



**VIASURE**

Real Time PCR Detection Kit



**Vancomycin resistance**  
for BD MAX™ System

CE IVD

These instructions for use apply to the following reference / Disse bruksanvisningene gjelder for følgende referanse:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERANSE
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. / Referanse for produkt som skal brukes med BD MAX™-systemet.

## Content

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

## Innhold

1.	Tiltenkt bruk .....	19
2.	Sammendrag og forklaring .....	19
3.	Grunnleggende prosedyre .....	20
4.	Reagenser som følger med.....	20
5.	Reagenser og utstyr som må skaffes av brukeren .....	20
6.	Transport- og lagringsforhold .....	21
7.	Forholdsregler for brukere.....	21
8.	Testprosedyre.....	22
8.1.	Innsamling, oppbevaring og transport av prøver.....	22
8.2.	Klargjøring av prøver og DNA-ekstraksjon .....	23
8.3.	PCR-protokoll .....	23

---

9.	Tolkning av resultater .....	26
10.	Testens begrensninger .....	28
11.	Kvalitetskontroll .....	28
12.	Ytelsesegenskaper .....	29
12.1.	Klinisk sensitivitet og spesifisitet .....	29
12.2.	Analytisk sensitivitet .....	30
12.3.	Analytisk spesifisitet .....	30
12.4.	Analytisk reaktivitet .....	32
	Bibliography/Litteratur .....	33
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboler for IVD-komponenter og reagenser.....	33
	Trademarks.....	33

## **ENGLISH**

---

### **1. Intended use**

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific detection and differentiation of *vanA* and *vanB* genes that can be associated with vancomycin-resistant enterococci (VRE) directly from perianal and/or rectal swabs and colonies. This test is intended to be used as an aid in the identification of vancomycin-resistant organisms in combination with patient's clinical signs and symptoms and epidemiological risk factors. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of DNA and subsequent real-time PCR employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ System. DNA from perianal and/or rectal swabs and colonies is detected using fluorescent reporter dye probes specific for *vanA* and *vanB* genes.

### **2. Summary and Explanation**

Enterococci are common commensal organisms found in the gastrointestinal tract and female genitals. Recently they are recognized as opportunistic pathogens causing nosocomial infections such as urinary tract infections, skin infections, respiratory infections, endocarditis and sepsis in compromised host.

Vancomycin is a glycopeptide antibiotic that inhibits cell wall synthesis and used to treat severe Gram-positive bacterial infections. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) were first reported in England and France in 1986 and now spread through hospitals worldwide.

The resistance to vancomycin is a complex process and needs the presence of different gene clusters. Mainly, they can be divided into two types depending on the pentapeptide precursors produced by vancomycin resistance genes: the precursor ending in D-Alanine-D-Serine (*VanC*-, *VanE*-, *VanG*-, *VanL*- and *VanN*-type) or ending in D-Alanine-D-Lactate (*VanA*-, *VanB*-, *VanD*- and *VanM*-type). These pentapeptide precursors showed low-affinities for the glycopeptides and conferred vancomycin-resistances on enterococci.

The first type of vancomycin resistance in enterococci is intrinsic resistance (i.e. associated with *vanC* gene). Isolates of *Enterococcus gallinarum* and *E. casseliflavus/E. flavescent*s 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
Vancomycin resistance 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 ≤-20°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 test 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.

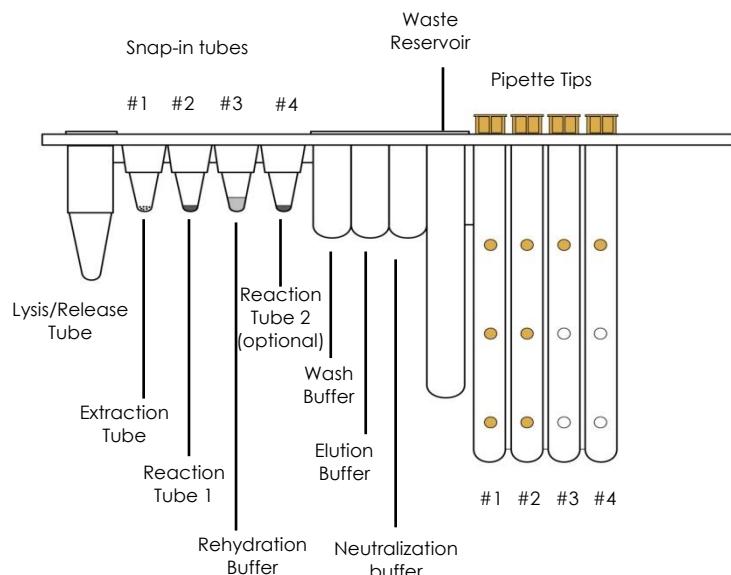
### 8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 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 (11 foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air and close the pouch with the zip seal.
  - a. In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the buffer is at the bottom of the tube.

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



### 8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the "Test" drop down menu, select VIASURE Vancomycin resistance (if not already created see Section 8.3.1).
- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull-down menu (optional).

- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Worklist, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Worklist and click the "Save" button. Continue until all Sample Buffer Tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer Tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

#### **8.3.4. BD MAX™ report**

- 1) In main menu, click the "Results" button.
- 2) Either double click on your run in the list or press the "view button".
- 3) Click on "Print", select: "Run Details, Test Details and Plot..."
- 4) Click on "Print or Export button" on the "Run Reports" screen

### **9. Result interpretation**

For a detailed description on how to analyze data, refer to the BD MAX™ System User's manual.

The analysis of the data is done by the BD MAX™ software according to the manufacturer's instructions. The BD MAX™ software reports Ct values and amplification curves for each detector channel of each sample tested in the following way:

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 3). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.
- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Table 6.

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

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

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

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

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

**2** A sample is considered negative if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive (Ct less than 40). An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control. In case of unresolved results (UNR), absence of internal control signal in negative sample it is recommended to repeat the assay following the indications below.

#### REPEAT TEST PROCEDURE

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

NOTE: Sufficient volume is available for one repeat test from the Sample Buffer Tube. For prepared BD MAX™ Sample Buffer Tubes stored at 2–8 °C or 25°C, retesting must be performed within 24 hours.

NOTE: New samples may be tested in the same run with repeat samples.

