

**VIASURE**

Real Time PCR Detection Kit



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

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / *Queste istruzioni per l'uso si applicano al seguente riferimento:*

| PRODUCT / PRODOTTO  | REFERENCE / RIFERIMENTO |
|---|-------------------------|
| 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. / *Riferimento per il prodotto da utilizzare con il sistema BD MAX™.*

## 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 |

## Contenuto

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1.   | Usò previsto.....                                      | 19 |
| 2.   | Introduzione e spiegazione .....                       | 19 |
| 3.   | Principi del procedimento.....                         | 20 |
| 4.   | Reagenti forniti .....                                 | 20 |
| 5.   | Reagenti e strumenti necessari e non inclusi .....     | 21 |
| 6.   | Condizioni di trasporto e conservazione .....          | 21 |
| 7.   | Precauzioni per gli utenti .....                       | 21 |
| 8.   | Procedura del test.....                                | 22 |
| 8.1. | Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni.....  | 22 |
| 8.2. | Preparazione del campione ed estrazione dell'DNA ..... | 23 |
| 8.3. | Protocollo PCR.....                                    | 23 |

---

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 9.    | Interpretazione dei risultati de resultados .....                                    | 27 |
| 10.   | Limiti del test .....  | 28 |
| 11.   | Controllo di qualità .....   | 29 |
| 12.   | Caratteristiche del test .....   | 30 |
| 12.1. | Sensibilità e specificità clinica .....  | 30 |
| 12.2. | Sensibilità analitica.....   | 31 |
| 12.3. | Specificità analitica .....  | 32 |
| 12.4. | Reattività analitica .....   | 33 |
|       | Bibliography/Bibliografia .....  | 34 |
|       | Symbols for IVD components and reagents/ Simboli per reagenti e componenti 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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.

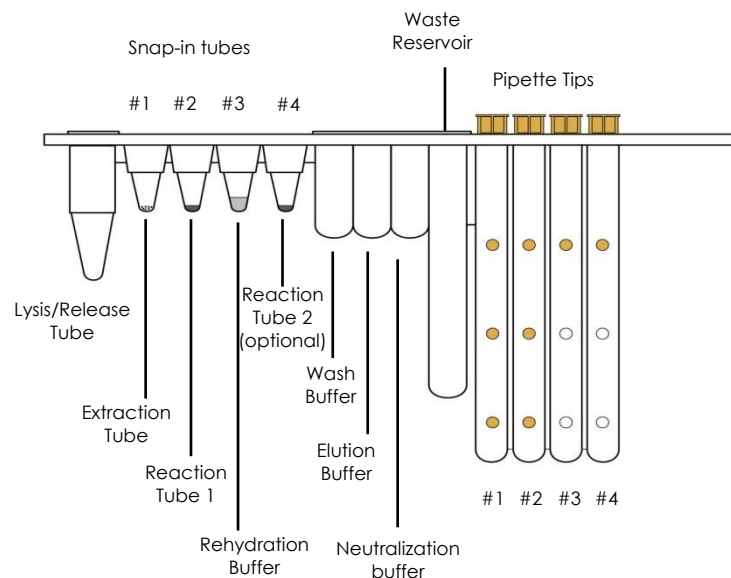
- 12) Click the "Save Test" button.

### 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<br/>(475/520)</b> | <b>vanB gene<br/>(585/630)</b> | <b>Internal control<br/>(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).

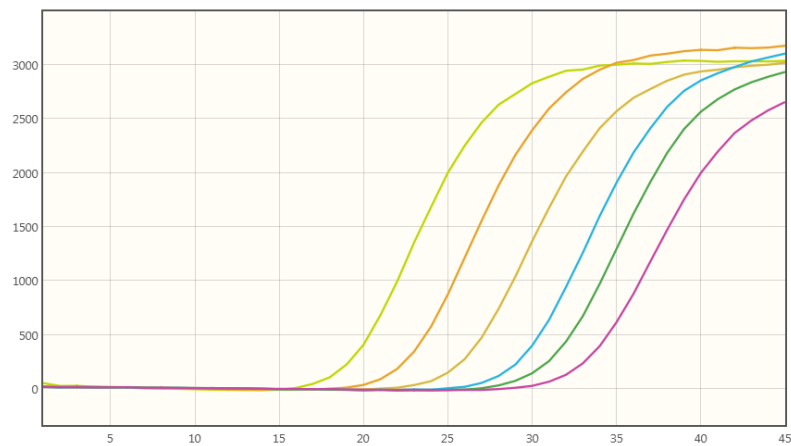
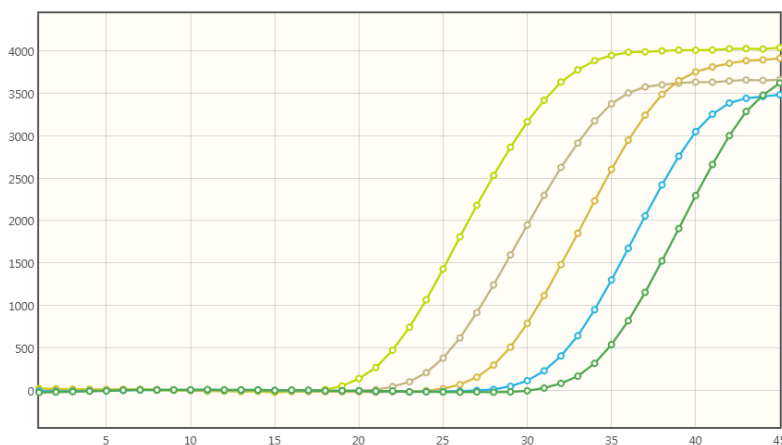


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene ( $5.65 \times 10^4$ - $9.98$  CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



## 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.

## ITALIANO

---

### 1. Uso previsto

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit è realizzato per il rilevamento e la differenziazione specifica dei geni *vanA* e *vanB* associati agli enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) direttamente su colonie e tamponi perianali e/o rettali. L'uso previsto di questo test è quello di facilitare l'identificazione degli organismi vancomicina-resistenti in combinazione con i segni clinici e i sintomi del paziente e i fattori di rischio epidemiologico. Questo test utilizza il sistema BD MAX™ per l'estrazione automatica del DNA e successivamente del PCR in tempo reale, utilizzando i reagenti forniti insieme ai reagenti universali e monouso del sistema BD MAX™. Il DNA viene estratto dalle colonie e dai tamponi perianali e/o rettali utilizzando sonde marcate da un colorante fluorescente specifico per i geni *vanA* e *vanB*.

