

**VIASURE**

Real Time PCR Detection Kit



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

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Poniższe instrukcje obsługi odnoszą się do następującego produktu:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / KOD
VIASURE <i>Vancomycin resistance</i> Real Time PCR Detection Kit	444202 / VS-VAN124

Table A 1. Reference for product to be used with the BD MAX™ System. / Kod produktu do stosowania w systemie BD MAX™ System.

## Content

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

## Zawartość

1.	Przeznaczenie.....	19
2.	Streszczenie i objaśnienia .....	19
3.	Zasada oznaczania .....	20
4.	Dostarczane odczynniki .....	20
5.	Odczynniki i sprzęt zapewniane przez użytkownika .....	21
6.	Warunki transportu i przechowywania.....	21
7.	Środki ostrożności dla użytkowników .....	21
8.	Procedura testowa .....	22
8.1.	Pobieranie, transport i przechowywanie próbek.....	22
8.2.	Przygotowanie próbki i ekstrakcja DNA .....	23
8.3.	Protokół PCR .....	23

---

9.	Interpretacja wyników .....	27
10.	Ograniczenia stosowania testu .....	29
11.	Kontrola jakości .....	30
12.	Charakterystyka wydajnościowa .....	30
12.1.	Czułość i swoistość kliniczna .....	30
12.2.	Czułość analityczna.....	31
12.3.	Swoistość analityczna.....	32
12.4.	Reaktywność analityczna .....	33
	Bibliography/Bibliografia .....	34
	Symbols for IVD components and reagents/ Symbole dla elementów i odczynników 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.

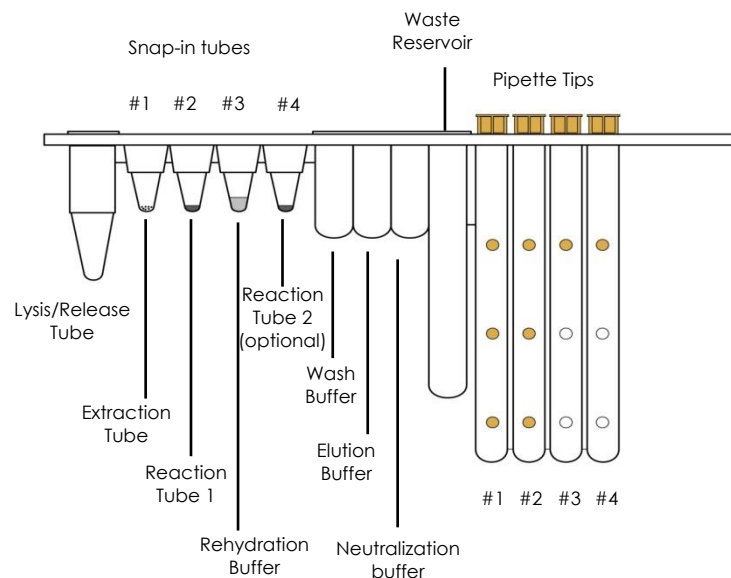
- 12) Click the "Save Test" button.

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

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

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

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

#### REPEAT TEST PROCEDURE

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

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

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

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

## 10. Limitations of the test

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

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

## 11. Quality control

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

## 12. Performance characteristics

### 12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	Clinical Microbiology, Centre for Infectious Diseases and Microbiology Laboratory services, NSW Health Pathology, Westmead Hospital (Sydney, Australia)	Rectal swab	BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System	VanA gene
				VanB gene
				VanA + VanB genes

Table 7. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity and specificity values for VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity
1	In-house PCR VRE (Westmead – WMD)	VanA	65	151	0	0	100% (93%-100%)	100% (96%-100%)
		VanB	36	179	1	0	100% (87% - 100%)	99% (96%-100%)
		VanA+VanB	17	199	0	0	100% (97% - 100%)	100%(97% -100%)

Table 8. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity and specificity for VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Results show high agreement to detect *vanA* and *vanB* genes using VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

In addition to this, the sample processing control failure rate was calculated. The initial number of unresolved reactions (UNR) was 3 (Initial UNR rate: 1.39%). The number of UNR after repetition was 0 (Final UNR rate: 0.00%).

In order to evaluate the compatibility of VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit adapted for BD MAX™ with other different matrix samples, an evaluation to verify the detection of vancomycin-resistant enterococci colonies suspensions was carried out.

Different colonies suspensions were prepared by adding two colonies of a determinate culture in 500 µl nuclease-free water. The strains used for this evaluation were CECT 5253 *Enterococcus faecium vanA*, CECT 8120 *Enterococcus faecalis vanB*, NCTC 12201 *Enterococcus faecalis vanA*, and NCTC 13632 *Enterococcus faecalis*

*vanA*. A volume of 10 µl of each colonies suspensions was added directly to the sample buffer tube. The flowchart used to carry out this evaluation was: BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System.

The obtained results showed that colonies suspensions of CECT 5253, NCTC 12220, and NCTC 13632 were positive for *vanA* gene and colonies suspension of CECT 8120 was positive for *vanB* gene.

These results show that VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit can properly detect *vanA* and *vanB* genes in colonies suspensions.

## 12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of  $\geq 4$  colony-forming unit per reaction (CFU/rxn) for *vanA* and  $\geq 10$  colony-forming unit per reaction (CFU/rxn) for *vanB* (Figures 2 and 3) with a positive rate of  $\geq 95\%$  on perianal and rectal swabs.

Figure 2. Dilution series of *vanA* gene ( $3.62 \times 10^4$ - $3.62$  CFU/rxn) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

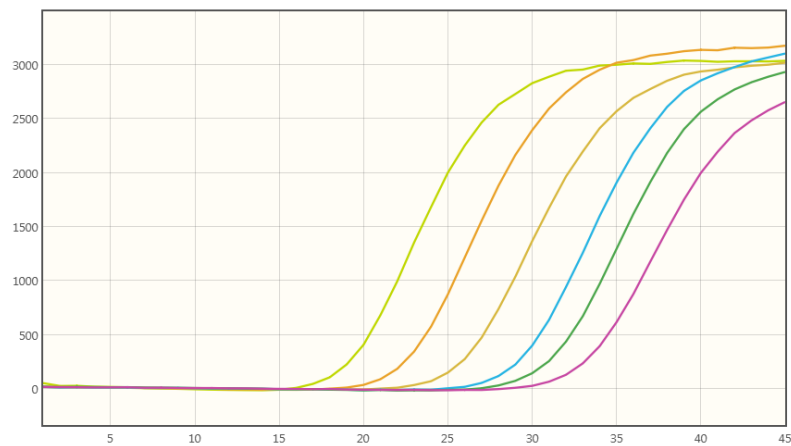
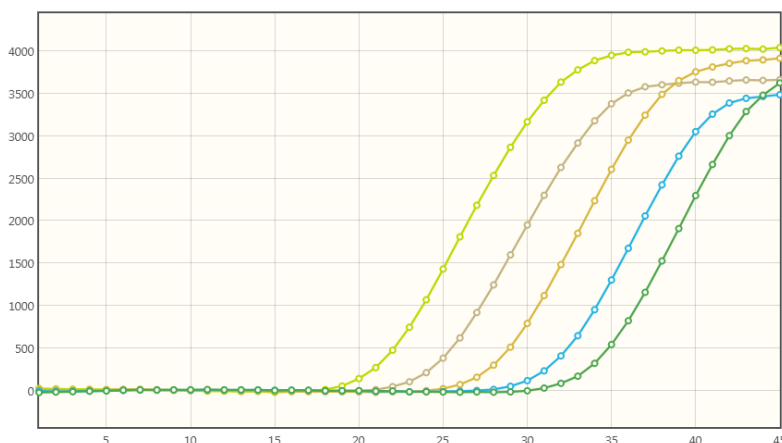