The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

## 10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with perianal and/or rectal swabs collected using ESwab™ transport medium, and colony suspension.
- For good test performance, the lyophilized product should be at the bottom of the tube and not adhered to the top area of the tube or the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from perianal and/or rectal swabs and colonies must be extracted.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by vancomycin resistance suspicious samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
  - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
  - Improper processing procedures (including DNA extraction).
  - Degradation of the DNA during sample shipping/storage and/or processing.
  - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown vanA gene and/or vanB gene variants.
  - A vancomycin resistance organism load in the specimen below the limit of detection for the assay.
  - The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances.
  - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- A negative IC signal does not preclude the presence of vanA gene and/or vanB gene DNA in a clinical specimen.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable vancomycin resistance organism and does not imply that these organisms are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targets vancomycin resistance sequences.
- Negative results do not preclude vancomycin resistance organism infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

## 11. Quality control

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit contains an internal control (IC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

## 12. Performance characteristics

### 12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit was tested using clinical specimens (rectal swabs) from patients with suspected VRE infection. The results were as follows:

	<b>Site</b>	<b>Sample type</b>	<b>Workflow</b>	<b>Target</b>
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:

<b>Site</b>	<b>Comparator assay</b>	<b>Target</b>	<b>TP</b>	<b>TN</b>	<b>FP</b>	<b>FN</b>	<b>Sensitivity</b>	<b>Specificity</b>
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 colony suspensions was added directly to the sample buffer tube. The flowchart used to carry out this evaluation was: BD MAX™ ExKTM 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).

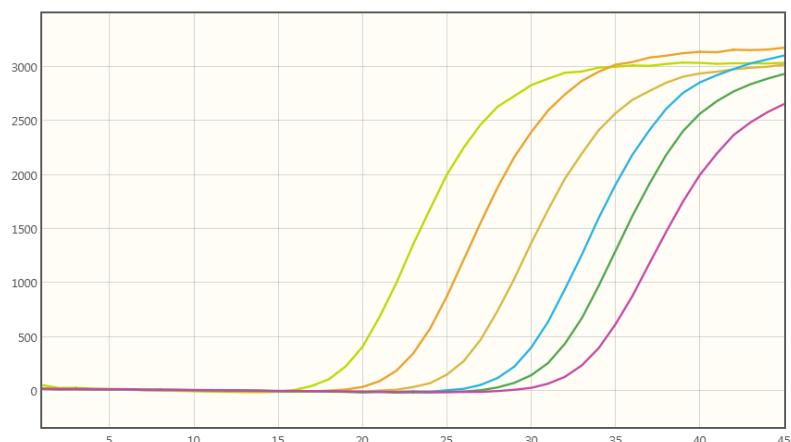
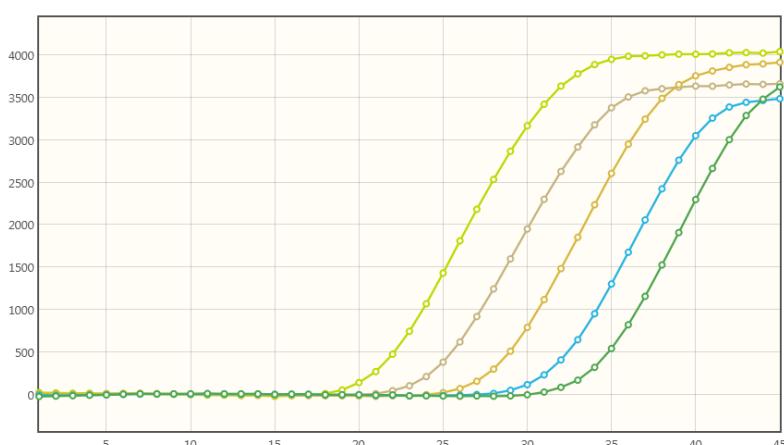


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene ( $5.65 \times 10^4$ - $9.98$  CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



## 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	-	Enterococcus durans	-	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 Enterococcus casseliflavus	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	VanC2-type Enterococcus casseliflavus	-	Norovirus GI and GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Enterococcus faecalis	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrovirus Genotype I-VIII	-	VanA-type Enterococcus faecalis	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	VanB-type Enterococcus faecalis	- / +	<i>Rotavirus A</i>	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	Enterococcus faecium	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	VanA-type Enterococcus faecium	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	VanB-type Enterococcus faecium	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyoilealis</i>	-	VanB and VanC-types Enterococcus gallinarum	- / +	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	VanC-type Enterococcus gallinarum	-	<i>Salmonella paratyphi B</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	VanC1-type Enterococcus gallinarum	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	Enterococcus hirae	-	<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.

## NORKS

### 1. Tiltenkt bruk

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit er designet for spesifikk påvisning og differensiering av vanA- og vanB-gener, som kan knyttes til vankomycinresistente enterokokker (VRE) direkte fra perianal- og/eller rektalprøvepensler og kolonier. Denne testen er ment som en hjelp i identifikasjonen ved identifisering av vankomycinresistente organismer i kombinasjon med pasientens kliniske tegn og symptomer samt epidemiologiske risikofaktorer. Analysen bruker BD MAX™-systemet til automatisert ekstraksjon av DNA og påfølgende sanntids PCR ved bruk av de medfølgende reagensene kombinert med universale reagenser og forbruksmateriell for BD MAX™-systemet. DNA fra perianal- og/eller rektalprøvepensler og kolonier påvises ved hjelp av fluorescerende reporterfargeprober som er spesifikke for vanA- og vanB-gener.

### 2. Sammendrag og forklaring

Enterokokker er vanlige kommensale organismer som finnes i tarmen og kvinnelige kjønnssorganer. De er nylig anerkjent som opportunistiske patogener som forårsaker sykehusinfeksjoner slik som urinveisinfeksjoner, hudinfeksjoner, luftveisinfeksjoner, endokarditt og sepsis hos vertspersonen.

Vancomycin er et glykopeptid-antibiotikum som hemmer celleveggsyntese og brukes til å behandle alvorlige infeksjoner forårsaket av Gram-positive bakterier. Vankomycinresistente enterokokker (VRE) ble først rapportert i England og Frankrike i 1986 og finnes i dag på sykehus over hele verden.

Vankomycinresistens er en kompleks kompress, og den krever tilstedeværelse av ulike gengrupper. Disse kan hovedsakelig deles inn i to typer, avhengig av pentapeptid-forløperne som produseres av genene for vankomycinresistens; forløpere som slutter med D-Alanine-D-Serine (VanC-, VanE-, VanG-, VanL- og VanN-typer) eller som slutter med D-Alanine-D-Lactate (VanA-, VanB-, VanD- og VanM-typer). Disse pentapeptid-forløperne har vist lav affinitet for glykopeptidene og resulterende vankomycinresistens hos enterokokker.