### 2. Introduzione e spiegazione

Gli enterococchi sono organismi commensali comuni che si trovano nel tratto gastrointestinale e nei genitali femminili. Recentemente sono stati riconosciuti come agenti patogeni opportunisti che causano infezioni nosocomiali come infezioni del tratto urinario, infezioni della pelle, infezioni respiratorie, endocarditi e sepsi in soggetti immunocompromessi.

La vancomicina è un antibiotico glicopeptidico che inibisce la sintesi della parete cellulare e viene utilizzato per trattare le infezioni gravi da batteri Gram-positivi. Gli enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) sono stati descritti per la prima volta in Inghilterra e in Francia nel 1986 e sono oggi diffusi negli ospedali di tutto il mondo.

La resistenza alla vancomicina è un processo complesso e richiede la presenza di diversi cluster di geni. Principalmente possono essere suddivisi in due tipologie, sulla base dei precursori pentapeptidi prodotti dai geni resistenti alla vancomicina: il precursore che termina in D-Alanina-D-Serina (tipo VanC, VanE, VanG, VanL e VanN) e quello che termina in D-Alanina-D-Lattato (tipo VanA, VanB, VanD e VanM). Questi precursori pentapeptidi hanno mostrato una bassa affinità per i glucopeptidi, conferendo così la resistenza alla vancomicina negli enterococchi.

Il primo tipo di resistenza alla vancomicina negli enterococchi è una resistenza di tipo intrinseco (associata cioè al gene *vanC*). Isolati di *Enterococchi gallinarum* e di *E. casseliflavus*/*E. flavescens* hanno mostrato una resistenza intrinseca di basso livello alla vancomicina. Il secondo tipo è una resistenza di tipo acquisito (associata cioè ai geni *vanA* o *vanB*). In questo tipo gli enterococchi possono diventare resistenti tramite l'acquisizione di elementi genetici mobili (trasposoni e plasmidi) provenienti da un'altra specie di *Enterococchi* o da un altro organismo. Più comunemente, questa resistenza viene osservata negli *E. faecium* ed *E. faecalis*, ma è stata riconosciuta anche in *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* e altre specie di enterococchi. I geni *vanA* e *vanB* sono responsabili di una resistenza alla vancomicina alta o moderata.

La trasmissione degli enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) può verificarsi attraverso un contatto diretto con i fluidi corporei da pazienti colonizzati o infetti (sangue, drenaggio delle ferite, urina, feci, saliva e altro) oppure attraverso un contatto indiretto attraverso le mani degli operatori sanitari o le superfici e gli strumenti dei pazienti contaminati.

Inizialmente, il metodo di rilevamento applicato si basava sulle tecniche di coltura, una tecnica molto lunga che richiedeva da uno a cinque giorni per essere completata. I campioni di PCR in tempo reale si sono dimostrati essere uno strumento migliore per il rilevamento di geni clinicamente rilevanti associati alla resistenza alla vancomicina.

### 3. Principi del procedimento

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit è realizzato per identificare e differenziare il DNA dagli enterococchi vancomicina-resistenti e dagli altri organismi portatori dei geni *vanA* e *vanB* resistenti alla vancomicina. Dopo l'isolamento del DNA, si esegue l'identificazione della resistenza alla vancomicina attraverso l'amplificazione di una regione conservata dei geni *vanA* e *vanB*, utilizzando primer specifici e una sonda marcata a fluorescenza.

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit si basa sull'attività esonucleasica 5' della DNA polimerasi. Durante l'amplificazione del DNA, questo enzima idrolizza la sonda legata alla sequenza complementare di DNA, separando il quencher dal marcatore. Questa reazione genera un aumento del segnale fluorescente proporzionale alla quantità del DNA bersaglio. Questa fluorescenza può essere misurata sul sistema BD MAX™.

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene in ciascuna provetta tutti i componenti necessari per un campione di PCR in tempo reale (primer/sonde specifici, dNTPS, tampone, polimerasi) in formato stabilizzato e un controllo interno per monitorare il processo di estrazione/di inibizione dell'attività della polimerasi.

| Obiettivo                        | Canale  | Gene        |
|----------------------------------|---------|-------------|
| Geni resistenti alla vancomicina | 475/520 | <i>vanA</i> |
| Geni resistenti alla vancomicina | 585/630 | <i>vanB</i> |
| Controllo interno (CI)           | 530/565 | -           |

Tabella 1. Obiettivo, canale e geni.

### 4. Reagenti forniti

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit include i materiali e i reagenti indicati nella Tabella 2:

| Reagente/Materiale                         | Descrizione   | Codice a barre | Quantità                                |
|--|---|----------------|---|
| <i>Vancomycin resistance</i> reaction tube | Una miscela di enzimi, sonde primer, tampone, dNTP, stabilizzatori e controllo interno in un formato stabilizzato | Sigilo 1B      | 2 confezioni da 12 provette trasparente |
| Rehydration Buffer tube                    | Soluzione per ricostituire il prodotto stabilizzato   | Sigilo 11      | 1 confezione da 24 provette trasparente |

Tabella 2. Reagenti e materiali forniti con VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit con N. di cat. VS-VAN124 (444202).

## 5. Reagenti e strumenti necessari e non inclusi

Il seguente elenco include i materiali e gli strumenti richiesti per l'uso e che non sono inclusi nel VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Strumenti per la PCR in tempo reale: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref:442825 o 442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipette (tra i 2 e i 1000 µL).
- Acqua esente da nucleasi.
- Punte con filtro.
- Guanti monouso privi di talco.

## 6. Condizioni di trasporto e conservazione

- I kit possono essere spediti e conservati a 2-40 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Dopo la loro apertura, le confezioni che contengono le provette di reazione possono essere utilizzate fino a un massimo di 28 giorni.

