

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Vancomycin resistance
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Estas instruções de utilização aplicam-se à seguinte referência:

PRODUCT / PRODUTO	REFERENCE / REFERÊNCIA
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. / Referência para produto a ser utilizado com o sistema BD MAX™.

Content

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

Conteúdo

1.	Utilização prevista	19
2.	Introdução e explicação	19
3.	Procedimento.....	20
4.	Reagentes fornecidos	20
5.	Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos.....	21
6.	Condições de transporte e armazenamento.....	21
7.	Precauções para o utilizador.....	21
8.	Procedimento do teste	22
8.1.	Colheita, armazenamento e transporte de amostras	22
8.2.	Preparação da amostra e extração de DNA	23
8.3.	Protocolo PCR	23

9.	Interpretação dos resultados.....	27
10.	Limitações do teste.....	29
11.	Controlo de qualidade	30
12.	Características do teste	30
12.1.	Sensibilidade e especificidade clínica	30
12.2.	Sensibilidade analítica.....	31
12.3.	Especificidade analítica.....	32
12.4.	Reactividade analítica.....	33
	Bibliography/Bibliografia	34
	Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos para componentes IVD e reagentes	34
	Trademarks.....	34

ENGLISH

1. Intended use

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

2. Summary and Explanation

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

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

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

The first type of vancomycin resistance in enterococci is intrinsic resistance (i.e. associated with *vanC* gene). Isolates of *Enterococcus gallinarum* and *E. casseliflavus/E. flavescens* demonstrate an inherent, low-level resistance to vancomycin. The second type is acquired resistance (i.e. *vanA* or *vanB* genes) and enterococci can become resistant by acquisition of mobile genetic elements (transposons and plasmids) from another *Enterococcus* species or organism. Most commonly, this resistance is seen in *E. faecium* and *E. faecalis*, but also has been recognized in *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans*, and several other enterococcal species. *vanA* and *vanB* genes are responsible for high or moderate levels of vancomycin resistance.

Transmission of vancomycin-resistant enterococci (VRE) can occur through direct contact with body fluids from colonized or infected patients (blood, wound drainage, urine, stool, septum and other) or through indirect contact via the hands of health-care workers, or via contaminated patient care equipment or environmental surfaces.

At first, the screening method applied was culture-based, which is time-consuming and takes generally from one to five days to complete. Real-time PCR assays have been shown to be a tool for the detection of clinically relevant genes associated with vancomycin-resistance.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit is designed for the identification and differentiation of DNA from vancomycin-resistant enterococci and other organisms carrying the vancomycin resistance genes *vanA* and *vanB*. After DNA isolation, the identification of vancomycin resistance is performed by the amplification of a conserved region of the *vanA* and *vanB* genes, using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence is measured on the BD MAX™ System.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contains in each tube all the components necessary for a real-time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor the extraction process and/or inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
Vancomycin resistance genes	475/520	<i>vanA</i>
Vancomycin resistance genes	585/630	<i>vanB</i>
Internal control (IC)	530/565	-

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 2:

Reagent/Material	Description	Barcode	Amount
<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	1B foil	2 pouches of 12 transparent tubes
Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	11 foil	1 pouch of 24 transparent tubes

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit with Cat. N°.VS-VAN124 (444202).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials and equipment that are required for use but not included in the VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref: 442825 or 442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).

- Nuclease-free water.
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- After opening the aluminum pouches which contain the reaction tubes can be used up to 28 days.

7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit, any additional reagents required for testing, and the BD MAX™ System are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges.
- To avoid contamination of the environment by amplicons, do not break apart the BD MAX™ PCR Cartridge after use. The seals of the BD MAX™ PCR Cartridge are designed to prevent contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national

safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.

- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP) or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. Sample collection, transport and storage

The VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit has been tested on perianal and/or rectal swabs immediately placed in ESwab™ transport medium (liquid Amies based collection and transport system) (Copan, Italy). The VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit has also been tested on colony suspension. Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, perianal and/or rectal swabs should be collected and labelled appropriately in clean ESwab™ transport medium and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 2 to 8°C for up to 24 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 24 hours), we recommend shipping at $\leq -20^{\circ}\text{C}$ or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 25°C for up to 24 hours, 2 to 8°C for up to 144 hours (6 days), frozen at -20°C for up to 192 hours (8 days) or ideally at -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The faecal specimens must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the CDC guideline (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) and the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

8.2. Sample preparation and DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations in the instructions for use of extraction kit used, BD MAX™ ExK™ TNA-2. Note that some other samples may require pre-processing. Application-specific extraction preparation procedures should be developed and validated by the user.

1. Copan ESwab™: Pipette 200 µL of the ESwab™ sample into a BD MAX™ TNA-2 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.
2. Colonies: Pick up two colonies from the cultured medium and suspend them into 500 µL nuclease free water. Ensure complete mixing by vortexing. Add 10 µL of the suspension into a BD MAX™ TNA-2 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

8.3. PCR protocol

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

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

Note: If you have already created the test for the VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, you can skip step 8.3.1 and go directly to 8.3.2.