Den første typen av vankomycinresistens hos enterokokker er iboende resistens (dvs. assosiert med vanC-genet). Isolater av *Enterococcus gallinarum* og *E. casseliflavus/E. flavescent* viser iboende lavnivå vankomycinresistens. Den andre typen er tilegnet resistens (dvs. vanA- eller vanB-gener), og enterokokker kan bli resistente gjennom tilegning av mobile, genetiske elementer (transposoner og plasmider) fra en annen *Enterococcus*-art eller -organisme. Denne resistensen ses vanligvis i *E. faecium* og *E. faecalis*, men har også blitt observert i *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* og flere andre enterokokkarter. vanA- og vanB-genene er ansvarlige for høye eller moderate nivåer av vankomycinresistens.

Overføring av vankomycinresistente enterokokker (VRE) kan forekomme gjennom direkte kontakt med kroppsvæske fra koloniserte eller infiserte pasienter (blod, sårvæske, urin, avføring, septum m.fl.) eller gjennom indirekte kontakt via hendene til helsepersonell, eller via kontaminert utstyr brukt til pasientpleie eller overflater i omgivelsene.

Til å begynne med ble det brukt en kulturbasert screeningmetode. Denne metoden var tidkrevende og tok vanligvis mellom en og fem dager å fullføre. Sanntids PCR-analyser er dokumentert å være et verktøy for påvisning av klinisk relevante gener assosiert med vankomycinresistens.

### 3. Grunnleggende prosedyre

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit er beregnet på identifisering og differensiering av DNA fra vankomycinresistente enterokokker og andre organismer som bærer de vankomycinresistente genene vanA og vanB. Etter DNA-isolering utføres identifisering av vankomycinresistens gjennom amplifisering av et konservert område av vanA- og vanB-genene, ved bruk av spesifikke primere og en fluorescensmerket probe.

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit er basert på 5'-eksonuklease-aktiviteten til DNA-polymerase. Under DNA-amplifikasjon kløver dette enzymet proben som er bundet til den komplementære DNA-sekvensen, og skiller quencher-fargen fra reporterfargen. Denne reaksjonen genererer en økning i fluorescenssignalet som er proporsjonal med kvantiteten av målmalen. Denne fluorescensen måles av BD MAX™-systemet.

Hvert rør i VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit inneholder alle komponenter som behøves for sannids PCR-analyse (spesifikke primere/prober, dNTP-er, buffer og polymerase) i et stabilisert format samt en intern kontroll til monitorering av ekstraksjons prosessen og/eller hemming av polymerase aktiviteten.

Mål	Kanal	Gen
vankomycinresistente genene	475/520	vanA
vankomycinresistente genene	585/630	vanB
Intern Kontroll (IC)	530/565	-

Tabell 1. Mål, kanal og gener.

### 4. Reagenser som følger med

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit inkluderer følgende materialer og reagenser, nærmere beskrevet i tabell 2:

Reagens/Materiale	Beskrivelse	Strekkode	Mengde
Vancomycin resistance reaction tube	En blanding av enzymer, primere, prober, buffere, dNTP-er, stabilisatorer og intern kontroll i et stabilisert format	1B folie	2 poser à 12 gjennomsiktig rør
Rehydration Buffer tube	Løsning til rekonstituering av det stabiliserte produktet	11 folie	1 pose à 24 gjennomsiktig rør

Tabell 2. Reagenser og materialer som følger med VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit med Cat. N°. VS-VAN124 (444202).

### 5. Reagenser og utstyr som må skaffes av brukeren

Følgende liste inneholder materialene og utstyret som kreves til bruken, men som ikke er inkludert i VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

- Sannids PCR-instrument: BD MAX™-system.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (ref:442825 eller 442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (ref: 437519).
- Vortex.

- Mikropipetter (nøyaktighet mellom 2 og 1000 µl)
- Nukleasefritt vann
- Filterspisser
- Pudderfri engangshansker

## 6. Transport- og lagringsforhold

- Settene kan sendes og oppbevares ved 2–40 °C inntil utløpsdatoen som er angitt på etiketten.
- Etter åpning av aluminiumsposene med reaksjonsrørene kan disse brukes i opptil 28 dager.

## 7. Forholdsregler for brukere

- Produktet er kun ment å brukes av fagpersonell, f.eks. laboratorie- eller helsepersonell og teknikere, som er opplært i molekylære biologiske teknikker.
- Til diagnostisk bruk *in vitro*.
- Ikke bruk reagenser og/eller materialer som er gått ut på dato.
- Ikke bruk settet hvis etiketten som forsegler ytteresken er brutt.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesesken er åpen eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesposene er åpne eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis reagensposene ikke har tørkemiddel eller hvis tørkemiddelet er ødelagt.
- Ikke fjern tørkemiddelet fra reagensposene.
- Beskyttelsesposene til reagensene skal lukkes med lylåsen umiddelbart etter hver bruk. Fjern all overflødig luft i posene før de forsegles.
- Må ikke brukes hvis folien er revnet eller ødelagt.
- Ikke bland reagenser fra forskjellige poser og/eller sett og/eller loter.
- Beskytt reagenser fra fuktighet. Langvarig eksponering for fuktighet kan påvirke produktytelsen.
- Oppbevar komponentene beskyttet mot lys.
- I tilfeller der andre PCR-tester utføres i det samme generelle området av laboratoriet, må det utvises forsiktighet for å unngå kontaminering av VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit eventuelle andre reagenser som kreves for testing samt BD MAX™-systemet. Unngå til enhver tid at reagenser kontamineres med mikrober og ribonuklease (RNase)/deoksyribonuklease (DNase). Det anbefales bruk av sterile RNase/DNase-frie aerosolresistente eller "positive displacement" pipettespisser til engangsbruk. Bruk en ny pipettespiss for hver prøve. Du må skifte hanske før du håndterer reagenser og kassetter.
- For å unngå miljøkontaminering med amplikoner, må du ikke brekke åpen PCR-kassett (BD MAX™ PCR Cartridge) etter bruk. Forseglingen på PCR-kassett (BD MAX™ PCR Cartridge) er designet for å unngå kontaminering.
- Benytt en enveis arbeidsflyt. Den skal starte i ekstraksjonsområdet og deretter gå videre til amplifikasjons- og påvisningsområdet. Prøver, utstyr og reagenser må ikke returneres til området der det forrige trinnet ble utført.
- Følg god laboratoriepraksis. Bruk verneklaer, engangshansker, vernebriller og maske. Ikke spis, drikk, røyk eller bruk kosmetiske produkter på arbeidsområdet. Vask hendene etter å ha fullført testen.