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene ( $5.65 \times 10^4$ - $9.98$  CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



## 12.3. Analytical specificity

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



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

Cross-reactivity testing					
Adenovirus serotypes 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL), and KPC-2 producing <i>Klebsiella pneumonia</i> isolate	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	VanC- type <i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	VanC2- type <i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	Norovirus GI and GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrovirus Genotype I-VIII	-	VanA-type <i>Enterococcus faecalis</i>	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	VanB-type <i>Enterococcus faecalis</i>	- / +	Rotavirus A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	VanA- type <i>Enterococcus faecium</i>	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	VanB- type <i>Enterococcus faecium</i>	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	VanB and VanC- types <i>Enterococcus gallinarum</i>	- / +	<i>Salmonella paratyphi</i> A	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	VanC – type <i>Enterococcus gallinarum</i>	-	<i>Salmonella paratyphi</i> B	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	VanC1- type <i>Enterococcus gallinarum</i>	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
VIM-1 producing <i>Citrobacter braakii</i> isolate	-	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-	Sapovirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
KPC-3 and VIM-4 producing <i>Citrobacter freundii</i> -complex isolate	-	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	-	OXA-48 producing <i>Serratia marcescens</i> isolate	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	OXA-244 producing <i>Escherichia coli</i> isolate	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	TEM-1 (non-ESBL) and IMP-1 producing <i>Escherichia coli</i> isolate	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (mecC)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) strain N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) strain (oxa <sup>R</sup> , PVL-positive, spa type t310)	-
SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) and OXA-48 producing <i>Enterobacter cloacae</i> isolate	-	<i>Helicobacter pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) and NDM-1 producing <i>Enterobacter cloacae</i> isolate	-	<i>Helicobacter pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
NDM-7 producing <i>Enterobacter cloacae</i> -complex isolate	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
VanA-type <i>Enterococcus avium</i>	+ / -	SHV-1 (non-ESBL), KPC-3, and OXA-48 producing <i>Klebsiella pneumonia</i> isolate	-		

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

## 12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit for *vanA* gene was evaluated against DNA extracted from *vanA*-type *Enterococcus avium*, *vanA*-type *Enterococcus faecalis* (NCTC 13632, NCTC 12201) and *vanA*- type *Enterococcus faecium* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202) strains, showing positives results.

The reactivity of VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit for *vanB* gene was evaluated against DNA extracted from *vanB*-type *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299, CECT 8120), *vanB*- type *Enterococcus faecium* (IOWA 2) and *vanB* and *vanC* *Enterococcus gallinarum* (ENT20120142) strains, showing positives results.

## POLSKI

### 1. Przeznaczenie

Zestaw do oznaczania PCR w czasie rzeczywistym VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit jest przeznaczony do swoistego wykrywania i różnicowania genów *vanA* i *vanB*, które mogą być związane z enterokokami opornymi na wankomycynę (VRE) bezpośrednio z wymazów okołoodbytowych i (lub) odbytniczych i kolonii. Ten test jest przeznaczony do wspomagania identyfikacji organizmów opornych na wankomycynę w połączeniu z klinicznymi objawami podmiotowymi i przedmiotowymi oraz epidemiologicznymi czynnikami ryzyka. Przy oznaczeniu wykorzystywany jest system BD MAX™ System do zautomatyzowanej ekstrakcji DNA, a następnie-PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem dostarczonych odczynników w połączeniu z uniwersalnymi odczynnikami i materiałami jednorazowymi przeznaczonymi do stosowania z systemem BD MAX™ System. DNA z z wymazów i kolonii okołoodbytowych i (lub) odbytniczych jest wykrywane przy użyciu sond z fluorescencyjnym barwnikiem reporterowym swoistych dla genów *vanA* i *vanB*.

### 2. Streszczenie i objaśnienia

Enterokoki to powszechnie występujące bakterie komensalne, wykrywane w przewodzie pokarmowym i narządach płciowych kobiet. W ostatnim czasie uznaje się je za patogeny oportunistyczne, wywołujące zakażenia szpitalne, takie jak zakażenie układu moczowego, zakażenia skóry, zakażenia układu oddechowego, zapalenie wsierdza oraz posocznicę u osób z upośledzeniem odporności.

Wankomycyna to antybiotyk glikopeptydowy, który hamuje syntezę ściany komórkowej. Jest wykorzystywany do leczenia ciężkich zakażeń bakteriami gram-dodatnimi. O wykryciu enterokoków opornych na wankomycynę (VRE) po raz pierwszy donoszono w Anglii i Francji w 1986 roku. Obecnie rozprzestrzeniły się do wszystkich szpitali na świecie.

Oporność na wankomycynę stanowi złożony proces i wymaga obecności różnych grup genów. Ogólnie można je podzielić na dwa typy w zależności od prekursorów pentapeptydowych wytwarzanych przez geny oporności na wankomycynę: prekursor zakończony D-alaniną-D-seryną (typ *VanC-*, *VanE-*, *VanG-*, *VanL-* i *VanN*) lub zakończony D-alaniną-D-mleczanem (typ *VanA-*, *VanB-*, *VanD-* i *VanM*). Te prekursory pentapeptydowe wykazywały niskie powinowactwo do glikopeptydów i powodowały u enterokoków oporność na wankomycynę.

Pierwszym typem oporności na wankomycynę u enterokoków jest oporność wewnątrzpochodna (tzn. Związana z genem *vanC*). Izolaty *Enterococcus gallinarum* i *E. casseliflavus/E. flavescens* wykazują stałą oporność na wankomycynę niskiego stopnia. Drugim typem jest oporność nabyta (tzn. geny *vanA* lub *vanB*). Enterokoki mogą stać się odporne, przyjmując mobilne elementy genetyczne (transpozony i plazmidy) od innych gatunków lub bakterii *Enterococcus*. Najczęściej tę oporność obserwuje się u *E. faecium* i *E. faecalis*, ale stwierdzono ją też u *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* i kilku innych gatunków enterokoków. Geny *vanA* i *vanB* odpowiadają za wysokie lub umiarkowane poziomy oporności na wankomycynę.

Przeniesienie enterokoków opornych na wankomycynę (VRE) może odbyć się przez bezpośredni kontakt z płynami ustrojowymi pacjentów skolonizowanych lub zakażonych (krew, drenaż z rany, mocz, kał, płwocina i inne) lub przez kontakt pośredni przez ręce pracowników służby zdrowia lub skażonych sprzęt medycznych lub powierzchnie środowiskowe.