## 7. Precauzioni per gli utenti

- Il prodotto è destinato all'uso esclusivamente da parte di utilizzatori professionali, come professionisti e tecnici di laboratorio o sanitari, formati nell'impiego di tecniche di biologia molecolare.
- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Non utilizzare reagenti e/o materiali scaduti.
- Non utilizzare il kit se l'etichetta che sigilla la scatola esterna è rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la scatola protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la confezione protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'interno della loro confezione il materiale essiccante non è presente o è rotto.
- Non rimuovere il materiale essiccante dalla confezione dei reagenti.
- Chiudere la confezione protettiva dei reagenti con la cerniera subito dopo ogni utilizzo. Rimuovere l'aria in eccesso dalle confezioni prima di sigillarle.
- Non utilizzare reagenti se il sigillo metallico è rotto o danneggiato.
- Non mescolare reagenti di diverse confezioni e/o kit e/o lotti.
- Proteggere i reagenti dall'umidità. L'esposizione prolungata all'umidità può influire sulle prestazioni del prodotto.
- Tenere i componenti lontano dalla luce.
- Nel caso in cui vengano eseguiti altri test di PCR nella stessa area del laboratorio, assicurarsi che il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, BD MAX™ ExK™ TNA-2 kit, i reagenti aggiuntivi richiesti per il test e il sistema BD MAX™ non siano contaminati. Evitare in ogni momento la contaminazione dei reagenti con microrganismi e ribonucleasi (RNAsi)/desossiribonucleasi (DNAsi). Si consiglia l'uso di puntali per pipette di trasferimento positivi o resistenti agli aerosol e privi di RNAsi/DNAsi. Usare un nuovo puntale per

ogni campione. È necessario cambiarsi i guanti prima di manipolare reagenti e cartucce (BD MAX™ PCR Cartridge).

- Per evitare la contaminazione dell'ambiente da parte di amplicon, non disassemblare la cartuccia BD MAX™ PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) dopo l'uso. I sigilli della cartuccia BD MAX™ PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) sono progettati per prevenire la contaminazione.
- Disegnare un flusso unidirezionale. Deve iniziare nell'area di estrazione e poi spostarsi nell'area di amplificazione e rilevamento. Non riportare campioni, strumenti e reagenti nell'area in cui è stato eseguito il passaggio precedente.
- Rispettare le buone pratiche di laboratorio. Indossare abiti protettivi e utilizzare guanti monouso, occhialini e mascherina. Non mangiare, bere, fumare o applicare prodotti cosmetici all'interno dell'area di lavoro. Lavarsi le mani al termine del test.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi e / o a rischio biologico, così come i reagenti e i materiali che sono stati esposti ai campioni e devono essere gestiti nel rispetto delle normative di sicurezza nazionali. Prendere le precauzioni necessarie durante la raccolta, il trasporto, la conservazione, il trattamento e lo smaltimento dei campioni.
- I campioni e i reagenti devono essere manipolati in una cappa di biosicurezza. Usare personal protective equipment (PPE) compatibili con le linee guida correnti per la manipolazione dei campioni potenzialmente infettivi. Smaltire i rifiuti in conformità ai regolamenti locali e nazionali.
- Si raccomanda una decontaminazione degli strumenti utilizzati abitualmente, soprattutto le micropipette e le superfici di lavoro.
- "In conformità con il regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH), "VIASURE Real Time PCR Detection Kits" non richiedono una scheda dati sulla sicurezza (Safety Data Sheets) dei materiali a causa della loro classificazione come non pericoloso per la salute e per l'ambiente, perché non contengono sostanze e/o miscele che soddisfano i criteri di classificazione dei rischi riportati nel Regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP) o presenti a concentrazioni superiori al valore definito nel regolamento sopra menzionato in base alla relativa dichiarazione".
- Consultare il manuale utente del sistema BD MAX™ per maggiori informazioni su avvertenze, precauzioni e procedure.

## 8. Procedura del test

### 8.1. Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit è stato convalidato su tamponi perianali e/o rettali poste immediatamente nel mezzo di trasporto ESwab™ (sistema di trasporto e raccolta a base di liquido tipo Amies) (Copan, Italia). Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit è stato convalidato anche su sospensione di colonie. Altre tipologie di campioni devono essere convalidati dall'utente.

La raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni devono rispettare le condizioni convalidate dall'utente. In generale, i tamponi perianali e/o rettali devono essere raccolti ed etichettati adeguatamente in un mezzo di trasporto ESwab™ pulito ed esaminato il prima possibile per garantire la qualità del test. I campioni devono essere trasportati tra i 2 e gli 8 °C entro le prime 24 ore, nel rispetto delle normative locali e nazionali per il trasporto di materiale patogeno. Per i trasporti di lunga durata (oltre 24 ore), raccomandiamo una spedizione a ≤-20 °C o inferiore. È consigliato utilizzare campioni appena raccolti per il test. I campioni possono essere

conservati a 25 °C fino a 24 ore, da 2 a 8 °C fino a 144 ore (6 giorni), congelati a -20 °C fino a 192 ore (8 giorni) o idealmente a -70 °C. Devono essere evitati cicli ripetuti di congelamento-scongelo per prevenire il deterioramento dei campioni e degli acidi nucleici.

I campioni fecali devono essere prelevati, trasportati e conservati in conformità alle linee guida di laboratorio appropriate. Per i dettagli, consultare le CDC guideline (Specimen collection guidelines. Sito web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) e linee guida 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. Preparazione del campione ed estrazione dell'DNA

Preparare il campione nel rispetto delle raccomandazioni presenti nelle istruzioni d'uso del kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-2. Si prega di notare che altri tipi di campioni possono richiedere un pretrattamento. Le procedure di preparazione dell'estrazione per applicazioni specifiche devono essere sviluppate e convalidate dall'utente.

1. Copan ESwab™: Pipettare 200 µL di campione ESwab™ in una BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube (una provetta di tampone campione) e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Assicurarsi una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con il BD MAX™ System Operation.
2. Colonie: Raccogliere due colonie dal mezzo di coltura e sospenderle in 500 µL di acqua esente da nucleasi. Assicurarsi una miscelazione completa utilizzando il vortex. Aggiungere 10 µL di sospensione in una BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube (una provetta di tampone campione) e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Assicurarsi una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con il BD MAX™ System Operation.