- Prøvene må behandles som potensielt smittefarlige og / eller biofarlig, i likhet med alle reagenser og materialer som har blitt eksponert for prøvene, og må håndteres i henhold til nasjonale sikkerhetsregler. Ta nødvendige forholdsregler under innsamling, transport, oppbevaring, behandling og kassering av prøver.
- Prøver og reagenser må håndteres i et biologisk sikkerhetsskap. Bruk personlig verneutstyr (PU) i tråd med de relevante retningslinjene for håndtering av potensielt smittefarlige prøver. Avfall skal kastes i henhold til lokale og delstatlige forskrifter.
- Regelmessig dekontaminering av annet vanlig utstyr som brukes er anbefalt, spesielt mikropipetter og arbeidsflater.
- I henhold til forordning (EF) nr. 1907/2006 (REACH), kreves det ikke sikkerhetsdatablad (Safety Data Sheets) for «VIASURE Real Time PCR Detection Kits» ettersom de er klassifisert som ikke helse- eller miljøskadelig fordi de ikke inneholder farlige stoffer og/eller blandinger som oppfyller fareklassifiseringskriteriene tilgjengelig i forordning (EF) nr. 1272/2008 (CLP), eller som har konsentrasjoner høyere enn verdien fastsatt i nevnte forordning i sin deklarasjon.
- Konsulter brukerhåndboken for BD MAX™-systemet for ytterligere advarsler, forsiktigheitsregler og prosedyrer.

## 8. Testprosedyre

### 8.1. Innsamling, oppbevaring og transport av prøver

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit er validert på perianal- og/eller rektalprøvepensler som umiddelbart ble plassert i ESwab™-transportbeholdere (flytende Amies-basert innsamlings- og transportsystem (Copan, Italia). VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit er også validert på koloniløsning. Andre typer prøver må valideres av brukeren

Innsamling, oppbevaring og transport av prøver skal utføres under de forhold som valideres av brukeren. Generelt skal perianal- og/eller rektalprøvepensler samles inn og merkes på egnet måte i rent ESwab™-transportmedium og behandles snarest mulig for å garantere kvaliteten av testen. Prøvene skal transporteres ved 2 til 8 °C i opptil 24 timer, i henhold til lokale og nasjonale regler for transport av patogent materiale. For langvarig transport (over 24 timer) anbefaler vi forsendelse ved ≤-20 °C eller lavere. Det anbefales å bruke ferske prøver til testen. Prøvene kan oppbevares ved 25 °C i opptil 24 timer, 2 til 8 °C i opptil 144 timer (6 dager), i fryser ved -20 °C i opptil 192 timer (8 dager) eller fryser ved -70 °C for konservering. Gjentatte sykluser med frysing/tining bør unngås for å forhindre forringelse av prøven og nukleinsyrene.

Fecesprøvene skal samles inn, transporteres og oppbevares i tråd med relevante retningslinjer for laboratoriet. For mer informasjon, se retningslinjene til CDC (Specimen collection guidelines), nettstedet <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> and the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018), og artikkelen 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. Klargjøring av prøver og DNA-ekstraksjon

Klargjør prøven i henhold til anbefalingene i bruksanvisningen for ekstraksjonssettet som blir benyttet, BD MAX™ ExK™ TNA-2. Merk at enkelte andre prøver kan kreve forbehandling. Prosedyrer for klargjøring til ekstraksjon i samsvar med den spesifikke anvendelsen skal utvikles og valideres av brukeren.

1. Copan ESwab™: Pipetter 200 µl av ESwab™-prøven ned i et BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample buffer Tube (prøvebufferrør) og lukk røret med en membranhette. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Neste steg er BD MAX™ System Operation.
2. Kolonier: Hent opp to kolonier fra det dyrkede mediet, og løs dem opp i 500 µl nukleasefritt vann. Bruk vorteksmikser for å sikre fullstendig blanding. Tilsett 10 µl av suspensjonen i et BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample buffer Tube (prøvebufferrør) og lukk røret med en membranhette. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Neste steg er BD MAX™ System Operation.

## 8.3. PCR-protokoll

Merk: Se brukerhåndboken for BD MAX™-systemet for detaljerte instruksjoner.

### 8.3.1. Opprette et PCR-testprogram for VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

Merk: Hvis du allerede har opprettet testen for VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, kan du hoppe over trinn 8.3.1 og gå direkte til 8.3.2.

- 1) Velg fanen "Test Editor" (Testredigering) på skjermen "Run" (Kjør) på BD MAX™-systemet.
- 2) Klikk på knappen "Create" (Opprett).
- 3) I fanen "Basic Information" (Grunnleggende informasjon), skriv navnet på testen din i vinduet "Test Name" (Testens navn): f.eks. VIASURE Vancomycin resistance.
- 4) På nedtrekksmenyen "Extraction Type" (Ekstraksjonstype), velg "ExK TNA-2".
- 5) På nedtrekksmenyen "Master Mix Format", velg "Type 5".
  - a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med en ytterligere VIASURE for BD MAX™-test. I så fall må du velge "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)).
- 6) Under "Sample extraction parameters" (Prøveekstraksjonsparametere), velg "User defined" (Brukerdefinert) og tilpass prøvevolumet til 500 µl.
- 7) Under "Ct Calculation" (Ct-beregning), velg "Call Ct at Threshold Crossing" (Angi Ct ved terskelkryssing).
- 8) Hvis du kjører versjon 5.00 av programvaren, velger du følgende konfigurasjon under "Custom Barcodes" (Egendefinerte strekkoder):
  - a. Snap-In 2 "Barcode" (Strekkode for klemme 2): 1B (for Vancomycin resistance reaction tube).
  - b. Snap-In 3 "Barcode" (Strekkode for klemme 3): 11 (for Rehydration Buffer tube).