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the Basic Information tab, within the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE Vancomycin resistance.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-2".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5".
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX™ test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to 500 µL.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) If running software version 5.00 or higher, in the "Custom Barcodes" select the following configuration:
 - a. Snap-In 2 Barcode: 1B (concerning Vancomycin resistance reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube)
 - c. Snap-In 4 Barcode: another VIASURE reaction tube (different foil) if you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1).

- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 3).

- a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX™ test, "PCR Settings" and "Test Steps" should be completed for Snap-In 2 (green) and Snap-In 4 (blue) positions.

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

Table 3. PCR settings.

Note: It is recommended to set the minimum threshold values listed above for each channel as a starting point, but the final settings must be determined by the end-user during the result interpretation in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

- 10) In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 4), as well.

		False Receiving Channel				
		Channel	475/520	530/565	585/630	630/665
Excitation Channel	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

- 11) In "Test Steps" tab, enter the PCR protocol (Table 5).

Step Name	Profile Type	Cycles	Time (s)	Temperature	Detect
Initial denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection)	2-Temperature	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Table 5. PCR protocol.

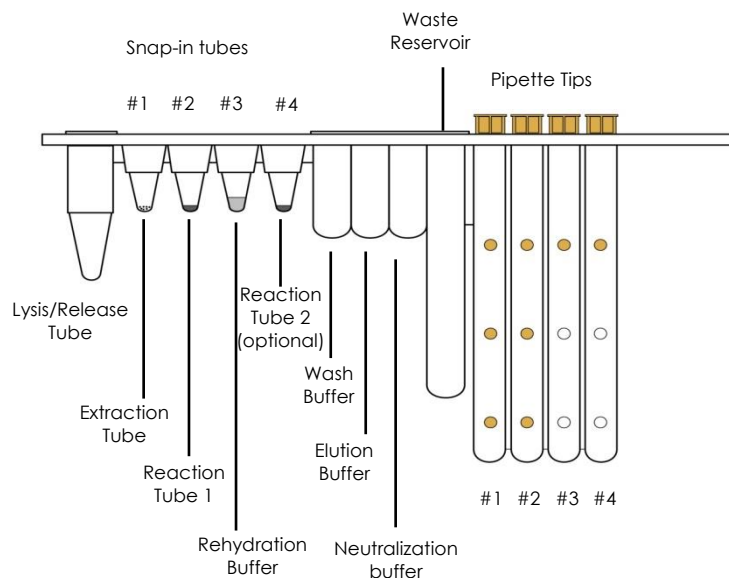
- 12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK TNA-2 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip

- (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.
- 3) Determine and separate the appropriate number of *Vancomycin resistance* reaction tubes (1B foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
 - a. Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - b. In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
 - i. Note: If you choose the format “Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (1I foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air and close the pouch with the zip seal.
 - a. In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the buffer is at the bottom of the tube.

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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

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

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

8.3.4. BD MAX™ report

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

9. Result interpretation

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

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

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

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

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

vanA gene (475/520)	vanB gene (585/630)	Internal control (530/565)	Interpretation
+	+	+/- ¹	vanA and vanB genes DNA Detected¹
+	-	+/- ¹	vanA gene DNA Detected, vanB gene DNA Not Detected¹
-	+	+/- ¹	vanB gene DNA Detected, vanA gene DNA Not Detected¹
-	-	+ ²	vanA and vanB genes DNA Not Detected²
-	-	- ²	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs.²
IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

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

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

REPEAT TEST PROCEDURE

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

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

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

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

10. Limitations of the test

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

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

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12.2. Analytical sensitivity

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

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

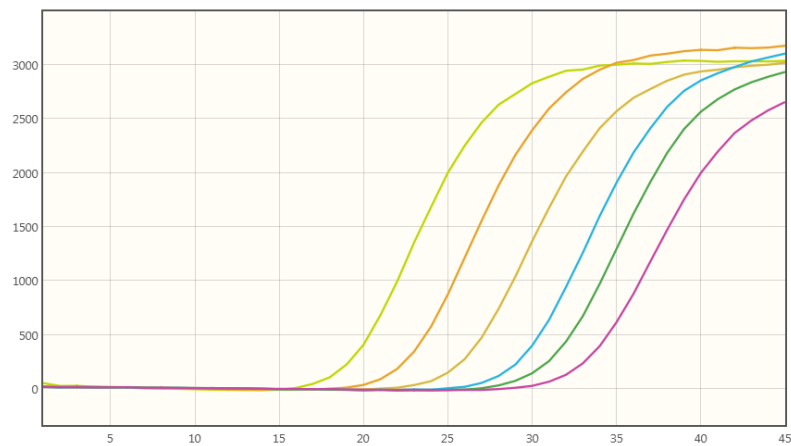
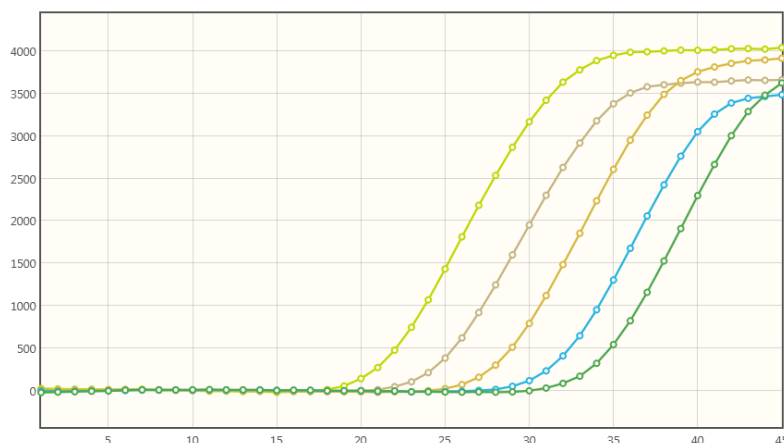