Na początku zastosowano metody oparte na kulturach, co było czasochłonne i trwało na ogół 1–5 dni. Wykazano, że testy oparte na PCR w czasie rzeczywistym mogą stanowić narzędzie do wykrywania klinicznie znaczących genów związanych z opornością na wankomycynę.

### 3. Zasada oznaczania

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit jest przeznaczony do identyfikacji i różnicowania DNA z enterokoków opornych na wankomycynę i innych organizmów zawierającego geny oporności na wankomycynę *vanA* i *vanB*. Po izolacji DNA identyfikacji oporności na wankomycynę dokonuje się przez amplifikację konserwatywnego regionu genów *vanA* i *vanB* przy użyciu swoistych starterów i sond oznaczonych barwnikiem fluorescencyjnych.

Zasada działania zestawu ViASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit opiera się na aktywności egzonukleazy 5' polimerazy DNA. Podczas amplifikacji DNA ten enzym odrywa sondę powiązaną z komplementarną sekwencją DNA, oddzielając wygaszacz od barwnika reporterowego. Reakcja ta generuje wzrost sygnału fluorescencyjnego, który jest proporcjonalny do ilości docelowej matrycy. Ta fluorescencja jest mierzona za pomocą systemu BD MAX™ System.

Zestaw ViASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit zawiera w każdej probówce wszystkie elementy konieczne do oznaczenia PCR w czasie rzeczywistym (swoiste startery/sondy, dNTPS, bufor, polimeraza) w postaci stabilizowanej oraz kontrolę wewnętrzną do monitorowania procesu ekstrakcji i/lub hamowania aktywności polimerazy.

Element wykrywany	Kanał	Gen
Geny oporności na wankomycynę	475/520	<i>vanA</i>
Geny oporności na wankomycynę	585/630	<i>vanB</i>
Kontrola wewnętrzna (IC)	530/565	-

Tabela 10. Element wykrywany, kanał i geny

### 4. Dostarczane odczynniki

Zestaw ViASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit zawiera następujące materiały i odczynniki wymienione szczegółowo w Tabeli 2:

Odczynnik/materiał	Opis	Kod kreskowy	Ilość
<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube	Mieszanina enzymów, starterów, sond, buforów, dNTP, stabilizatorów oraz kontrola wewnętrznej w formacie stabilizowanym	1B folia	2 woreczki po 12 przezroczystych probówek
Rehydration Buffer tube	Roztwór do rekonstrukcji ustabilizowanego produktu	Folia 11	1 woreczek z 24 przezroczystymi probówkami

Tabela 11. Odczynniki i materiały dostarczane z zestawem ViASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit o numerze nrVS-VAN124 (444202).

## 5. Odczynniki i sprzęt zapewniane przez użytkownika

Poniżej wymieniono materiały i sprzęt, których użycie jest konieczne, ale które nie należą do zestawu VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Przyrząd do PCR w czasie rzeczywistym: System BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref: 442825 or 442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (nr ref.: 437519)
- Wirówka
- Mikropipety (dokładność w zakresie 2–1000 µl)
- Woda niezawierająca nukleazy.
- Końcówki z filtrem
- Bezpułdrowe rękawice jednorazowe.

## 6. Warunki transportu i przechowywania

- Zestawy można przysyłać i przechowywać w temperaturze 2–40°C do upływu terminu ważności podanego na etykiecie.
- Po otwarciu aluminiowych woreczków zawierających próbówki reakcyjne, można je zużyć w ciągu maksymalnie 28 dni.

## 7. Środki ostrożności dla użytkowników

- Ten produkt jest przeznaczony do stosowania wyłącznie przez profesjonalnych użytkowników, takich jak fachowi pracownicy laboratorium lub fachowy personel medyczny i technicy, przeszkoleni w zakresie technik biologii molekularnej.
- Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
- Nie należy używać przeterminowanych odczynników i (lub) materiałów.
- Nie używać zestawu, jeżeli etykieta zamykająca pudełko zewnętrzne została zerwana.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia się lub rozdarcia się pudełka ochronnego w chwili dostarczenia.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia się lub rozdarcia się woreczków ochronnych w chwili dostarczenia.
- Nie stosować odczynników, jeżeli środek osuszający nie jest obecny lub jest pęknięty wewnątrz woreczków odczynnika.
- Nie należy wyjmować środka osuszającego z woreczków z odczynnikami.
- Po każdym użyciu szybko zamknąć na zamek woreczki ochronne odczynników. Przed zamknięciem woreczków należy usunąć z nich nadmiar powietrza.
- Nie wolno używać odczynników, jeżeli folia została rozerwana lub uszkodzona.
- Nie wolno mieszać odczynników z różnych woreczków i (lub) zestawów i (lub) serii.
- Chronić odczynniki przed wilgocią. Przedłużająca się ekspozycja na wilgoć może wpływać na działanie produktu.
- Chronić elementy przed światłem.
- W razie przeprowadzania innych testów PCR w tej samej części laboratorium, należy zachować ostrożność, aby uniknąć skażenia zestawu VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, BD MAX™ ExK™

TNA-2 extraction kit, jakichkolwiek dodatkowych odczynników potrzebnych do przeprowadzania testów oraz systemu BD MAX™ System. Należy zawsze unikać skażenia odczynników drobnoustrojami oraz rybonukleazą (RNaza) / dezoksyrybonukleazą (DNaza). Zaleca się stosowanie jałowych, wolnych od RNazy / DNazy, jednorazowych końcówek do pipet, opornych na aerozole lub końcówek do pipet wyporowych. Do każdej próbki należy stosować nową końcówkę. Przed obchodzeniem się z odczynnikami i wkładami trzeba zmieniać rękawiczki.