- c. Snap-In 4 "Barcode" (Strekkode for klemme 4): et annet VIASURE-reaksjonsrør (forskjellig folie) hvis du velger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5) (avsnitt 8.3.1).
- 9) Oppgi følgende parametere i fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger): "Channel Settings" (Kanalinnstillinger), "Gains" (Forsterkning) og "Threshold" (Terskel) (tabell 3).
- a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med en ytterligere VIASURE for BD MAX™-test. I så fall må "PCR settings" (PCR-innstillinger) og "Test Steps" (Testtrinn) fylles ut for posisjon 2 (grønn) og posisjon 4 (blå).

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Forsterkning)	Threshold (Terskel)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	vanA	50	200	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	200	0	40
585/630 (ROX)	vanB	50	300	0	40
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabell 3. PCR settings (PCR-innstillinger).

Merk: Det anbefales at man først stiller inn minimum terskelverdiene som er listet opp ovenfor for hver kanal, men de endelige innstillingene må bestemmes av sluttbrukeren under tolkningen av resultatene for å sikre at tersklene faller innenfor den eksponentielle fasen av fluorescenskurvene og over et eventuelt bakgrunnsignal. Terskelverdien for forskjellige instrumenter kan variere grunnet forskjellige signalintensiteter.

- 10) I fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger) oppgir du følgende parametere "Spectral Cross Talk" (Spektral krysstale) (tabell 4)

	False Receiving Channel (Kanal som mottar falske data)					
	Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Eksitasjonskanal)	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	-

Tabell 4. Parametere "Spectral cross-talk" (spektral krysstale).

- 11) I fanen "Test Steps" (Testtrinn) oppgir du PCR-protokollen (tabell 5).

Step Name (Navn på trinn)	Profile Type (Profiltype)	Cycles (Sykluser)	Time (s) (Tid (s))	Temperature (Temperatur)	Detect (Påvis)
Initial denaturation (Innledende denaturering)	Vent	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing (Denaturering og herding)/Extension (Data collection)(forlengelse (datainnsamling))	2-Temperatur	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

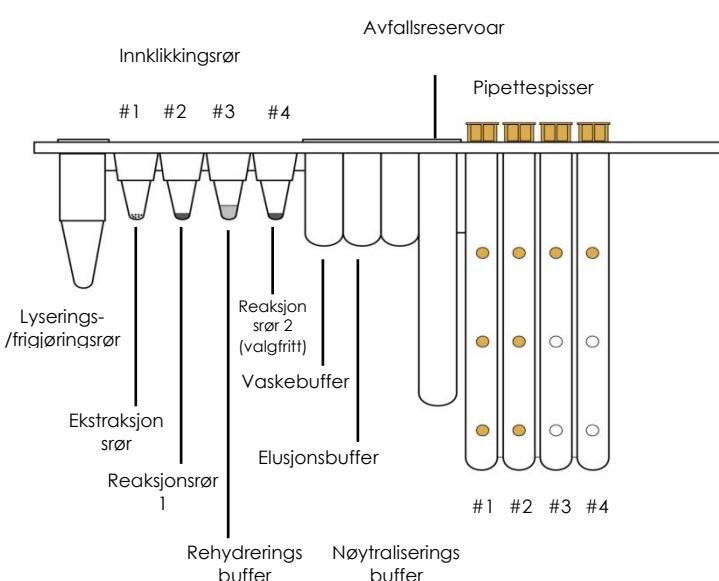
Tabell 5. PCR-protokoll.

- 12) Klikk på knappen "Save test" (Lagre test).

### 8.3.2. Sette opp BD MAX™-stativet

- 1) For hver prøve som skal testes, ta ut en separat modulreagensstrimmel fra BD MAX™ ExK TNA-2 Kit. Bank forsiktig hver strimmel mot en hard overflate for å sikre at alle væskene ligger i bunnen av rørene, og sett den i BD MAX™-systemets prøvestativ.
- 2) Ta ut nødvendig antall BD MAX™ ExK TNA-ekstraksjonsrør (B4) (hvit folie) fra beskyttelsesposen. Klikk ekstraksjonsrøret(ene) (hvit folie) på plass i deres respektive posisjoner i TNA-strimmen (posisjon 1, hvit fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lynlåsen.
- 3) Fastslå og adskill egnet antall Vancomycin resistance reaction tubes (1B folie), og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmen (posisjon 2, grønn fargekode på stativet. Se figur 1.)
  - a. Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lynlåsen.
  - b. For riktig rehydrering må du passe på at det frysetørkede produktet er i bunnen av røret og ikke har festet seg til det øverste området av røret eller til folietetningen. Bank forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at hele produktet er i bunnen av røret.
  - i. Merk: Hvis du velger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)) (avsnitt 8.3.1), må du fastslå og adskille egnet antall ekstra VIASURE-reaksjonsrør (forskjellig folie) og klikke dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmen (posisjon 4, blå fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lynlåsen.
- 4) Ta ut nødvendig antall Rehydration Buffer tubes (11 folie) og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmen (posisjon 3, uten fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lynlåsen.
  - a. For å sikre riktig overføring må du passe på at væsken er i bunnen av røret og ikke har festet seg øverst i røret eller til folietetningen. Bank forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at hele bufferen er i bunnen av røret.

Figura 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) fra BD MAX™ ExK TNA-2 Kit.



### 8.3.3. Sette opp BD MAX™-instrumentet

- 1) Velg fanen "Work List" (Arbeidsliste) på skjermen "Run" (Kjør) i BD MAX™-systemets programvare v4.50A eller nyere.
- 2) I nedtrekksmenyen "Test", velg VIASURE Vancomycin resistance (hvis den ikke allerede er opprettet, se avsnitt 8.3.1).
- 3) Velg riktig lotnummer for settet (du finner det på ytteresken til ekstraksjonssettet som brukes) fra nedtrekksmenyen (valgfritt).
- 4) Oppgi ID-nummeret til prøvebufferrøret i vinduet "Sample Tube" (prøverør) i Worklist (Arbeidsliste), enten ved å skanne strekkoden eller ved å skrive det inn manuelt.
- 5) Fyll ut prøve-/pasient-ID og/eller vinduet "Accession" (Tilgang) i Worklist (Arbeidsliste) og klikk på knappen "Save" (Lagre). Fortsett helt til du har lagt inn alle prøvebufferrørene. Sørg for at prøve-/pasient-ID og prøvebufferrørene samsvarer.
- 6) Plasser det klargjorte prøvebufferrøret i BD MAX™-stativet(ene).
- 7) Plasser stativet(ene) i BD MAX™-systemet (Stativ A settes på venstre side av BD MAX™-systemet og stativ B settes på høyre side).
- 8) Plasser påkrevd antall BD MAX™ PCR Cartridge(s) i BD MAX™-systemet.
- 9) Lukk igjen døren på BD MAX™-systemet.
- 10) Klikk på "Start Run" (Start kjøring) for å begynne prosedyren.