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene (5.65×10^4 - 9.98 CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



12.3. Analytical specificity

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

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

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

PORTUGUÊS

1. Utilização prevista

O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit foi concebido para a deteção e diferenciação específicas dos genes *vanA* e *vanB* que podem estar associados a enterococos resistentes a vancomicina (ERV) diretamente a partir de esfregaços perianais e/ou retais e colónias. Este teste destina-se a ser utilizado como um auxiliar na identificação de organismos resistentes à vancomicina em combinação com os sinais e sintomas clínicos do doente e os fatores de risco epidemiológico. Este ensaio utiliza o sistema BD MAX™ para levar a cabo a extração automática de ADN e posterior PCR em tempo real utilizando os reagentes fornecidos juntamente com os reagentes universais e descartáveis do sistema BD MAX™. O ADN extraído a partir de esfregaços perianais e/ou retais e colónias é detetado utilizando sondas marcadas com uma molécula fluorescente específicas para os genes *vanA* e *vanB*.

2. Introdução e explicação

Os Enterococci são organismos comensais comuns que se encontram no trato gastrointestinal e nos genitais femininos. Foram reconhecidos recentemente como patogénicos oportunistas causando infeções nosocomiais tais como as infeções das vias urinárias, infeções cutâneas, endocardite e sépsis em hospedeiros comprometidos.

A vancomicina é um antibiótico glicopéptido que inibe a síntese da parede celular e é utilizada para tratar infeções bacterianas Gram-positivas graves. Os enterococos resistentes à vancomicina (ERV) foram relatados pela primeira vez em Inglaterra e França em 1986, e atualmente encontram-se propagadas em hospitais em todo o mundo.

A resistência à vancomicina é um processo complexo e necessita da presença de diferentes agrupamentos de genes. Principalmente, podem ser divididos em dois tipos, dependendo dos precursores pentapeptídeos produzidos pelos genes de resistência à vancomicina; o precursor terminado em D-alanina-D-serina (tipo VanC, VanE, VanG, VanL e VanN) ou terminado em D-alanina-D-lactato (tipo VanA, VanB, VanD e VanM). Estes precursores pentapeptídeos revelaram baixas afinidades para com os glicopeptídeos, conferindo assim resistências à vancomicina em enterococos.

O primeiro tipo de resistência à vancomicina nos enterococos é uma resistência intrínseca (por ex., associada ao gene *vanC*). Isolados de *Enterococcus gallinarum* e *E. casseliflavus/E. flavescens* demonstraram um baixo nível de resistência, intrínseco, à vancomicina. O segundo tipo é de resistência adquirida (ou seja, genes *vanA* ou *vanB*) e os enterococos podem tornar-se resistentes por aquisição de elementos genéticos móveis (transposões e plasmídeos) a partir de outras espécies de *Enterococcus* ou organismos. Normalmente, esta resistência é verificada em *E. faecium* e *E. faecalis*, mas também foi reconhecida em *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans*, e em várias outras espécies enterocócicas. Os genes *vanA* e *vanB* são responsáveis por níveis elevados ou moderados de resistência à vancomicina.

A transmissão de enterococos resistentes à vancomicina (ERV) pode ocorrer por meio de contacto direto com líquidos corporais de doentes colonizados/infetados (sangue, drenagem da ferida, urina, fezes, expetoração,

etc.) ou por meio de contacto indireto através das mãos de profissionais de saúde, ou de equipamento de cuidados de doentes contaminados ou superfícies ambientais.

Inicialmente, o método de análise aplicado era baseado na cultura, o que demora tempo e leva, geralmente, entre um a cinco dias a estar concluído. Os ensaios de PCR em tempo real têm demonstrado ser uma ferramenta para a deteção de genes clinicamente relevantes associados à resistência à vancomicina.

3. Procedimento

O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit foi concebido para a identificação e diferenciação de ADN de enterococos resistentes à vancomicina e de outros organismos que transportam os genes *vanA* e *vanB* de resistência à vancomicina. Após o isolamento de ADN, a identificação da resistência à vancomicina é levada a cabo pela amplificação de uma região conservada dos genes *vanA* e *vanB*, utilizando oligonucleótidos específicos e uma sonda marcada com fluorescência.