- Aby uniknąć skażenia środowiska amplikonami, nie należy rozłamywać wkładu BD MAX™ PCR Cartridge po użyciu. Zamknięcia wkładu BD MAX™ PCR Cartridge mają na celu zapobieganie skażeniu.
- Należy zaplanować przebieg pracy w jednym kierunku. Przeprowadzanie testu należy zaczynać w miejscu wykonywania ekstrakcji, a następnie przechodzić do miejsca wykonywania amplifikacji i detekcji. Nie należy przenosić z powrotem próbek, sprzętu i odczynników do miejsca, w którym wykonywano wcześniejszy etap testu.
- Należy postępować zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej. Należy stosować odzież ochronną, jednorazowe rękawiczki, okulary i maseczkę. W obszarze roboczym nie wolno jeść, pić, palić tytoniu ani nakładać środków kosmetycznych. Po zakończeniu przeprowadzania testu należy umyć ręce.
- Próbkę traktować jako potencjalnie zakaźną i/lub stanowiącą zagrożenie biologiczne, podobnie jak wszelkie odczynniki i materiały, które były narażone na kontakt z próbkami. Należy obchodzić się z nimi zgodnie z krajowymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa. Podczas pobierania, przechowywania, transportu, obsługi i utylizacji próbek należy zachowywać konieczne środki ostrożności.
- Próbkę i odczynniki trzeba obsługiwać w obrębie komory laminarnej. Należy stosować środki ochrony indywidualnej (ŚOI) zgodne z aktualnie obowiązującymi wytycznymi dotyczącymi obsługi potencjalnie zakaźnych próbek. Odpady należy usuwać zgodnie z odpowiednimi przepisami miejscowymi i krajowymi.
- Zaleca się regularne odkażanie często używanego sprzętu, szczególnie mikropipet i powierzchni roboczych.
- Zgodnie z Dyrektywą KE Nr 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits nie wymagają Arkuszy Danych dotyczących Bezpieczeństwa (Safety Data Sheets) Materiału, ponieważ na podstawie deklaracji zostały zakwalifikowane jako produkty bezpieczne dla zdrowia i środowiska, jako niezawierające substancji ani mieszanin spełniających kryteria klasyfikacji substancji niebezpiecznych dostępnych w dyrektywie KE Nr 1272/2008 (CLP) lub występujących w stężeniach przekraczających wartości ustalone w wymienionych przepisach.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności i procedury opisano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™ System.

## 8. Procedura testowa

### 8.1. Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

Zestaw VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit testowano na wymazach okołodobytowych i (lub) odbytniczych, umieszczanych niezwłocznie na podłożu transportowym ESwab™ (płynny system do pobierania i transportu na bazie Amies) (Copan, Italy). VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit testowano też na zawiesinie kolonii. Inne rodzaje próbek muszą zostać zwalidowane przez użytkownika.

Pobieranie, przechowywanie i transport z próbek powinien odbywać się w warunkach zwalidowanych przez użytkownika. Ogólnie, w celu zapewnienia jakości testu, wymazy należy pobierać i oznaczać odpowiednio w czystym podłożu transportowym ESwab™ i przetwarzać niezwłocznie. Transport próbek musi powinien odbywać

się w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 24 godziny, zgodnie z lokalnymi i krajowymi przepisami dotyczącymi transportu materiałów patogennych. W przypadku długotrwałego transportu (ponad 24 godziny) zalecamy przesyłanie w temperaturze wynoszącej  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  lub niżej. Zaleca się używanie świeżych próbek do testu. Próbkę można przechowywać w temperaturze 25°C przez maksymalnie 24 godziny, w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 144 godziny (6 dni) lub zamrożone w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  przez maksymalnie 192 godziny (8 dni) lub idealnie  $-70^{\circ}\text{C}$  w celu ich konserwacji. Należy unikać cykli zamrażania i rozmrażania, aby zapobiegać degradacji próbki i kwasów nukleinowych.

Próbki kału trzeba pobierać, transportować i przechowywać zgodnie z odpowiednimi wytycznymi laboratoryjnymi. Szczegółowe informacje zawierają wytyczne CDC (Specimen collection guidelines (Wytyczne dotyczące pobierania próbek). Strona internetowa <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) oraz wytyczne 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 (Poradnik dotyczący wykorzystania laboratoriów mikrobiologicznych w rozpoznawaniu chorób zakaźnych: aktualizacja z 2018 roku wydana przez Stowarzyszenie Chorób Zakaźnych Ameryki oraz Amerykańskie Stowarzyszenie na rzecz Mikrobiologii). *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

## 8.2. Przygotowanie próbki i ekstrakcja DNA

Przygotować próbkę zgodnie z zalecaniami podanymi w instrukcji użytkownika zastosowanego zestawu do ekstrakcji, BD MAX™ ExK™ TNA-2. Należy pamiętać, że niektóre inne próbki mogą wymagać przetwarzania wstępnego. Procedury przygotowania ekstrakcji właściwe dla danej aplikacji powinny zostać opracowane i zweryfikowane przez użytkownika.

1. Copan ESwab™: Pobrać pipetą 200  $\mu\text{l}$  próbkę ESwab™ do probówki BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube i zamknąć probówkę nasadką z podkładką. Zapewnić całkowite wymieszanie poprzez wirowanie próbki przy wysokiej szybkości przez 1 minutę. Przejść do obsługi systemu BD MAX™ System Operation.
2. Kolonie: Pobrać dwie kolonie z podłoża kolonii i zawiesić je w 500  $\mu\text{l}$  wody niezawierającej nukleazy. Zapewnić całkowite wymieszanie przez wirowanie. Dodać 10  $\mu\text{l}$  zawiesiny do probówki BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube i zamknąć probówkę nasadką z podkładką. Zapewnić całkowite wymieszanie poprzez wirowanie próbki przy wysokiej szybkości przez 1 minutę. Przejść do obsługi systemu BD MAX™ System Operation.

## 8.3. Protokół PCR

Uwaga: Proszę zapoznać się ze szczegółowymi informacjami znajdującymi się w podręczniku dla użytkownika BD MAX™ System.

### 8.3.1. Tworzenie programu testu PCR dla zestawu VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

Uwaga: Jeśli użytkownik utworzył już test dla zestawu VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, można pominąć punkt 8.3.1 i przejść bezpośrednio do punktu 8.3.2.

- 1) Na ekranie „Run” (Cykl) systemu BD MAX™ System wybrać kartę „Test Editor” (Edytor testów).
- 2) Kliknąć przycisk „Create” (Utwórz).
- 3) Wpisać nazwę testu (tj. VIASURE *Vancomycin resistance*) w oknie „Test Name” (Nazwa testu) na karcie „Basic Information” (Podstawowe informacje).
- 4) W rozwijanym menu „Extraction Type” (Typ ekstrakcji) wybrać „ExK TNA-2”.
- 5) W rozwijanym menu „Master Mix Format” (Format mieszaniny wzorcowej) wybrać „Type 5”.
  - a. Uwaga: Produkt można stosować razem z dodatkowym testem VIASURE dla systemu BD MAX™. W takiej sytuacji należy wybrać „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Podwójna mieszanina wzorcowa skoncentrowana liofilizowana MM z buforem rehydratacji (typ 5)).
- 6) W „Sample extraction parameters” (Parametry ekstrakcji próbki) wybrać „User defined” (Definiowane przez użytkownika) i dopasować objętość próbki do 500 µl.
- 7) W „Ct Calculation” (Obliczenie Ct) wybrać „Call Ct at Threshold Crossing”.
- 8) W przypadku korzystania z oprogramowania w wersji 5.00 lub nowszej, w polu „Custom Barcodes” (Niestandardowe kody kreskowe) należy wybrać następującą konfigurację:
  - a. Snap-In 2 Barcode (Kod kreskowy próbki 3): 1B (dotyczy próbki reakcyjnej *Vancomycin resistance*).
  - b. Snap-In 3 Barcode (Kod kreskowy próbki 3): 11 (dotyczy próbki z buforem do rehydratacji Rehydration Buffer tube)-
  - c. Snap-In 4 Barcode (Kod kreskowy próbki 4): inna próbka VIASURE reaction tube (inna folia), jeżeli wybrano format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Podwójna stężona, liofilizowana mieszanina wzorcowa MM z buforem rehydratacyjnym (typ 5)) (punkt 8.3.1).
- 9) W zakładce „PCR settings”(Ustawienia PCR) wpisać następujące parametry: „Channel Settings” (Ustawienia kanału), „Gains” (Naddatek) oraz „Threshold” (Wartość progowa) (Tabela 3).
  - a. Uwaga: Produkt można stosować razem z dodatkowym testem VIASURE dla BD MAX™. W takiej sytuacji Ustawienia PCR i Etapy testu należy uzupełnić dla obu pozycji 2 (zielony) oraz 4 (niebieski).