## 8.3. Protocollo PCR

Nota: Consultare il manuale utente del sistema BD MAX™ per istruzioni dettagliate.

### 8.3.1. Creazione di un programma di test VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

Nota: Se è stato già creato il test per VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, è possibile saltare il passaggio 8.3.1 e passare direttamente all'8.3.2.

- 1) Sulla schermata "Run" (Esegui) del BD MAX™ System, selezionare la scheda "Test Editor" (Modifica test).
- 2) Cliccare sul pulsante "Create" (Crea).
- 3) Nella scheda "Basic Information" (Informazioni di base), nella finestra "Test Name" (Nome test), nominare il proprio test: VIASURE Vancomycin resistance.
- 4) Nel menu a tendina "Extraction Type" (Tipo di estrazione), selezionare "ExK TNA-2".

- 5) Nel menu a tendina "Master Mix Format" (Formato master mix), scegliere "Type 5" (Tipo 5).
  - b. Nota: Il prodotto può essere utilizzato in combinazione con un test aggiuntivo VIASURE per BD MAX™. In questo caso selezionare "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato master mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5).
- 6) In "Sample extraction parameters" (Parametri di estrazione campione) selezionare "User defined" (Utente definito) e regolare il volume del campione a 500 µL.
- 7) In "Ct Calculation" (Calcolo Ct) selezionare "Call Ct at Threshold Crossing" (Chiamare Ct al superamento del limite).
- 8) Se si utilizza un software versione 5.00 o superiore, in "Custom Barcodes" (Codici a barre personalizzati) scegliere la seguente configurazione:
  - a. "Snap-In 2 Barcode" (Codice a barre Snap-In 2): 1B [riguarda la *Vancomycin resistance reaction tube*].
  - b. "Snap-In 3 Barcode" (Codice a barre Snap-In 3): 11 (riguarda la Rehydration Buffer tube).
  - c. "Snap-In 4 Barcode" (Codice a barre Snap-In 4): un'altra provetta di reazione VIASURE (sigillo diverso) se si sceglie il formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato master mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5) (paragrafo 8.3.1).
- 9) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni PCR) inserire i seguenti parametri: "Channel Settings" (Impostazioni canale), "Gains" (Guadagni) e "Threshold" (Limite) (Tabella 3).
  - a. Nota: Il prodotto può essere utilizzato in combinazione con un test aggiuntivo VIASURE per BD MAX™. In questo caso "PCR Settings" (Impostazioni PCR) e "Test Steps" (Fasi del test) devono essere completate per entrambe le posizioni Snap-In 2 (verde) e Snap-In 4 (blu).

| Channel (Canale) | Alias | Gain (Guadagno) | Threshold (Limite) | Ct Min | 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      |

Tabella 3. PCR settings (Impostazioni di PCR.).

Nota: si consiglia di impostare i valori minimi della soglia sopraelencati per ciascun canale come punto di partenza; tuttavia, le impostazioni finali devono essere stabilite dall'utilizzatore finale durante l'interpretazione dei risultati in modo da assicurarsi che le soglie rientrino nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza e che siano al di sopra di qualsiasi segnale di fondo. Il valore soglia per i diversi strumenti può variare a causa delle diverse intensità del segnale.

- 10) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni di PCR) inserire anche i seguenti parametri "Spectral Cross Talk" (Cross talk spettrale) (Tabella 4):



|  |         | False Receiving Channel (Canale di ricezione falso) |         |         |         |         |         |
|--|---------|---|---------|---------|---------|---------|---------|
|  |         | Channel (Canale)                                    | 475/520 | 530/565 | 585/630 | 630/665 | 680/715 |
| Excitation Channel (Canale di eccitamento) | 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     | -       |         |

Tabella 4. Parametri "Spectral cross-talk" (Cross-talk spettrale).

11) Nella scheda "Test Steps" (Fasi test), inserire il protocollo PCR (Tabella 5).

| Step Name (Nome fase)   | Profile Type (Tipo profilo) | Cycles (Cicli) | Time (s) (Volta) | Temperature (Temperatura) | Detect (Rilevare) |
|---|-----------------------------|----------------|------------------|---------------------------|-------------------|
| Initial denaturation (Denaturazione iniziale)   | Attendere                   | 1              | 120              | 98°C                      | -                 |
| Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturazione e annerimento/Estensione (Raccolta dati)) | 2-<br>Temperatura           | 45             | 10               | 95°C                      | -                 |
|   |                             |                | 58               | 60°C                      | ✓                 |

Tabella 5. Protocollo PCR.

12) Cliccare sul tasto "Save Test" (Salva test).

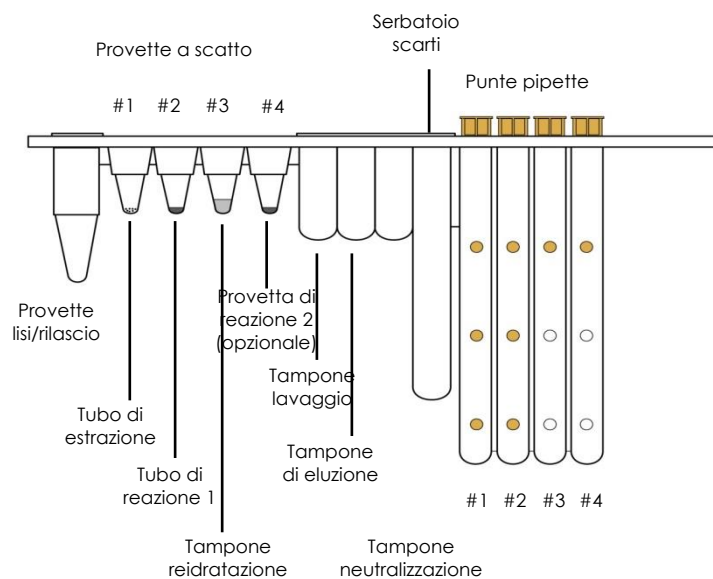
### 8.3.2. Preparazione della griglia BD MAX™