O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit baseia-se na atividade da exonuclease 5' da polimerase do ADN. Durante a amplificação do DNA, esta enzima hidroliza a sonda unida à sequência de ADN complementar, separando o fluoróforo do quencher. Esta reação gera um aumento no sinal fluorescente proporcional à quantidade de RNA alvo. Esta fluorescência é monitorizada no sistema BD MAX™.

O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contém em cada tubo todos os componentes necessários para levar a cabo a PCR em tempo real (oligonucleótidos/sondas específicos, dNTPs, tampão, polimerase) num formato estabilizado, assim como, um controlo interno para monitorizar o processo de extração e/ou a inibição da atividade da polimerase.

Alvo	Canal	Gene
Genes de resistência à vancomicina	475/520	<i>vanA</i>
Genes de resistencia a la vancomicina	585/630	<i>vanB</i>
Controlo Interno (CI)	530/565	-

Tabela 1. Alvo, canal e genes.

4. Reagentes fornecidos

O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit inclui os seguintes materiais e reagentes detalhados na Tabela 2:

Reagente/Material	Descrição	Código de barras	Quantidade
<i>Vancomycin resistance reaction tube</i>	Uma mistura de enzimas, sondas oligonucleotídicas, tampão, dNTPs, estabilizadores e controlo interno em formato estabilizado.	Selo 1B	2 sobres de 12 tubos transparentes
Rehydration Buffer tube	Solução para a reconstituição do produto estabilizado	Selo 11	1 sobre de 24 tubos transparentes

Tabela 2. Reagentes e materiais fornecidos no VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit com o N.º de referência. VS-VAN124 (444202).

5. Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos

A seguinte lista inclui os materiais necessários para a utilização mas que não estão incluídos no kit de deteção em tempo real VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipamento de PCR em tempo real: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref.º:442825 ou 442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref.º: 437519).
- Vórtice.
- Micropipetas (entre 2 e 1000 µL).
- Água sem nuclease
- Pontas com filtro.
- Luvas não reutilizáveis sem pó.

6. Condições de transporte e armazenamento

- O transporte e armazenamento do kit pode ser realizado de 2 a 40 °C até à data de validade indicada na etiqueta.
- Após a abertura dos envelopes de alumínio que contém os tubos de reação, estes podem ser utilizados até um prazo máximo de 28 dias.

7. Precauções para o utilizador

- O produto destina-se a ser utilizado apenas por utilizadores profissionais, como profissionais e técnicos de laboratório ou de saúde, com formação em técnicas de biologia molecular.
- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Não é recomendado utilizar o kit após a data de validade.
- Não utilizar o kit se a etiqueta de controlo da caixa exterior estiver rasgada ou danificada.
- Não utilizar os reagentes se o estojo exterior estiver aberto ou danificado aquando da receção.
- Não utilizar os reagentes se os envelopes ou as bolsas que protegem os tubos estiverem abertos ou danificados aquando da receção.
- Não utilizar os tubos de reação se o material dessecante incluído em cada envelope de alumínio não existir ou estiver danificado.
- Não remover o material dessecante dos envelopes de alumínio.
- Fechar os envelopes de alumínio que protegem os tubos de reação com o fecho zip imediatamente depois de cada utilização. Antes de fechar os envelopes, eliminar qualquer excesso de ar.
- Não utilizar os tubos de reagentes se o alumínio protetor estiver rasgado ou danificado.
- Não misturar reagentes de diferentes envelopes e/ou kits e/ou lotes.
- Proteger os reagentes da humidade. Uma exposição prolongada à humidade pode afetar o desempenho do produto.
- Proteger os componentes da luz.
- No caso de outros ensaios de PCR que estejam a ser realizados dentro da mesma área geral do laboratório, certifique-se de que o VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, o BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit, qualquer outro reagente adicional que seja necessário para realizar o ensaio e o sistema BD

MAX™ não estão contaminados. Evitar sempre a contaminação microbiana e por ribonuclease (RNase)/desoxirribonuclease (DNase) dos reagentes. Recomenda-se a utilização de pontas de pipeta estéreis, descartáveis, sem RNase/DNase, resistentes a aerossóis ou de deslocamento positivo. Utilizar uma ponta nova para cada espécime. É necessário mudar de luvas antes da manipulação dos reagentes e dos cartuchos de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge).

