διατηρήστε στεγνό	 Use by Ανάλωση έως	 Manufacturer Κατασκευαστής	 LOT Batch code Κωδικός παρτίδας
 i	Consult instructions for use Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	 Temperature limitation Περιορισμός θερμοκρασίας	 Contains sufficient for <n> test Περιεχόμενο επαρκές για <n> τεστ	 UDI Unique Device Identification Μοναδικό αναγνωριστικό ιατροτεχνολογικού προϊόντος	 REF Catalogue number Αριθμός καταλόγου

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 / Αλλαγή μάρτυρα		
Version No. / Αρ. έκδοσης	Changes / Αλλαγές	Date / Ημερομηνία
00	Unification of all instructions for use associated with the different catalogue references in a single format / Ενοποίηση όλων των οδηγιών χρήσης που σχετίζονται με διαφορετικούς κωδικούς αναφοράς καταλόγου σε μία ενιαία μορφή.	21/06/2021

Table A 2. Control change table / Πίνακας αλλαγής μάρτυρα.

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