- 1) Per ogni campione da testare, rimuovere una striscia di reagente individuale dal BD MAX™ ExK™ TNA-2 kit. Picchiettare delicatamente ogni striscia su una superficie dura per assicurarsi che tutti i liquidi si trovino sul fondo della provetta, quindi posizzarle sulla griglia del BD MAX™ System.
- 2) Rimuovere il numero richiesto di provette di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA (B4) (sigillo bianco) dalla loro confezione protettiva. Posizionare la(e) provetta(e) di estrazione (sigillo bianco) nelle posizioni corrispondenti sulla striscia di TNA (posizione 1, codifica di colore bianco sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
- 3) Determinare e separare il numero appropriato di *Vancomycin resistance* reaction tubes (sigillo 1B) e posizzarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 2, codifica di colore verde sulla griglia. Vedere Figura 1).
  - a. Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
  - b. Per effettuare una corretta reidratazione, assicurarsi che il prodotto liofilizzato si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo la provetta.
    - i. Nota: Se scegliete il formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato Master Mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5) (paragrafo 8.3.1), determinare e separare il numero appropriato di provette di reazione VIASURE (sigillo diverso) e posizzarle nelle posizioni

corrispondenti sulla striscia (posizione 4, codifica di colore blu sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.

- 4) Rimuovere il numero richiesto di Rehydration Buffer tube (sigillo 11) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 3, nessuna codifica di colore sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
  - a. Per effettuare un trasferimento corretto, assicurarsi che il liquido si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il tampone si trovi in fondo la provetta.

Figura 1. Striscia di reagente BD MAX™ TNA (TNA) dal BD MAX™ ExK TNA-2 kit.



### 8.3.3. Configurazione dello strumento BD MAX™

- 1) Selezionare la scheda "Work List" (Lista di lavoro) sulla schermata "Run" (Esegui) del software BD MAX™ System nella versione v4.50A o superiore.
- 2) Nel menu a tendina "Test" selezionare VIASURE *Vancomycin resistance* (se non è ancora stato creato, vedere paragrafo 8.3.1).
- 3) Selezionare il numero relativo al lotto del kit (si trova sulla confezione esterna del kit di estrazione utilizzato) dal menu a tendina (opzionale).
- 4) Inserire il numero identificativo della provetta di tampone campione nella finestra "Sample tube" (Provetta campione) dalla "Worklist" (Lista di lavoro), manualmente oppure scansionando il codice a barre.
- 5) Compilare il codice campione/paziente e/o la finestra "Accession" (Ingresso) nella "Worklist" (Lista di lavoro) e cliccare sul pulsante "Save" (Salva). Continuare fino all'inserimento di tutte le provette di tampone campione. Assicurarsi che il codice campione/paziente e le provette di tampone campione corrispondano.
- 6) Posizionare la provetta di tampone campione preparata sulla griglia del BD MAX™.

- 7) Caricare la griglia sul BD MAX™ System (la griglia A si trova sul lato sinistro del BD MAX™ System, la griglia B sul lato destro).
- 8) Posizionare il numero richiesto di BD MAX™ PCR Cartridge(s) nel BD MAX™ System.
- 9) Chiudere la porta del BD MAX™ System.
- 10) Cliccare "Start Run" (Inizia operazione) per iniziare la procedura.

### 8.3.4. Report BD MAX™

- 1) Nel menu principale, cliccare sul pulsante "Results" (Risultati).
- 2) Cliccare due volte sul test in corso nella lista oppure premere il pulsante "View" (Vedi).
- 3) Cliccare su "Print" (Stampa), selezionare: "Run Details, Test Details and Plot..." (Dettagli operazione, dettagli test e grafico...).
- 4) Cliccare su "Print or Export button" (Stampa o esporta) nella schermata "Run Reports" (Esegui report).

## 9. Interpretazione dei risultati de resultados

Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, fare riferimento al manuale utente del sistema BD MAX™.

L'analisi dei dati viene svolta dal software del sistema BD MAX™, sulla base delle istruzioni del produttore. Il software del sistema BD MAX™ riporta i valori di Ct e le curve di amplificazione per tutti i canali di rilevazione di ciascun campione testato nel seguente modo:

- Valore di Ct pari a 0: indica che il software non ha calcolato nessun valore di Ct nei limiti specificati (vedere Tabella 3). La curva di amplificazione del campione che presenta un valore di Ct pari a 0 deve essere controllata manualmente.
- Valore di Ct pari a -1: non si è verificato nessun processo di amplificazione.
- Qualunque altro valore di Ct deve essere interpretato in correlazione con la curva di amplificazione e nel rispetto delle linee guida di interpretazione del campione riportate nella Tabella 6.

Controllare l'emissione del segnale di controllo interno per verificare il corretto funzionamento della miscela di amplificazione. Inoltre, controllare che non sia presente nessun guasto al BD MAX™ System.

-I risultati devono essere letti e analizzati utilizzando la seguente tabella:

| Gene <i>vanA</i><br>(475/520) | Gene <i>vanB</i><br>(585/630) | Controllo interno<br>(530/565) | Interpretazione   |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---|
| +                             | +                             | +/- <sup>1</sup>               | <b><i>vanA</i> e <i>vanB</i> genes DNA Rilevato</b>   |
| +                             | -                             | +/- <sup>1</sup>               | <b><i>vanA</i> gen DNA rilevato, <i>vanB</i> gen DNA non rilevato<sup>1</sup></b>   |
| -                             | +                             | +/- <sup>1</sup>               | <b><i>vanB</i> gen DNA rilevato, <i>vanA</i> gen DNA non rilevato<sup>1</sup></b>   |
| -                             | -                             | + <sup>2</sup>                 | <b><i>vanA</i> e <i>vanB</i> genes DNA non rilevato<sup>2</sup></b>   |
| -                             | -                             | - <sup>2</sup>                 | <b>Un risultato non risolto (UNR) ottenuto in presenza di inibitori nella reazione PCR o quando si verifica un problema generale (non segnalato da un codice di errore) con le fasi di elaborazione del campione e/o di amplificazione<sup>2</sup>.</b> |
| IND                           | IND                           | IND                            | <b>Risultato test indeterminato (IND). Dovuto a guasto nel sistema BD MAX™. Visualizzazione del risultato del test in caso di guasto dello strumento collegato ad un codice di errore.</b>  |
| INC                           | INC                           | INC                            | <b>Risultato test incompleto (INC). Dovuto a guasto nel sistema BD MAX™. Visualizzazione del risultato del test in caso di mancato completamento del test.</b>  |

Tabella 6. Interpretazione.