- De modo a evitar a contaminação do ambiente por amplicões, não quebrar os cartuchos de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) após a utilização. Os selos dos cartuchos de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) foram concebidos para evitar a contaminação.
- Conceber um fluxo de trabalho unidirecional. Deve-se começar na área de extração e, em seguida, passar para a área de amplificação e de deteção. Não colocar as amostras, os equipamentos e os reagentes utilizados em contacto com a área onde foi realizado o passo anterior.
- Seguir as boas práticas do laboratório. Use vestuário de proteção, luvas não reutilizáveis, óculos de proteção e máscara. Não comer, beber, fumar ou aplicar produtos cosméticos na área de trabalho. Lave as mãos após terminar o teste.
- Os espécimes devem ser tratados como potencialmente infecciosos e / ou de risco biológico assim como os reagentes que tenha estado em contacto com as amostras e devem ser manuseados de acordo com as regulamentações nacionais de segurança. Tome as precauções necessárias durante a colheita, o transporte, o armazenamento, o tratamento e a eliminação das amostras.
- As amostras e reagentes têm de ser manuseados numa câmara de segurança biológica. Utilizar equipamento de proteção individual (EPI) consistente com as orientações atuais para o manuseamento de amostras potencialmente infecciosas. Eliminar os resíduos em conformidade com os regulamentos locais e nacionais.
- Recomenda-se a descontaminação periódica dos equipamentos utilizados habitualmente, em especial de micropipetas e das superfícies de trabalho.
- Em conformidade com o Regulamento (CE) N.º 1907/2006 (REACH), os "VIASURE Real Time PCR Detection Kits" não requerem Fichas de Dados de Segurança (Safety Data Sheets) do Material tendo em conta a sua classificação como não perigosos para a saúde e para o ambiente, pois não contêm substâncias e/ou misturas que cumpram os critérios de classificação de risco disponíveis no Regulamento (CE) N.º 1272/2008 (CLP) ou que estejam presentes em concentrações superiores ao valor estabelecido no regulamento mencionado para a respetiva declaração.
- Consultar o manual do utilizador do sistema BD MAX™ S para obter informações sobre advertências, precauções e procedimentos adicionais.

8. Procedimento do teste

8.1. Colheita, armazenamento e transporte de amostras

O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit foi validado em esfregaços perianais e/ou retais colocados imediatamente em meio de transporte ESwab™ (sistema de colheita e transporte de base líquida Amies modificado) (Copan, Itália). O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit também foi validado em suspensão de colónias. Outros tipos de amostras têm de ser validados pelo utilizador.

Para a colheita, armazenamento e transporte dos espécimes devem ser seguidas as condições validadas pelo utilizador. Em geral, os esfregaços perianais e/ou retais devem ser colhidos e etiquetados adequadamente em

meio de transporte ESwab™ e processados com a maior brevidade possível, de modo a garantir a qualidade do teste. As amostras devem ser transportadas entre 2 °C e 8 °C durante um período máximo de 24 horas, em conformidade com a normativa local e nacional para o transporte de amostras biológicas. Para transportes de longa duração (com mais de 24 horas), é recomendado o envio a ≤ -20 °C ou inferior. Recomenda-se a utilização de amostras recentes para o teste. As amostras podem ser armazenadas a 25 °C por um período máximo de 24 horas, entre 2 a 8 °C por um período máximo de 144 horas (6 dias), congeladas a -20 °C por um período máximo de 192 horas (8 dias) ou podem ser congeladas idealmente, a -70 °C, para conservação. Devem ser evitados ciclos de congelação-descongelação para prevenir a degradação da amostra e dos ácidos nucleicos.

Os espécimes fecais têm de ser colhidos, transportados e armazenados de acordo com orientações laboratoriais apropriadas. Para mais informações, consultar as orientações do CDC (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) e as orientações da IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

8.2. Preparação da amostra e extração de DNA

Realizar a preparação das amostras de acordo com as recomendações nas instruções de utilização do kit de extração utilizado, BD MAX™ ExK™ TNA-2. Ter em conta que outras amostras podem requerer pré-processamento. A utilização de outros procedimentos de preparação e extração específicos deve ser validada pelo utilizador.

1. Copan ESwab™: Com uma pipeta, colher 200 µL da amostra ESwab™ para um BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube (tubo de tampão de amostras) e fechar o tubo com uma tampa com septo. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra um minuto a alta velocidade. Prosseguir com BD MAX™ System Operation.
2. Colónias: Recolher duas colónias do meio em cultura e suspendê-las em 500 µL de água sem nuclease. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra. Adicionar 10 µL da suspensão para um BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube (tubo de tampão de amostras) e fechar o tubo com uma tampa com septo. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra um minuto a alta velocidade. Prosseguir com BD MAX™ System Operation.

8.3. Protocolo PCR

Nota: Consultar o manual do utilizador do sistema BD MAX™ para obter instruções mais detalhadas.

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

Nota: Se já tiver criado o teste para o VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, pode ignorar o passo 8.3.1 e avançar diretamente para o passo 8.3.2.