Channel (Kanał)	Alias (Alias)	Gain (Wzmocnienie)	Threshold (Wartość progowa)	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

Tabela 12. PCR settings (Ustawienia PCR)

Uwaga: Zaleca się ustawianie dla każdego kanału minimalnych wartości progowych podanych powyżej jako punktu startowego, ale ostateczne ustawienia musi ustalić użytkownik końcowy w trakcie interpretacji wyników w celu upewnienia się, że wartości progowe przypadają w obrębie fazy eksponencjalnej krzywych fluorescencji i powyżej wszelkich sygnałów tła. Wartości progowe dla różnych instrumentów mogą być różne ze względu na różne intensywności sygnału.



- 10) Na karcie „PCR settings” (Ustawienia reakcji PCR) należy wpisać też następujące parametry „Spectral Cross Talk” (Przestuch widmowy) (tabela 4).

		False Receiving Channel (Falszywy kanał odbiorczy)				
Channel (Kanał)		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Kanał wzbudzenia)	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	-

Tabela 13. Parametry „Spectral cross-talk”

- 11) W zakładce „Test Steps” (Etapy testu) wpisać protokół PCR (Tabela 5)

Step Name (Nazwa etapu)	Profile Type (Typ profilu)	Cycles (Cykle)	Time (s) (Czas(y))	Temperature (Temperatura)	Detect (Wykrywanie)
Initial denaturation (Wstępna denaturacja)	Wstrzymanie	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturacja i hybrydyzacja/wydłużanie (gromadzenie danych))	2- Temperatura	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabela 14. Protokół PCR

- 12) Kliknąć przycisk „Save test” (Zapisz test).

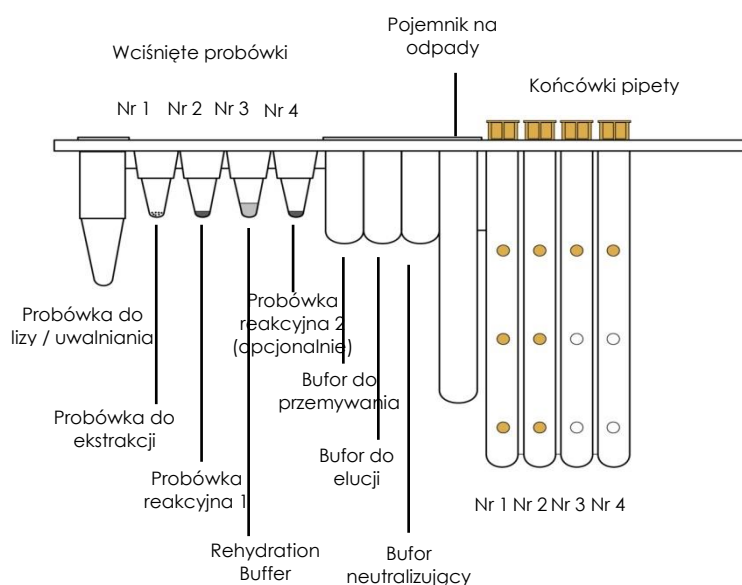
### 8.3.2. Ustawienie statywu BD MAX™

- Dla każdej próbki, która ma być poddana testowi należy wyjąć jeden Unitized Reagent Strips (indywidualny pasek odczynnikowy) z zestawu BD MAX™ ExK TNA-2 kit. Delikatnie stuknąć każdym paskiem o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że wszystkie płyny znajdują się na dnie probówek i załadować na statyw na próbki systemu BD MAX™ System.
- Wyjąć potrzebną liczbę probówek do ekstrakcji BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (biała folia) z saszetki ochronnej. Wcisnąć probówkę (próbówki) do ekstrakcji w odpowiadające jej (im) miejsca w pasku TNA (Pozycja 1, biały kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
- Określić i oddzielić odpowiednią liczbę probówek reakcyjnych oporność na wankomycynę (folia 1B) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (pozycja 2, zielony kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.)
  - Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.
  - Aby prawidłowo przeprowadzić rehydratację, należy upewnić się, że liofilizowany produkt znajduje się na spodzie probówki i nie przylega do górnej powierzchni probówki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą probówką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że produkt znajduje się na spodzie probówki.
    - Uwaga: Jeśli użytkownik wybrał format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Podwójna mieszanina wzorcowa skoncentrowana liofilizowana MM z buforem rehydratacji (typ 5)) (Punkt 8.3.1), należy określić i oddzielić

odpowiednią liczbę dodatkowych probówek reakcyjnych VIASURE (inna folia) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca w pasku (pozycja 4, niebieski kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.

- 4) Wyjąć potrzebną liczbę probówek Rehydration Buffer tube (folia 11) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (Pozycja 3, brak koloru kodowego na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
  - a. Aby zapewnić prawidłowy transfer, należy upewnić się, że płyn znajduje się na spodzie probówki i nie przylega do górnej powierzchni probówki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą probówką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że bufor znajduje się na spodzie probówki.

Rysunek 1. Pasek odczynnikowy BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) z zestawu BD MAX™ ExK™ TNA-2 kit.



### 8.3.3. Ustawienie przyrządu BD MAX™

- 1) Wybrać kartę „Work list” (Lista robocza) na ekranie „Run” (Cykl) oprogramowania systemu BD MAX™ System w.4.50A lub wyższej.
- 2) W rozwijanym menu „Test” wybrać VIASURE Vancomycin resistance (jeśli jeszcze nie utworzono, patrz Punkt 8.3.1).
- 3) Wybrać odpowiedni numer serii zestawu (można go znaleźć na zewnętrznym pudełku używanego zestawu do ekstrakcji) z rozwijanego menu (opcjonalnie).
- 4) Wpisać numer identyfikacyjny Sample Buffer Tube (próbówki z buforem próbki) do okna „Sample tube” (Probówka z próbką) w ramach „Worklist” (Listy roboczej), skanując kod paskowy skanerem lub wpisując ręcznie.
- 5) Wpisać identyfikator próbki lub pacjenta i (lub) okno „Accession” w ramach „Worklist” (Listy roboczej) i kliknąć przycisk „Save” (Zapisz). Kontynuować aż do wpisania wszystkich Sample Buffer Tubes (próbek z buforem próbki). Upewnić się, że identyfikator próbki lub pacjenta oraz Sample Buffer Tubes (próbówki z buforem próbki) zostały dokładnie dopasowane.
- 6) Umieścić przygotowaną Sample Buffer Tube (próbówkę z buforem próbki) w statywie (statywach) BD MAX™ Rack(s).