### 8.3.4. BD MAX™-rapport

- 1) Gå til hovedmenyen og klikk på knappen "Results" (Resultater).
- 2) Enten dobbeltklikk på kjøringen din i listen eller trykk på knappen "View" (Vis).
- 3) Klikk på "Print" (Skriv ut), og velg: "Run Details, Test Details and Plot..." (Kjøringsdetaljer, testdetaljer og plott ...)
- 4) Klikk på knappen "Print or Export" (Skriv ut eller eksporter) på skjermen "Run Reports" (Kjøringsrapporter).

## 9. Tolkning av resultater

For en detaljert beskrivelse av hvordan man analyserer dataene, se brukerhåndboken for BD MAX™-systemet.

Dataanalysen utføres av BD MAX™-programvaren i henhold til produsentens instruksjoner. BD MAX™-programvaren rapporterer Ct-verdier og amplifikasjonskurver for hver detektorkanal for hver prøve som testes, på følgende måte:

- En Ct-verdi på 0 indikerer at programvaren ikke beregnet noen Ct-verdi med den angitte terskelen (se tabell 3). En amplifikasjonskurve av prøven som viser en Ct-verdi på 0, må sjekkes manuelt.

En Ct-verdi på -1 indikerer at det ikke har funnet sted noen amplifikasjonsprosess.

Alle andre Ct-verdier må tolkes i sammenheng med amplifikasjonskurven og i henhold til retningslinjene for tolkning av prøver som er angitt i tabell 6.

Sjekk det interne kontrollsigalet for å kontrollere at amplifikasjonsblandingen fungerer som den skal. Sjekk også at det ikke finnes noen rapport om systemfeil i BD MAX™-systemet.

-Bruk tabellen under til å lese av og analysere resultatene:

<b>vanA-gen (475/520)</b>	<b>vanB-gen (585/630)</b>	<b>Intern kontroll (530/565)</b>	<b>Tolkning</b>
+	+	+/- <sup>1</sup>	<b>vanA og vanB-gener DNA påvist<sup>1</sup></b>
+	-	+/- <sup>1</sup>	<b>vanA-gen DNA påvist, vanB-gen DNA ikke påvist<sup>1</sup></b>
-	+	+/- <sup>1</sup>	<b>vanB-gen DNA påvist, vanA-gen DNA ikke påvist<sup>1</sup></b>
-	-	+ <sup>2</sup>	<b>vanA og vanB-gener DNA ikke påvist<sup>2</sup></b>
-	-	- <sup>2</sup>	<b>UNR = Uavklart resultat oppnådd på grunn av hemmere i PCR-reaksjonen eller når det oppstår et generelt problem (ikke rapportert av en feilkode) med prøvebehandlings- og/eller amplifikasjonsstrinn<sup>2</sup>.</b>
IND	IND	IND	<b>IND = Ubestemmelig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™. Analyseresultatet vises i tilfeller med instrumentfeil knyttet til en feilkode.</b>
INC	INC	INC	<b>INC = Ufullstendig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™. Analyseresultatet vises i tilfeller med ikke fullført kjøring.</b>

Tabell 6. Tolkning av prøve.

+: Amplifikasjon fant sted

-: Ingen amplifikasjon fant sted

**1** En prøve anses som positiv hvis oppnådd Ct-verdi er under 40. Den interne kontrollen kan vise et amplifikasjonssignal, men ikke alltid, da et høyt kopiantall for målet kan forårsake preferensiell amplifikasjon av målspesifikke nukleinsyrer i stedet for av den interne kontrollen. I slike tilfeller er det ikke nødvendig med påvisning av den interne kontrollen.

**2** En prøve anses som negativ hvis prøven ikke viser noe amplifikasjonssignal i påvisningssystemet og den interne kontrollen er positiv (Ct under 40). Hemming av PCR-reaksjonen kan utelukkes hvis den interne kontrollen amplifiseres. I tilfelle av uavklarte resultater (UNR), fravaær av signal for intern kontroll i en negativ prøve, anbefales det å gjenta analysen i henhold til indikasjonene nedenfor.

#### PROSEDYRE FOR REPETISJONSTEST

Ved vedvarende uklare resultat anbefales det å lese gjennom bruksanvisningen, bruk av ekstraksjons prosessen av brukeren; for å bekrefte riktig bruk av hvert RT-qPCR steg og revidere parametrene; samt kontrollere sigdformen på kurven og fluoriseringens intensitet.

MERK: Det er tilstrekkelig volum i Sample Buffer Tube til én repetisjonstest. For BD MAX™ Sample Buffer Tubes som har vært lagret ved 2–8 °C eller 25 °C, må repetisjonstesting utføres innen 24 timer.

MERK: Nye prøver kan testes i samme kjøring som repetisjonsprøver.

Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med sykehistorikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.