- 1) No ecrã "Run" (Executar) do sistema BD MAX™, seleccionar o separador "Test Editor" (Editor de testes).
- 2) Clicar no botão "Create" (Criar).
- 3) No separador de "Basic Information" (Informações básicas), na janela "Test Name" (Nome do teste), escrever o nome do teste: ou seja, VIASURE *Vancomycin resistance*.
- 4) No menu de lista pendente "Extraction Type" (Tipo de extração), seleccionar "ExK TNA-2".
- 5) No menu de lista pendente "Master Mix Format" (Formato de mistura principal), escolher "Type 5".
 - b. Nota: o produto pode ser utilizado em combinação com outro teste VIASURE for BD MAX™, em seguida, seleccionar "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)).
- 6) Em "Sample extraction parameters" (Parâmetros de extração de amostra) seleccionar "User defined" (Definidos por utilizador) e ajustar o volume para 500 µL.
- 7) Em "Ct Calculation" (Cálculo Ct) seleccionar "Call Ct at Threshold Crossing" (Ativar Ct aquando do cruzamento do limite).
- 8) Se estiver a ser utilizada a versão 5.00 do software ou uma versão posterior, em "Custom Barcodes" (Personalizar códigos de barra) seleccionar a configuração seguinte:
 - a. Snap-In 2 "Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 2): 1B (relativamente ao *Vancomycin resistance reaction tube*).
 - b. Snap-In 3 "Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 3): 11 (relativamente ao Rehydration Buffer tube).
 - c. Snap-In 4 "Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 4): outro tubo de reacção VIASURE (selo diferente) caso se opte pelo formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)) (Secção 8.3.1).
- 9) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir os seguintes parâmetros: "Channel Settings" (Definições de canais), "Gains" (Ganhos) e "Threshold" (Limite) (Tabela 3).
 - a. Nota: O produto pode ser utilizado em combinação com outro teste VIASURE for BD MAX™; neste caso, completar "PCR Settings" (Definições de PCR) e "Test Steps" (Passos de teste) para as posições 2 (verde) e 4 (azul).

Channel (Canal)	Alias	Gain (Ganho)	Threshold (Limite)	Ct Min.	Ct Max.
475/520 (FAM)	<i>vanA</i>	50	200	0	40
530/565 (HEX)	Cl	80	200	0	40
585/630 (ROX)	<i>vanB</i>	50	300	0	40
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabela 3. PCR settings (Definições de PCR).

Nota: Recomenda-se o estabelecimento dos valores limite mínimos acima indicados para cada canal como valores de partida, mas os valores finais têm de ser determinados pelo utilizador final durante a interpretação do resultado, de modo a assegurar que os limites estão dentro da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo. O valor limite para diferentes instrumentos pode variar devido a diferentes intensidades do sinal.

- 10) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir também os parâmetros "Spectral Cross Talk" (Interação espectral) (Tabela 4).

		False Receiving Channel (Canal receptor falso)					
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal d'excitação)	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 4. Parâmetros "Spectral cross-talk" (interação espectral).

- 11) No separador "Test Steps" (Passos de teste), introduzir o protocolo de PCR (Tabela 5).

Step Name (Nome do passo)	Profile Type (Tipo de perfil)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Tempo(s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Defetar)
Initial denaturation (Desnaturação inicial)	Retenção	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) Desnaturação e hibridização/Extensão (recolha de dados)	2- Temperaturas	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabela 5. Protocolo de PCR.

- 12) Clique no botão "Save Test" (Guardar teste).

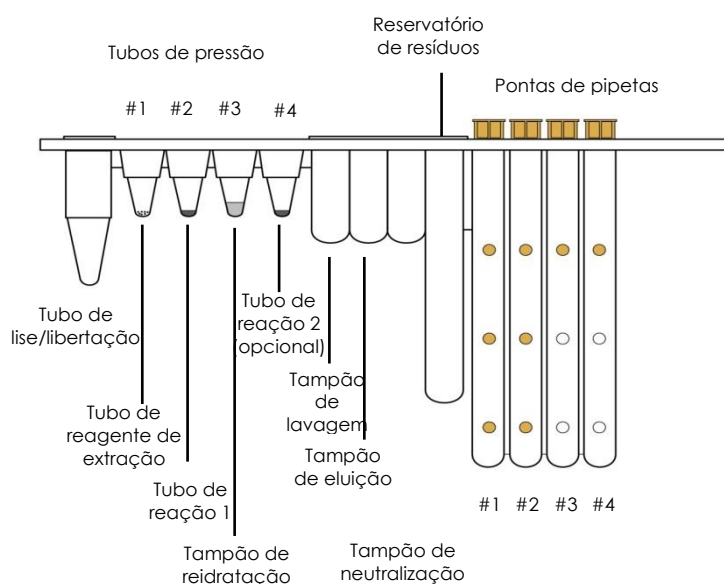
8.3.2. Preparação do suporte para tubos do sistema BD MAX™

- Para cada espécime, retirar uma tira de reagentes individual do kit de extração (BD MAX™ ExK™ TNA-2). Bater levemente cada tira sobre uma superfície dura para se certificar de que todos os líquidos se encontram no fundo dos tubos e colocar a tira de reagentes no suporte para tubos do sistema BD MAX™.
- Determinar e separar o número de tubos de reagente de extração necessários BD MAX™ ExK™ TNA (B4) (selo branco) da sua bolsa protetora. Colocar o(s) tubo(s) de reagente de extração (selo branco) na sua posição correspondente dentro da tira de reagentes TNA (Posição 1, código de cor branca no suporte para tubos. Ver figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes com o fecho hermético.
- Determinar e separar o número adequado de *Vancomycin resistance reaction tubes* (selo 1B) e colocá-los na sua posição correspondente da tira (Posição 2, código de cor verde no suporte para tubos. Ver figura 1).
 - Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.
 - Para uma reidratação correta, certifique-se de que o produto liofilizado está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
 - Nota: Se escolher o formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM

com tampão de reidratação (Tipo 5)) (Secção 8.3.1), calcular e separar o número adequado de tubos de reação dos testes VIASURE adicionais (com selo de cor diferente) e colocá-los na sua posição correspondente dentro da tira (Posição 4, código de cor azul no suporte para tubos. Ver figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.