- 7) Załadować statyw (statywy) do systemu BD MAX™ System (statyw A po lewej stronie systemu BD MAX™ System, a statyw B – po prawej).
- 8) Włożyć potrzebną liczbę wkładów BD MAX™ PCR Cartridge(s) do systemu BD MAX™ System.
- 9) Zamknąć drzwiczki systemu BD MAX™ System.
- 10) Kliknąć „Start Run” (Rozpocznij cykl), aby rozpocząć procedurę.

### 8.3.4. Raport BD MAX™

- 1) W menu głównym kliknąć przycisk „Results” (Wyniki).
- 2) Kliknąć dwukrotnie na swoim cyklu na liście lub wcisnąć przycisk „View” (Wyświetl).
- 3) Kliknąć „Print” (Drukuj), wybrać: „Run Details, Test Details and Plot...” (Szczegóły Cyklu, Szczegóły Testu i wykres...)
- 4) Kliknąć „Print or Export button” (Przycisk drukowania lub eksportu) na ekranie „Run Reports” (Raporty cyklu)

## 9. Interpretacja wyników

Szczegółowe informacje na temat analizowania danych podano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™ System.

Analiza danych jest przeprowadzana przez oprogramowanie BD MAX™ zgodnie z instrukcjami producenta. Oprogramowanie BD MAX™ zgłasza wartości Ct i krzywe amplifikacji dla każdego kanału detektora dla każdej badanej próbki w następujący sposób:

- wartość Ct wynosząca 0 wskazuje, że nie została przez oprogramowanie obliczona wartość Ct przy określonym progu (patrz Tabela 3). Krzywą amplifikacji dla próbki wykazującej wartość Ct „0” musi zostać sprawdzona ręcznie.
- Wartość Ct wynosząca -1 wskazuje, że nie nastąpił proces amplifikacji.
- Każdą inną wartość Ct należy zinterpretować w korelacji z krzywą amplifikacji i zgodnie z wytycznymi interpretacji próbki streszczonymi w Tabeli 6.

Należy sprawdzić sygnał kontroli wewnętrznej, aby sprawdzić, czy mieszanina do amplifikacji działa prawidłowo. Dodatkowo należy sprawdzić, czy nie ma raportu o awarii systemu BD MAX™ System.

-Wyniki należy odczytywać i analizować za pomocą poniższej tabeli:

Gen <i>vanA</i> (475/520)	Gen <i>vanB</i> (585/630)	Kontrola wewnętrzna (530/565)	Interpretacja
+	+	+/- <sup>1</sup>	Wykryto DNA genów <i>vanA</i> i <i>vanB</i> <sup>1</sup>
+	-	+/- <sup>1</sup>	Wykryto DNA genu <i>vanA</i> , nie wykryto DNA genu <i>vanB</i> <sup>1</sup>
-	+	+/- <sup>1</sup>	Wykryto DNA genu <i>vanB</i> , nie wykryto DNA genu <i>vanA</i> <sup>1</sup>
-	-	+ <sup>2</sup>	Nie wykryto DNA genów <i>vanA</i> i <i>vanB</i> <sup>2</sup>
-	-	- <sup>2</sup>	Wynik nierozstrzygający (UNR, ang. Unresolved) uzyskany w obecności inhibitorów w reakcji PCR lub w razie wystąpienia błędu ogólnego (niezgłaszanego z kodem błędu) w trakcie przetwarzania próbki i/lub amplifikacji. <sup>2</sup>
IND	IND	IND	Nieokreślony wynik oznaczenia (IND, ang. Indeterminate). Spowodowany awarią systemu BD MAX™ System. Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku powiązanej z kodem błędu awarii urządzenia.
INC	INC	INC	Niepełny wynik oznaczenia (INC, ang. Incomplete). Spowodowany awarią systemu BD MAX™ System. Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku nieprzeprowadzenia pełnej serii oznaczeń.

Tabela 15. Interpretacja próbki.

+: Amplifikacja wystąpiła

-: Amplifikacja nie wystąpiła

**1** Uznaje się, że próbka dała wynik dodatni, jeśli uzyskana wartość Ct jest mniejsza niż 40. Kontrola wewnętrzna (IC) może wykazywać sygnał amplifikacji lub go nie wykazywać. Czasami wykrywanie kontroli wewnętrznej (IC) nie jest konieczne ponieważ wysoka liczba kopii sekwencji docelowej może spowodować preferencyjną amplifikację kwasów nukleinowych swoistych dla sekwencji docelowej.

**2** Uznaje się, że próbka dała wynik ujemny, jeśli próbka nie wykazuje sygnału amplifikacji w systemie detekcji, ale kontrola wewnętrzna jest dodatnia (wartość Ct jest mniejsza niż 40). Hamowanie reakcji PCR można wykluczyć za pomocą amplifikacji kontroli wewnętrznej. W przypadku wyników nierozstrzygających (UNR), braku sygnału kontroli wewnętrznej w próbce, która dała wynik ujemny, zalecamy powtórzenie próby według podanych poniżej wskazań.

## POWTÓRZENIE PROCEDURY TESTOWANIA

W przypadku ponownego uzyskania dwuznacznego wyniku zaleca się ponownie zapoznać się z instrukcją użycia i przeanalizować proces izolacji stosowany przez użytkownika w celu zweryfikowania prawidłowości wykonywania każdego etapu reakcji qPCR oraz sprawdzenia parametrów. Należy również sprawdzić, czy uzyskano esowaty kształt krzywej oraz natężenie fluorescencji.

**UWAGA:** W próbówce z buforem próbki jest dostępna wystarczająca objętość do jednego powtórzenia testu. W przypadku przygotowanych próbek z buforem próbki BD MaX™ przechowywanych w temperaturze 2–8°C lub 25°C ponowny test należy przeprowadzić w ciągu 24 godzin.

**UWAGA:** Nowe próbki można testować w tym samym cyklu z próbkami, których test się powtarza.

Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych oraz innych testów diagnostycznych.