+: Curva di amplificazione presente

-: Senza curva di amplificazione

**1** Un campione viene considerato positivo se il valore ottenuto di Ct è inferiore a 40. Il controllo interno a volte può non mostrare un segnale di amplificazione a causa di un elevato numero di copie del bersaglio, che causa un'amplificazione preferenziale degli acidi nucleici specifici al posto del controllo interno. In questi casi, non è necessario il rilevamento del CI.

**2** Un campione viene considerato negativo se non mostra un segnale di amplificazione nel sistema di rilevamento ma il controllo interno è positivo (Ct inferiore a 40). Un'inibizione della reazione di PCR può essere esclusa dall'amplificazione del controllo interno. In caso di risultati non risolti (UNR) con assenza di un segnale di controllo interno in un campione negativo, è raccomandabile ripetere il test seguendo queste indicazioni.

#### RIPETERE LA PROCEDURA DEL TEST

In caso di un risultato ambiguo continuo, si raccomanda di rileggere le istruzioni per l'uso, la procedura di estrazione usata dall'utente, di verificare corrette prestazioni di ciascun passaggio del test RT-qPCR e di rivedere i parametri. Infine, si raccomanda di verificare la forma sigmoide della curva e l'intensità della fluorescenza.

NOTA: Il volume contenuto nella provetta di tampone campione è sufficiente per ripetere un test. Per le provette preparate di tampone campione BD MAX™ conservate a 2-8 °C, il nuovo test deve essere eseguito entro 24 ore.

NOTA: I nuovi campioni possono essere testati nella stessa operazione con campioni ripetuti.

I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.

## 10. Limiti del test

- I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.

- Nonostante questo test possa essere utilizzato con altri tipi di campioni, è stato convalidato con tamponi raccolti utilizzando il mezzo di trasporto ESwab™ e con sospensioni di colonie.
- Per prestazioni del test ottimali, il prodotto liofilizzato deve trovarsi in fondo alla provetta e non deve aderire alla parte superiore della provetta o del sigillo di alluminio. Picchettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo la provetta.
- Se la miscela di reazione in formato stabilizzato, normalmente presente in fondo la provetta, ha un aspetto diverso da quello solito (senza forma conica, non omogenea, più piccola/più grande e/o di colore differente dal biancastro) non altera la funzionalità del test.
- La qualità del test dipende dalla qualità del campione: gli acidi nucleici devono essere estratti in modo appropriato da colonie e tamponi perianali e/o rettali.
- Questo test è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi né indica il numero di microrganismi presenti.
- Possono essere rilevati livelli estremamente bassi al di sotto del limite di rilevamento, ma i risultati non possono essere riproducibili.
- Esiste la possibilità di falsi positivi a causa della contaminazione incrociata con campioni con sospetta resistenza alla vancomicina, a causa di concentrazioni elevate di DNA bersaglio oppure di contaminazione dovuta ai prodotti della PCR di reazioni precedenti.
- I risultati falsi negativi possono essere dovuti a diversi fattori e a combinazioni di essi; questi includono:
  - Metodi di prelievo, trasporto, considerazione e/o manipolazione dei campioni in corretto.
  - Procedure di preparazione incorrette (inclusa l'estrazione di DNA).
  - Degradazione dell'DNA durante l'invio/la conservazione e/o la preparazione dei campioni.
  - Le mutazioni o il polimorfismo nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare il rilevamento di varianti del gene *vanA* e/o del gene *vanB* nuove o sconosciute.
  - Un carico di organismi resistenti alla vancomicina nel campione al di sotto del limite di rilevamento del dosaggio.
  - Presenza di inibitori della RT-qPCR o di altri tipi di sostanze interferenze.
  - Mancata aderenza alle istruzioni per l'uso e alla procedura per il test.
- Un segnale negativo del controllo interno non esclude la presenza del DNA dei geni *vanA* e/o *vanB* in un campione clinico.
- Il risultato positivo di un test non indica necessariamente la presenza di organismo vivo con vancomycin resistance e non implica che l'organismo sia infettivo o che sia l'agente eziologico dei sintomi clinici. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza di sequenze con vancomycin resistance target.
- I risultati negativi non escludono un'infezione da organismi con vancomycin resistance e non devono essere usati come unica base per il trattamento o per altre decisioni riguardanti la gestione del paziente.
- È richiesto un nuovo test nel caso in cui si ottengano risultati non risolti, indeterminati o incompleti utilizzando il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit. I risultati non risolti possono essere dovuti alla presenza di inibitori nel campione o ad una reidratazione incorretta della provetta di miscelazione di reazione liofilizzata. Un danno agli strumenti può comportare risultati indeterminati o incompleti.

## 11. Controllo di qualità

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contiene un controllo interno (CI) in ogni provetta di reazione, che conferma il funzionamento corretto della tecnica.

## 12. Caratteristiche del test

### 12.1. Sensibilità e specificità clinica

Le prestazioni cliniche del VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit sono state testate utilizzando campioni clinici (tamponi rettali) da pazienti con una sospetta infezione da VRE. I risultati sono stati i seguenti:

|   | Sito  | Tipo di campione | Flusso di lavoro                    | Target                         |
|---|---|------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | Microbiologia clinica, Centre for Infectious Diseases and Microbiology Laboratory services, NSW Health Pathology, Westmead Hospital (Sydney, Australia) | Tampone rettale  | BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System | Gene <i>vanA</i>               |
|   |   |                  |                                     | Gene <i>vanB</i>               |
|   |   |                  |                                     | Geni <i>VanA</i> + <i>VanB</i> |

Tabella 7. Sede, tipo di campione, flusso di lavoro e target.