- 4) Remover o número necessário de Rehydration Buffer tubes (selo 11) e colocá-los na sua posição correspondente da tira (Posição 3, código sem cor no suporte para tubos. Ver figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes com o fecho hermético.
 - a. De modo a assegurar uma transferência correta, certifique-se de que o líquido está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.

Figura 1. Tiras de reagente individuais BD MAX™ TNA Reagent (TNA) do BD MAX™ ExK™ TNA-2 kit.



8.3.3. Configuração do instrumento BD MAX™

- 1) Selecionar o separador "Work List" (Lista de trabalho) no ecrã "Run" (Executar) utilizando o software v4.50A ou um superior do sistema BD MAX™.
- 2) No menu de lista pendente "Test", selecionar VIASURE *Vancomycin resistance* (se ainda não tiver sido criado, consultar a secção 8.3.1).
- 3) Selecionar no menu de lista pendente o número de lote do kit de extração utilizado (que se encontra na caixa exterior). Este passo é opcional.
- 4) Introduzir o número de identificação do tubo de tampão de amostra na janela "Sample tube" (Tubo de amostra) no separador "Work List" (Lista de trabalho), através da digitalização do código de barras com o leitor ou através da entrada manual.
- 5) Introduzir a identificação da amostra/doente na janela "Accession" (Acesso) do separador "Work list" (Lista de trabalho) e clicar no botão "Save" (Guardar). Continue até estarem introduzidos todos os tubos

de tampão de amostra. Certifique-se de que a identificação da amostra/doente e os tubos de tampão de amostra estão corretamente equiparados.

- 6) Colocar o tampão de amostra preparado no(s) suporte(s) para tubos do sistema BD MAX™.
- 7) Colocar o(s) suporte(s) para tubos no sistema BD MAX™ (o suporte para tubos A encontra-se no lado esquerdo do sistema BD MAX™ e o suporte para tubos B no lado direito).
- 8) Colocar o número necessário de BD MAX™ PCR Cartridge(s) no sistema BD MAX™.
- 9) Fechar a porta do sistema BD MAX™.
- 10) Clicar em "Start Run" (Iniciar execução) para iniciar o procedimento.

8.3.4. Relatório BD MAX™

- 1) No menu principal, clique no botão "Results" (Resultados).
- 2) Fazer duplo clique no teste incluindo na lista de ensaios ou selecionar o teste e premir o botão "view" (Visualizar).
- 3) Clicar no botão "Print" (Imprimir), selecionar: "Run Details, Test Details and Plot..." (Detalhes da execução, detalhes do teste e gráfico...).
- 4) Clicar no botão "Print" (Imprimir) or "Export button" (Exportar) no ecrã "Run Reports" (Relatórios da execução).

9. Interpretação dos resultados

Para uma descrição detalhada de como analisar os dados, consultar o manual do utilizador do sistema BD MAX™.

A análise dos dados é realizada com o software BD MAX™ de acordo com as instruções de utilização do fabricante. O software do sistema BD MAX™ disponibiliza os valores de Ct e mostra as curvas de amplificação para cada um dos canais de deteção de cada amostra analisada da seguinte forma:

- Um valor de Ct de 0 indica que o software não calculou nenhum valor de Ct com o limiar especificado (ver a Tabela 3). Se a curva de amplificação mostra um "0" como valor de Ct, é necessário analisá-la manualmente.
- Um valor de Ct de -1 indica que não houve processo de amplificação.
- Qualquer outro valor de Ct deve ser interpretado em correlação com a curva de amplificação e segundo as orientações de interpretação descritas na Tabela 6.

Verificar a emissão do sinal do controlo interno para confirmar o correto funcionamento da mistura de amplificação. Para além disso, verificar que não há nenhuma anomalia do sistema BD MAX™.

-Os resultados devem ser lidos e analisados utilizando a tabela seguinte:

gene vanA (475/520)	gene vanB (585/630)	Controlo interno (530/565)	Interpretação
+	+	+/- ¹	ADN do genes vanA e vanB Detetado¹
+	-	+/- ¹	ADN do gene vanA Detetado, ADN do gene vanB não Detetado¹
-	+	+/- ¹	ADN do gene vanB Detetado, ADN do gene vanA não Detetado¹
-	-	+ ²	ADN do genes vanA e vanB não Detetado²
-	-	- ²	Resultado não resolvido (UNR). Resultado obtido na presença de inibidores na reação de PCR ou quando ocorre um problema geral (não indicado por um código de erro) nos passos de processamento e/ou amplificação da amostra².
IND	IND	IND	Resultado indeterminado do ensaio (IND). Devido a anomalia do sistema BD MAX™. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha do instrumento associado a um código de erro.
INC	INC	INC	Resultado incompleto do ensaio (INC). Devido a anomalia do sistema BD MAX™. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha de uma execução completa.