## 10. Ograniczenia stosowania testu

- Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych oraz innych testów diagnostycznych.
- Choć ten test można stosować przy innych rodzajach próbek, zweryfikowano go w odniesieniu do wymazów okołoodbytowych i (lub) odbytniczych pobranych przy pomocy podłoża transportowego ESwab™ i zawiesiny kolonii.
- Aby zapewnić dobrą wydajność testu, liofilizowany produkt powinien znajdować się na spodzie próbki, a nie przylegać do górnej powierzchni próbki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że produkt znajduje się na spodzie próbki.
- Na ogół występujący na spodzie próbki inny od standardowego wygląd mieszaniny reakcyjnej w formie stabilnej (bez kształtu stożkowego, niejednorodny, mniejszy/większy i/lub w kolorze innym od białego) nie ma wpływu na funkcjonalność testu.
- Jakość testu zależy od jakości próbki; konieczne jest wyekstrahowanie właściwego kwasu nukleinowego z wymazów i kolonii okołoodbytowych i (lub) odbytniczych.
- Jest to test jakościowy i nie zapewnia on wartości ilościowych ani nie wskazuje liczby obecnych drobnoustrojów.
- Możliwe jest wykrycie niezwykle niskich poziomów sekwencji docelowych poniżej granicy wykrywania, ale wyniki mogą nie być powtarzalne.
- Istnieje możliwość uzyskania fałszywie dodatnich wyników z powodu skażenia krzyżowego przez próbkę podejrzenie o oporność na wankomycynę zawierające wysokie stężenia docelowej sekwencji DNA lub skażenia spowodowanego produktami PCR z poprzednich reakcji.
- Wyniki fałszywie ujemne mogą wynikać z kilku czynników oraz ich kombinacji, w tym z powodu:
  - nieprawidłowego pobierania, transportu, przechowywania i/lub metod przechowywania próbek.
  - nieprawidłowych procedur przetwarzania (w tym izolacji DNA).
  - Degradacja DNA podczas transportu/przechowywania i/lub przetwarzania próbki.
  - mutacji lub polimorfizmów w regionach wiązania startera lub sondy, które mogą wpływać na wykrywanie nowych lub nieznanymi wariantów genów *vanA* i (lub) *vanB*.
  - Ilości organizmu opornego na wankomycynę w próbce poniżej granicy wykrywania testu.
  - obecności inhibitorów reakcji qPCR albo innych typów substancji interferujących.
  - nieprzestrzegania instrukcji użycia i procedury przeprowadzania testu.
- Ujemny sygnał kontroli wewnętrznej (IC) nie wyklucza obecności DNA genu *vanA* i (lub) *vanB* w próbce klinicznej.
- Wynik dodatni testu nie musi koniecznie oznaczać obecności żywych organizmów opornych na wankomycynę i nie sugeruje, że te wirusy są zakaźne czy też są przyczyną objawów klinicznych. Jednakże wynik dodatni wskazuje na obecność docelowych sekwencji oporności na wankomycynę.
- Wyniki ujemne nie wykluczają zakażenia bakteriami opornymi na wankomycynę i nie należy ich używać jako jedynej podstawy podejmowania decyzji dotyczących leczenia lub innego postępowania z pacjentem.
- W przypadku uzyskania wyników nierozstrzygujących, nieokreślonych lub niepełnych przy użyciu zestawu VIASURE *Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit* konieczne będzie powtórzenie testu. Wyniki nierozstrzygujące mogą być skutkiem obecności inhibitorów w próbce lub niewłaściwej rehydratacji w próbce z liofilizowaną mieszaniną reakcyjną. W razie awarii urządzenia uzyskuje się wyniki nieokreślone lub niepełne.

## 11. Kontrola jakości

Zestaw VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit zawiera kontrolę wewnętrzną (IC) w każdej próbce reakcyjnej, potwierdzającą prawidłowe zastosowanie techniki.

## 12. Charakterystyka wydajnościowa

### 12.1. Czulość i swoistość kliniczna

Wydajność kliniczna zestawu VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit badano przy użyciu próbek kliniczne (wymazy z odbytu) od pacjentów z podejrzeniem zakażenia VRE. Uzyskano następujące wyniki:

	Ośrodek	Rodzaj próbki	Przebieg działań	Element wykrywany
1	Mikrobiologia Kliniczna, Centrum Chorób Zakaźnych i świadczeń laboratorium mikrobiologicznego, Patologia NSW Health, szpital Westmead (Sydney, Australia)	Wymaz z odbytnicy	BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System	Gen <i>VanA</i>
				Gen <i>VanB</i>
				Geny <i>VanA</i> + <i>VanB</i>

Tabela 16. Ośrodek, rodzaj próbki, przebieg pracy i cel

Wartości prawdziwie dodatnie i ujemne, wartości fałszywie dodatnie i ujemne, wartości czulości i swoistości dla zestawu VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit obliczono w odniesieniu do każdej analizy porównawczej w sposób przedstawiony w poniższych tabelach:

Ośrodek	Test porównawczy	Element wykrywany	TP	TN	FP	FN	Czulość	Swoistość
1	PCR pod kątem VRE przeprowadzane w oddziale (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%)

Tabela 17. Wartości prawdziwie dodatnie (TP) i ujemne (TN), wyniki fałszywie dodatnie (FP), wyniki fałszywie (FN) ujemne czulości oraz swoistość VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Te wyniki wykazują wysoką zgodność w zakresie wykrywania genów *vanA* i *vanB* przy użyciu zestawu VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Dodatkowo obliczono wskaźnik niepowodzeń kontroli przetwarzania próbki. Początkowa liczba reakcji z wynikiem nierozstrzygujących (UNR) wyniosła 3 (wstępny wskaźnik UNR: 1.39%). Liczba UNR po powtórzeniu wynosiła 0 (Końcowy wskaźnik UNR): 0.00%).

Aby ocenić zgodność zestawu VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit zaadaptowanego do BD MAX™ z innymi próbkami macierzy, przeprowadzono ocenę w celu zweryfikowania wykrywania zawiesin kolonii enterokoków opornych na wankomycynę.

Przygotowano zawiesiny różnych kolonii, dodając dwie kolonie określonej kultury w 500 µl wody niezawierającej nukleazy. Szczepami wykorzystywanymi do tej oceny były szczepy CECT 5253 *Enterococcus faecium vanA*, CECT 8120 *Enterococcus faecalis vanB*, NCTC 12201 *Enterococcus faecalis vanA* oraz NCTC 13632 *Enterococcus faecalis vanA*. Objętość 10 µl każdej zawiesiny kolonii dodano bezpośrednio do próbkówki z buforem próbki. Schemat postępowania stosowany przy tej ocenie: BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System.

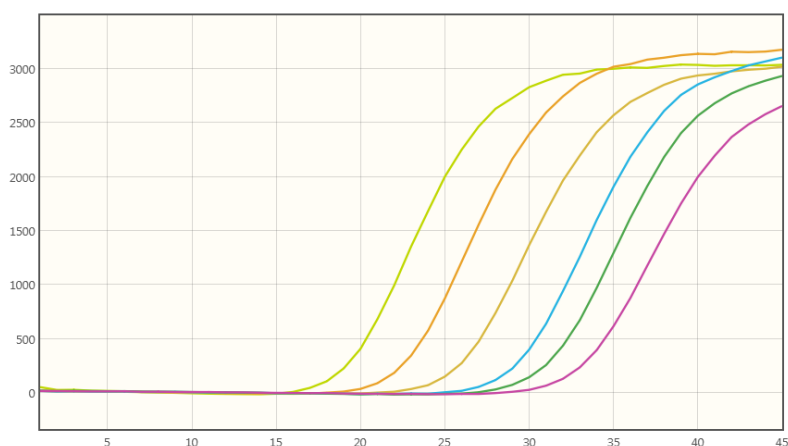
Uzyskane wyniki wykazały, że zawiesiny kolonii CECT 5253, NCTC 12220 i NCTC 13632 dały wynik dodatni oznaczenia genu *vanA*, a zawiesina kolonii CECT 8120 dała wynik dodatni oznaczenia genu *vanB*.