I valori positivi e negativi reali, i valori falsi positivi e falsi negativi, i valori di sensibilità e specificità per VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit sono stati calcolati in relazione a ciascun dosaggio di confronto, come riportato nella seguente tabella:

| Sito | Dosaggio di confronto            | Target           | TP | TN  | FP | FN | Sensibilità       | Specificità       |
|------|----------------------------------|------------------|----|-----|----|----|-------------------|-------------------|
| 1    | PCR VRE in loco (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%) |

Tabella 8. Valori positivi (TP) e negativi (TN) reali, i valori falsi positivi (FP) e falsi negativi (FN), i valori di sensibilità e specificità per VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

I risultati mostrano un'elevata concordanza nel rilevare i geni *vanA* e *vanB* utilizzando il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Inoltre, è stato calcolato anche il tasso di errore nel controllo della preparazione dei campioni. Il numero iniziale di reazioni non risolte (UNR) era 3 (tasso UNR iniziale: 1,39%). Il numero di UNR dopo la ripetizione era 0 (tasso UNR finale: 0,00%).

Per valutare la compatibilità di VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit adattato a BD MAX™ con altri campioni da una matrice diversa, è stata eseguita una valutazione per verificare la presenza di sospensioni di colonie di enterococchi resistenti alla vancomicina.

Sono state preparate diverse sospensioni di colonie aggiungendo due colonie di una determinata coltura in 500  $\mu$ l di acqua esente da nucleasi. I ceppi utilizzati per questa valutazione sono stati CECT 5253 *Enterococcus faecium* di tipo *vanA*, CECT 8120 *Enterococcus faecalis* di tipo *vanB*, NCTC 12201 *Enterococcus faecalis* di tipo *vanA* e NCTC 13632 *Enterococcus faecalis* di tipo *vanA*. È stato poi aggiunto un volume di 10  $\mu$ l di ciascuna sospensione di colonia direttamente al sample buffer tube. Per svolgere questa valutazione è stato utilizzato il diagramma: BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System.

I risultati ottenuti hanno mostrato che le sospensioni di colonie di CECT 5253, NCTC 12220 e NCTC 13632 erano positive per il gene *vanA* e che le sospensioni di colonie di CECT 8120 erano positive per il gene *vanB*.

Questi risultati mostrano che VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit può rilevare correttamente i geni di tipo *vanA* e *vanB* nelle sospensioni di colonie.

## 12.2. Sensibilità analitica

Il VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System presenta un limite di rilevamento di  $\geq 4$  unità formanti colonie per ogni reazione (CFU/rxn) per il gene *vanA* e di  $\geq 10$  unità formanti colonie per ogni reazione (CFU/rxn) per il gene *vanB* (Figure 2 e 3) con una percentuale di positività  $\geq 95\%$  nei tamponi perianali e rettali.

Figura 2. Serie di diluizioni del gene *vanA* ( $3,62 \cdot 10^4$ -3,62 CFU/rxn) realizzata sul sistema BD MAX™ (canale 475/520 (FAM)).

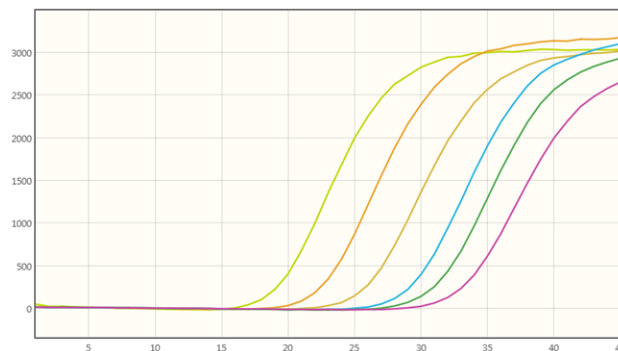
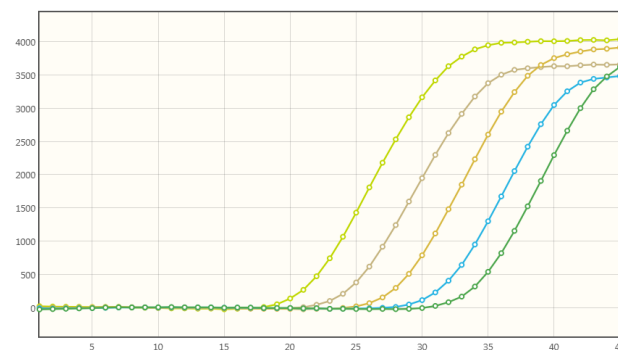


Figura 3. Serie di diluizioni del gene *vanB* ( $5,65 \cdot 10^4$ -9,98 CFU/rxn) realizzata sul sistema BD MAX™ (canale 585/630 (ROX)).



### 12.3. Specificità analitica

La specificità del test di resistenza alla vancomicina è stata confermata testando un pannello formato da diversi organismi resistenti agli antimicrobici e da diversi microrganismi che rappresentano i più comuni patogeni enterici della flora presente nell'intestino. Non è stata rilevata alcuna reattività incrociata tra i seguenti microrganismi testati, a eccezione dei patogeni bersaglio di ciascun test:

| Test di reattività incrociata   |       |  |       |  |   |
|---|-------|--|-------|--|---|
| Sierotipi di adenovirus 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) e KPC-2 che generano un isolato di <i>Klebsiella pneumoniae</i>       | - |
| <i>Aeromonas caviae</i>   | -     | <i>Enterococcus casseliflavus</i> di tipo VanC   | -     | <i>Listeria monocytogenes</i>  | - |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>  | -     | <i>Enterococcus casseliflavus</i> di tipo VanC2  | -     | Norovirus GI e GII   | - |
| <i>Arcobacter butzleri</i>  | -     | <i>Enterococcus faecalis</i>   | -     | <i>Proteus vulgaris</i>  | - |
| Astrovirus genotipo I-VIII  | -     | <i>Enterococcus faecalis</i> di tipo VanA  | - / + | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | - |
| <i>Bacteroides fragilis</i>   | -     | <i>Enterococcus faecalis</i> di tipo VanB  | - / + | Rotavirus A  | - |
| <i>Blastocystis hominis</i>   | -     | <i>Enterococcus faecium</i>  | -     | <i>Salmonella bongori</i>  | - |
| <i>Campylobacter coli</i>   | -     | <i>Enterococcus faecium</i> di tipo VanA   | + / - | <i>Salmonella enteritidis</i>  | - |
| <i>Campylobacter fetus</i>  | -     | <i>Enterococcus faecium</i> di tipo VanB   | - / + | <i>Salmonella gallinarum</i>   | - |
| <i>Campylobacter hyointestinalis</i>  | -     | <i>Enterococcus gallinarum</i> di tipo VanB e VanC                                       | - / + | <i>Salmonella paratyphi</i> A  | - |
| <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>  | -     | <i>Enterococcus gallinarum</i> di tipo VanC  | -     | <i>Salmonella paratyphi</i> B  | - |
| <i>Campylobacter lari</i>   | -     | <i>Enterococcus gallinarum</i> di tipo 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> enteroemorragico   | -     | <i>Salmonella typhimurium</i>  | - |
| VIM-1 che genera un isolato di <i>Citrobacter braakii</i>   | -     | <i>Escherichia coli</i> enteroinvasivo   | -     | Sapovirus  | - |
| <i>Citrobacter freundii</i>   | -     | <i>Escherichia coli</i> enteropatogeno   | -     | <i>Serratia liquefaciens</i>   | - |
| KPC-3 e VIM-4 che generano un isolato di complesso di <i>Citrobacter freundii</i>                               | -     | <i>Escherichia coli</i> enterotossigeno  | -     | OXA-48 che genera un isolato di <i>Serratia marcescens</i>   | - |
| <i>Clostridium difficile</i>  | -     | OXA-244 che genera un isolato di <i>Escherichia coli</i>                                 | -     | <i>Shigella dysenteriae</i>  | - |
| <i>Clostridium difficile</i> 027  | -     | TEM-1 (non-ESBL) e IMP-1 che generano un isolato di <i>Escherichia coli</i>              | -     | <i>Shigella flexneri</i>   | - |
| <i>Clostridium perfringens</i>  | -     | <i>Giardia intestinalis</i>  | -     | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>  | - |
| <i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>   | -     | <i>Helicobacter cinaedi</i>  | -     | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente alla meticillina (mecC)  | - |
| <i>Dientamoeba fragilis</i>   | -     | <i>Helicobacter heilmannii</i>   | -     | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente alla meticillina (MRSA) ceppo N315   | - |
| <i>Entamoeba dispar</i>   | -     | <i>Helicobacter hepaticus</i>  | -     | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente alla meticillina (MRSA) ST398  | - |
| <i>Entamoeba histolytica</i>  | -     | <i>Helicobacter pylori</i>   | -     | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente alla meticillina (MRSA) ceppo (oxa <sup>R</sup> , positivo a PVL, tipo spa t310) | - |
| SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) e OXA-48 che generano un isolato di <i>Enterobacter cloacae</i>                   | -     | <i>Helicobacter pylori</i> resistente alla claritromicina (23S rDNA A2146G)              | -     | <i>Vibrio parahaemolyticus</i>   | - |
| TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) e NDM-1 che generano un isolato di <i>Enterobacter cloacae</i> | -     | <i>Helicobacter pylori</i> resistente alla claritromicina (23S rDNA A2147G)              | -     | <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3   | - |
| NDM-7 che genera un isolato del complesso di <i>Enterobacter cloacae</i>  | -     | <i>Klebsiella oxytoca</i>  | -     | <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9   | - |
| <i>Enterococcus avium</i> genotipo VanA   | + / - | SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 e OXA-48 che generano un isolato di <i>Klebsiella pneumoniae</i> | -     |  |   |

Tabella 9. Microrganismi patogeni di riferimento utilizzati in questo studio.



## 12.4. Reattività analitica











La reattività di VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit per il gene *vanA* è stata valutata sulla base del DNA estratto dai ceppi dell'*Enterococcus avium* di tipo *vanA*, dell'*Enterococcus faecalis* di tipo *VanA* (NCTC 13632, NCTC 12201) e dell'*Enterococcus faecium* di tipo *VanA* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202), mostrando risultati positivi.

La reattività di VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit per il gene *vanB* è stata valutata sulla base del DNA estratto dai ceppi dell'*Enterococcus faecalis* di tipo *vanB* (ATCC 51299, CECT 8120), dell'*Enterococcus faecium* di tipo *vanB* (IOWA 2) e dell'*Enterococcus gallinarum* di tipo *vanB* e *vanC* (ENT20120142), mostrando risultati positivi.

## Bibliography/Bibliografia

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/ Simboli per reagenti e componenti IVD

|  |  |   |  |  |  |
|--|--|---|--|--|--|
|  <b>IVD</b> | <i>In vitro</i> diagnostic device<br>Dispositivo per uso diagnostico <i>in vitro</i> |  Keep dry<br>Mantenere asciutto                    |  Use by<br>Usare entro  |  Manufacturer<br>Produttore   |  <b>LOT</b> Batch code<br>Codice lotto (Lot)    |
|  <b>i</b>   | Consult instructions for use<br>Consultare le istruzioni per l'uso                   |  Temperature limitation<br>Limitazione temperatura |  Contains sufficient for <n> test<br>Contenuto sufficiente per <n> test |  <b>UDI</b> Unique Device Identification<br>Identificazione e univoca del dispositivo |  <b>REF</b> Catalogue number<br>Numero catalogo |

## 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>Change Control / Variazioni del controllo</b> |   |                     |
|--|---|---------------------|
| <b>Version No. /<br/>Versione n.</b>             | <b>Changes / Variazioni</b>   | <b>Fecha / Date</b> |
| 00   | Unification of all instructions for use associated with the different catalogue references in a single format /<br>Unificazione di tutte le istruzioni per l'uso associate ai diversi riferimenti di catalogo in un unico formato | 21/06/2021          |

Table A 2. Control change table / Tabella delle variazioni del controllo.

Revision: 21<sup>st</sup> 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](http://www.certest.es)

*One step ahead*



F-566 rev01