## 10. Testens begrensninger

- Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med sykehistorikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.
- Selv om denne analysen kan brukes med andre typer prøver, har den blitt validert med perianal- og/eller rektalprøvepensler innsamlet ved bruk av ESwab™-transportmedium og kolonisuspensjon.
- Lyophilized produktene bør være i bunnen av røret, ikke klebe til toppområdet eller foliemembranen for en vellykket utførelse. Bank forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at hele produktet er i bunnen av røret.
- Om reagensmiksturen er stabilisert, vanligvis i bunnen av røret, ulik den normale (uten konisk form, ikke homogen, mindre/større og/eller har en annen farge en hvitaktig) endrer ikke det prøvens funksjonalitet.
- Kvaliteten på testen avhenger av kvaliteten på prøven. Nukleinsyre må ekstraheres på riktig måte fra perianal- og/eller rektalprøvepensler og kolonier.
- Prøven er en kvalitativ test og gir ingen kvantitative verdier eller indikerer mengden av organismer i prøven.
- Ekstremt lave målnivåer som ligger under påvisningsgrensen vil muligens bli påvist, men resultatene vil ikke kunne reproduceres.
- Det finnes en mulighet for falske positive resultater grunnet krysskontaminering av vankomycinresistens-prøver som inneholder høye konsentrasjoner av mål-DNA eller kontaminering grunnet PCR-produkter fra tidligere reaksjoner.
- Falske negative resultat kan komme av flere faktorer og deres kombinasjoner, inkludert:
  - Feilaktig innhenting av prøvemateriale, transport, oppbevaring, og/eller håndtering.
  - Feilaktig prosedyrebehandling (inkludert DNA ekstraksjon).
  - Nedbrytning av DNA gjennom transport/ oppbevaring og/eller behandling av prøvematerialet.
  - Mutasjon eller polymorfier i primer- eller probe-bindingsregioner kan påvirke påvisning av nye eller ukjente vanA-gen- og / eller vanB-genvarianter.
  - En belastning på vancomycinresistens i organismen under grensen for deteksjon i analysen.
  - Forekomst av RT-qPCR inhibitorer eller andre typer forstyrrende substanser.
  - Instruksjonene for bruk og analyseprosedyren blir ikke fulgt.
- Et negativt IC-signal utelukker ikke tilstedeværelse av DNA fra vanA- og/eller vanB-gener i en klinisk prøve.
- En positiv test indikerer ikke nødvendigvis tilstedeværelse av levedyktige vankomycinresistente organismer og antyder ikke at disse organismene er infeksiøse eller er den bakenforliggende årsaken til kliniske symptomer. Men en positiv test indikerer tilstedeværelsen av målets kliniske vankomycinresistente sekvenser.
- Negative resultater utelukker ikke infeksjon med vankomycinresistens og må ikke brukes som det eneste grunnlaget for behandling eller andre bestemmelser relatert til håndtering av pasienter.
- I tilfelle av uavklarte, ubestemte eller ufullstendige resultater ved bruk av VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, må testen gjentas. Uavklarte resultater kan skyldes tilstedeværelse av hemmere i prøven eller en ukorrett rehydrering av røret med lyofilisert reaksjonsblanding. Hvis det oppstår instrumentsvikt, vil resultatene som oppnås være ubestemte eller ufullstendige.

## 11. Kvalitetskontroll

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit inneholder en intern kontroll (IC) i hvert reaksjonsrør som bekrefter at teknikken fungerer som den skal.

## 12. Ytelsesegenskaper

### 12.1. Klinisk sensitivitet og spesifisitet

Den kliniske ytelsen til VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit ble testet med kliniske prøver (rektale prøvepensler) fra pasienter med mistanke om VRE-infeksjon. Resultatene var som følger:

	<b>Sted</b>	<b>Prøvetype</b>	<b>Arbeidsflyt</b>	<b>Mål</b>
1	Clinical Microbiology, Centre for Infectious Diseases and Microbiology Laboratory services, NSW Health Pathology, Westmead Hospital (Sydney, Australia)	Rektal prøvepensel	BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System	VanA-gen
	VanB-gen			
	VanA- + VanB-gener			

Tabell 7. Sted, prøvetype, arbeidsflyt og mål.

Sanne positive og negative verdier, falske positive og negative verdier, samt verdier for sensitivitet og spesifisitet for VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit ble regnet ut i forhold til hver komparatoranalyse som vist i tabellen nedenfor:

<b>Sted</b>	<b>Komparatoranalyse</b>	<b>Mål</b>	<b>TP</b>	<b>TN</b>	<b>FP</b>	<b>FN</b>	<b>Sensitivitet</b>	<b>Spesifisitet</b>
1	Intern 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 %)

Tabell 8. Sanne positive (TP) og negative (TN) verdier, falske positive (FP) og negative (FN) verdier, sensitivitet og spesifisitet for VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

Resultater viser høy overensstemmelse for påvisning av vanA- og vanB-gener ved bruk av VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

I tillegg til dette ble feilraten for prøvebehandlingskontroll regnet ut. Opprinnelig antall uavklarte reaksjoner (UNR) var 3 (Opprinnelig UNR-rate: 1,39 %). Antall UNR etter repetisjon var 0 (Endelig UNR-rate: 0,00 %).

For å kunne evaluere kompatibilitet av VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit tilpasset for BD MAX™ med andre forskjellige matriseprøver, ble det utført en evaluering for å verifisere påvisning av kolonier av vankomycinresistente enterokokker i suspensjon.

Forskjellige kolonisuspensjoner ble tilberedt ved å tilføye to kolonier fra en bestemt kultur i 500 µl nukleasefritt vann. Stammene som ble benyttet for denne evalueringen var CECT 5253 *Enterococcus faecium* vanA, CECT 8120

*Enterococcus faecalis* vanB, NCTC 12201 *Enterococcus faecalis* vanA og NCTC 13632 *Enterococcus faecalis* vanA. Et volum på 10 µl av hver kolonisuspensjon ble tilsatt direkte i sample buffer tube. Flyteskjemaet som ble benyttet til utføring av denne evalueringen var: BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System.

Resultatene som ble oppnådd viste at kolonisuspensjoner av CECT 5253, NCTC 12220 og NCTC var positive for vanA-genet, og kolonisuspensjoner av CECT 8120 var positive for vanB-genet.

Disse resultatene viser at VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit korrekt kan påvise vanA- og vanB-gener i kolonisuspensjoner.

## 12.2. Analytisk sensitivitet

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit har en påvisningsgrense på  $\geq 4$  kolonidannende enheter per reaksjon (CFU/rxn) for vanA og  $\geq 10$  kolonidannende enheter (CFU/rxn) for vanB (Figur 2 og 3) med en positiv rate på  $\geq 95\%$  på perianale og rektale prøvepensler.

Figura 2. Fortynningsserie med vanA-gen ( $3,62 \times 10^4$ -3,62 CFU/reaksjon) med mal kjørt på BD MAX™-systemet (kanal 475/520 (FAM)).

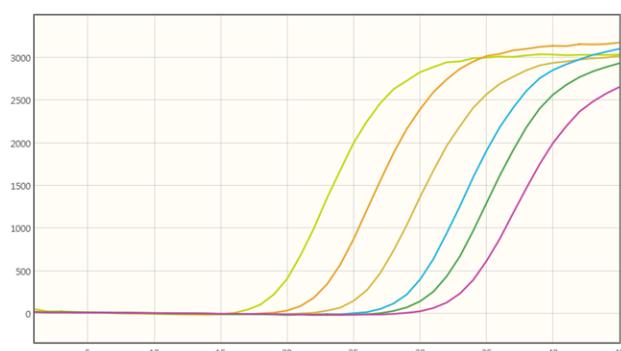
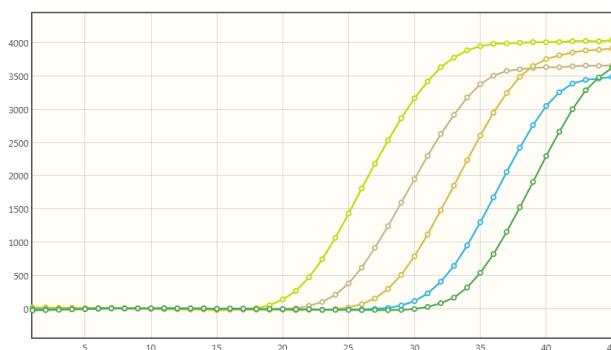


Figura 3. Fortynningsserie med vanB-gen ( $5,65 \times 10^4$ -9,98 CFU/reaksjon) med mal kjørt på BD MAX™ System (kanal 585/630 (ROX)).