Wyniki te wykazały, że zestaw VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit może prawidłowo wykrywać geny *vanA* i *vanB* w zawiesinach kolonii.

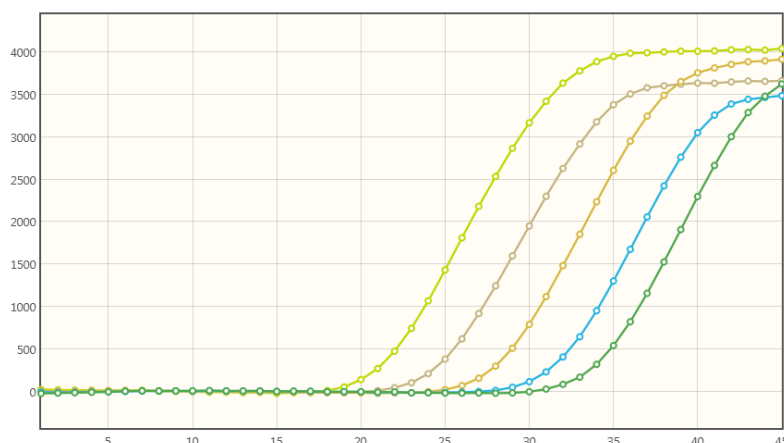
## 12.2. Czulość analityczna

Zestaw VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit wykazywał granicę wykrywania  $\geq 4$  jednostki tworzące kolonię na reakcję (CFU/rxn) dla genu *vanA* oraz  $\geq 10$  jednostek tworzących kolonie na reakcję (CFU/rxn) dla genu *vanB* (Rysunek 2 i 3) ze wskaźnikiem wyników dodatnich wynoszącym  $\geq 95\%$  w odniesieniu do wymazów okołodobytowych i odbytничych.

Rysunek 2. Rozcieńczenia seryjne dla cyklu matrycy genu *vanA* ( $3,62 \cdot 10^4$ - $3,62$  CFU/reakcję) na systemie BD MAX™ System (kanal 475/520 (FAM)).



Rysunek 3. Rozcieńczenia seryjne dla cyklu matrycy genu *vanB* ( $5,65 \cdot 10^4$ - $9,98$  CFU/reakcję) na systemie BD MAX™ (kanał 585/630 (ROX)).



### 12.3. Swoistość analityczna

Swoistość testu oporności na wankomycynę potwierdzono, testując panel składający się z różnych organizmów opornych na antybiotyki i różnych mikroorganizmów reprezentujących większość powszechnie występujących patogenów lub flory obecnej w jelicie. Nie wykryto reaktywności krzyżowej w odniesieniu do żadnego z następujących przebadanych mikroorganizmów, z wyjątkiem docelowych patogenów każdego oznaczenia:

Badania reaktywności krzyżowej					
Adenowirusy serotypów 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), oraz wytwarzające KPC-2 izolaty <i>Klebsiella pneumonia</i>	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> typu VanC	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> typu VanC2	-	Norowirus GI i GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrowirus Genotyp I-VIII	-	<i>Enterococcus faecalis</i> typu VanA	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> typu VanB	- / +	Rotawirus A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> typu VanA	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> typu VanB	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> typu VanB i VanC	- / +	<i>Salmonella paratyphi</i> A	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> typu VanC	-	<i>Salmonella paratyphi</i> B	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> typu 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> powodujący krwawienia z przewodu pokarmowego	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Izolat wytwarzający <i>Citrobacter braakii</i> VIM-1	-	Enteroinwazyjny <i>Escherichia coli</i>	-	Sapowirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Enteropatogenne <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Izolat złożony <i>Citrobacter freundii</i> wytwarzający KPC-3 i VIM-4	-	Enterotoksyczny <i>Escherichia coli</i>	-	Izolat <i>Serratia marcescens</i> wytwarzający OXA-48	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	Izolat <i>Escherichia coli</i> wytwarzający OXA-244	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	Izolat <i>Escherichia coli</i> wytwarzający TEM-1 (nie-ESBL) i IMP-1	-	<i>Shigella flexneri</i>	-



<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> oporny na metycylinę (mecC)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> oporny na metycylinę (MRSA) szczep N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> oporny na metycylinę (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> oporny na metycylinę (MRSA) szczep (oxa <sup>R</sup> , pozytywny wobec PVL, spa typ t310)	-
Izolat <i>Enterobacter cloacae</i> wytwarzający SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) i OXA-48	-	<i>Helicobacter pylori</i> oporny na klarytromycynę (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
Izolat <i>Enterobacter cloacae</i> wytwarzający TEM-1 (nie ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) i NDM-1	-	<i>Helicobacter pylori</i> oporny na klarytromycynę (23S rDNA A2146G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Izolat kompleksu <i>Enterobacter cloacae</i> wytwarzający NDM-7	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Enterococcus avium</i> typu VanA	+ / -	Izolat <i>Klebsiella pneumoniae</i> wytwarzający SHV-1 (nie-ESBL), KPC-3 i OXA-48	-		

Tabela 18. Referencyjne patogenne mikroorganizmy używane w tym badaniu.

## 12.4. Reaktywność analityczna











Reaktywność zestawu ViASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit wobec genu *van A* oceniano wg DNA ewykstrahowanego z *Enterococcus avium* typu *vanA*, *Enterococcus faecalis* (NCTC 13632, NCTC 12201) typu *vanA* oraz typu *vanA* *Enterococcus faecium* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202) szczepów, wykazują pozytywne rezultaty.

Reaktywność zestawu VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit wobec genu *vanB* wykstrahowanego z *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299, CECT 8120) typu *vanB*, *Enterococcus faecium* (IOWA 2) typu *vanB* oraz *vanB* i *vanC* szczepów *Enterococcus gallinarum* (ENT20120142), wykazują pozytywne rezultaty.

## 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/ Symbole dla elementów i odczynników IVD

 <b>IVD</b>	<i>In vitro</i> diagnostic device Urządzenie do diagnostyki w warunkach <i>in vitro</i>	 Keep dry Przechowywać w suchym miejscu	 Use by Użyć przed	 Manufacturer Producent	 <b>LOT</b> Batch code Kod serii
 <b>i</b>	Consult instructions for use Zapoznać się z instrukcją obsługi.	 Temperature limitation Ograniczenie temperatury	 Contains sufficient for <n> test Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów	 <b>UDI</b> Unique Device Identification Niepowtarzalny identyfikator wyrobu	 <b>REF</b> Catalogue number Numer katalogowy

## 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 / Kontrola zmian</b>		
<b>Version No. / Wersja nr</b>	<b>Changes / Zmiany</b>	<b>Date / Data</b>
00	Unification of all instructions for use associated with the different catalogue references in a single format / Unifikacja wszystkich instrukcji użytkowania związana z różnymi numerami katalogowymi wyrobów w pojedynczym formacie.	21/06/2021

Table A 2. Control change table / Tabela kontroli zmian.

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