## 12.3. Analytisk spesifitet

Spesifisiteten til vankomycinresistens-analysen ble bekreftet ved å teste et panel bestående av forskjellige organismer resistente mot antimikrober og ulike mikroorganismes som representerer de vanligste enteriske patogener eller flora som finnes i tarmen. Ingen kryssreakтивitet ble påvist mellom noen av de følgende testede mikroorganismene, bortsett fra målpatogenene for hver analyse:

Test av krysreakтивitet					
Adenovirus, serotyper 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	TEM-1 (ikke-ESBL)-, SHV-1 (ikke-ESBL)-, CTX-M-2 (ESBL)- og KPC-2-produserende <i>Klebsiella pneumoniae</i> -isolat	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	VanC-type <i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	VanC2-type <i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	Norovirus GI og GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrovirus, genotype I-VIII	-	VanA-type <i>Enterococcus 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 hyoilealis</i>	-	VanB- og VanC-type <i>Enterococcus gallinarum</i>	- / +	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	VanC -type <i>Enterococcus gallinarum</i>	-	<i>Salmonella paratyphi B</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	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>	-	Enterohemoragisk <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
VIM-1-produserende <i>Citrobacter braakii</i> -isolat	-	Enteroinvasiv <i>Escherichia coli</i>	-	Sapovirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Enteropatogenisk <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
KPC-3- og VIM-4-produserende <i>Citrobacter freundii</i> -kompleksisolat	-	Enterotoksigenisk <i>Escherichia coli</i>	-	OXA-48-produserende <i>Serratia marcescens</i> -isolat	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	OXA-244-produserende <i>Escherichia coli</i> -isolat	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	TEM-1 (ikke-ESBL)- og IMP-1-produserende <i>Escherichia coli</i> -isolat	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	Meticillinresistant <i>Staphylococcus aureus</i> (mecC)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Meticillinresistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)-stamme N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	Meticillinresistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Meticillinresistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)-stamme (oxa <sup>R</sup> , PVL-positive, spa-type t310)	-
SHV-12 (ESBL)-, CTX-M-9 (ESBL)- og OXA-48-produserende <i>Enterobacter cloacae</i> -isolat	-	<i>Helicobacter pylori</i> klaritromycinresistent (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
TEM-1 (ikke-ESBL)-, SHV-12 (ikke-ESBL)-, CTX-M-15 (ESBL)- og NDM-1-produserende <i>Enterobacter cloacae</i> -isolat	-	<i>Helicobacter pylori</i> klaritromycinresistent (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
NDM-7-produserende <i>Enterobacter cloacae</i> -kompleksisolat	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
VanA-type <i>Enterococcus avium</i>	+ / -	SHV-1(ikke-ESBL)-, KPC-3 og OXA-48-produserende <i>Klebsiella pneumoniae</i> -isolat	-		

Tabell 9. Patogen mikroorganisme benyttet som referanse i denne studien.

## 12.4. Analytisk reaktivitet

Reaktiviteten til VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit for vanA-genet ble evaluert opp mot DNA ekstrahert fra vanA-type *Enterococcus avium*-, vanA-type *Enterococcus faecalis* (NCTC 13632, NCTC 12201)- og vanA-type *Enterococcus faecium* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202)-stammer, og viste positive resultater.

Reaktiviteten til VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit for vanB-genet ble evaluert opp mot DNA ekstrahert fra vanB-type *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299, CECT 8120)-, vanB-type *Enterococcus faecium* (IOWA 2)- og vanB- og vanC *Enterococcus gallinarum* (ENT20120142)-stammer, og viste positive resultater.

## Bibliography/Litteratur

1. B. Mirzaei et al. Detection of both vanA & vanB genes in vanA phenotypes of Enterococci by Taq Man RT-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology* 2015; 46, 1, 161-165.
2. J C.G. Marshall et al. D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; Vol. 94, pp. 6480–6483.
3. G. Werner et al. Comparison of direct cultivation on a selective solid medium, polymerase chain reaction from an enrichment broth, and the BD GeneOhm™ VanR Assay for identification of vancomycin-resistant enterococci in screening specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; Volume 70, Issue 4, Pages 512–521.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) in Healthcare Settings. Available from: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/vre/vre.html#:~:text=CDC%20works%20with%20healthcare%20facilities,high%20numbers%20of%20VRE%20infections> Accessed January 2021.
5. T.Nomura et al. New colony multiplex PCR assays for the detection and discrimination of vancomycin-resistant enterococcal species. *Journal of Microbiological Methods* 2018; 69-72.

## Symbols for IVD components and reagents/ Symboler for IVD-komponenter og reagenser

<b>IVD</b>	In vitro diagnostic device In vitro-diagnostisk enhet		Keep dry Holdes tørr		Use by Brukes innen		Manufacturer Produsent	<b>LOT</b>	Batch code Partikode (lot)
	Consult instructions for use Les instruksjonene før bruk		Temperature limitation Temperaturgr enser		Contains sufficient for <n> test Inneholder nok til <n> tester		Unique Device Identification Unik enhetsidentifikasjon	<b>REF</b>	Catalogue number Katalognummer

## Trademarks

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

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

<b>Change Control / Endringskontroll</b>		
<b>Version No. / Versjon n</b>	<b>Changes / Endringer</b>	<b>Date / Dato</b>
00	Unification of all instructions for use associated with the different catalogue references in a single format / Enhet av alle bruksanvisninger knyttet til de forskjellige katalogreferansene i ett format.	21/06/2021

Table A 2. Control change table / Tabell over endringskontroll.

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](mailto:certest@certest.es) | [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es)

[www.certest.es](http://www.certest.es)

One step ahead



F-566 rev01