Tabela 6. Interpretação da amostra

+: Houve amplificação

+: Não houve amplificação

1 Uma amostra é considerada positiva, se o valor Ct obtido for inferior a 40. O controlo interno poderá mostrar ou não um gráfico de amplificação, já que a presença de um elevado número inicial de cópias do ácido nucleico alvo pode causar uma amplificação preferencial desta última. Nestes casos, a deteção do controlo interno não é necessária.

2 Uma amostra é considerada negativa se não for detetada uma curva de amplificação acima do valor limiar, e o controlo interno a apresentar (Ct inferior a 40). A inibição da reação de PCR pode ser excluída pela amplificação do controlo interno. Em caso de resultados não resolvidos (UNR), ausência do sinal de controlo interno nas amostras negativas, é recomendado repetir o ensaio seguindo as indicações abaixo.

REPETIR O PROCEDIMENTO DO TESTE

No caso de um resultado ambíguo contínuo, recomenda-se rever as instruções de utilização e o processo de extração empregue pelo utilizador, verificar o desempenho de todas as etapas do RT-qPCR e rever os parâmetros, e verificar o formato sigmoide da curva e a intensidade da fluorescência.

NOTA: Encontra-se disponível volume suficiente para um teste de repetição a partir do tubo de tampão de amostras. Para tubos de tampão de amostras BD MAX™ armazenados a 2–8 °C ou 25 °C, o novo teste tem de ser realizado no prazo de 24 horas.

NOTA: Poderão ser testadas novas amostras na mesma sequência com amostras repetidas.

O resultado do teste deve ser avaliado no contexto da história clínica, dos sintomas clínicos e outros testes de diagnóstico por um profissional de saúde.

10. Limitações do teste

- O resultado do teste deve ser avaliado no contexto da história clínica, dos sintomas clínicos e outros testes de diagnóstico por um profissional de saúde.
- Embora este ensaio possa ser utilizado com outros tipos de amostras, foi validado com esfregaços perianais e/ou retais colhidos utilizando o meio de transporte ESwab™ e suspensão de colónias.
- Para o bom desempenho do teste, o produto liofilizado deve estar no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou ao selo de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
- O aparecimento da mistura de reação num formato estabilizado, normalmente depositada no fundo do tubo, diferente do habitual (sem um formato cónico, não homogénea, de tamanho menor/maior e/ou uma cor diferente de esbranquiçado) não altera a funcionalidade do teste.
- A qualidade do teste depende da qualidade da amostra; o ácido nucleico deve ser extraído de forma adequada de esfregaços perianais e/ou retais e as colónias têm de ser extraídas.
- O teste é um teste qualitativo e não fornece valores quantitativos nem indica o número de organismos presentes.
- Pode-se detetar um baixo número de alvos abaixo do limite de deteção, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
- Existe a possibilidade de resultados falsos positivos devido à contaminação cruzada por resistência à vancomicina, quer pelas amostras suspeitas de elevadas concentrações de ADN alvo quer pela contaminação por arraste a partir de produtos de PCR de reações anteriores.
- Resultados falsos negativos podem ser causados por vários fatores e respetivas combinações, incluindo:
 - Métodos incorretos de colheita, transporte, armazenamento e/ou manuseamento de espécimes.
 - Procedimentos de processamento incorretos (incluindo extração de ADN).
 - Degradação do ADN durante a expedição/armazenamento e/ou processamento das amostras.
 - Mutações ou polimorfismos no primer ou nas regiões de ligação da sonda podem afetar a deteção do gene *vanA* novo ou desconhecido e / ou variantes do gene *vanB*.
 - Uma carga de organismo resistente à vancomicina na amostra abaixo do limite de deteção para o ensaio.
 - A presença de inibidores de RT-qPCR ou de outros tipos de substâncias interferentes.
 - A não observância das instruções e do procedimento do ensaio.
- Um sinal de IC negativo não exclui a presença de gene *vanA* e/ou gene *vanB* num espécime clínico.
- Um resultado de teste positivo não indica necessariamente a presença de organismos resistentes a vancomicina e não significa que estes organismos são infecciosos ou que são os agentes causadores de sintomas clínicos. Contudo, um resultado positivo é indicador da presença de sequências de resistência a vancomicina alvos.
- Resultados negativos não excluem a infeção por organismo resistente a vancomicina e não devem ser utilizados como único fundamento para o tratamento ou outras decisões de gestão do doente.
- Em caso de obtenção de resultados não resolvidos, indeterminados ou incompletos, será necessário repetir o teste com o VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit. Os resultados não resolvidos podem dever-se à presença de inibidores na amostra ou a uma reidratação incorreta do tubo de mistura da reação liofilizada. Se ocorrer uma avaria no instrumento, serão obtidos resultados indeterminados ou incompletos.

11. Controlo de qualidade

O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contém um controlo interno (CI) em cada tubo de reação que confirma o correto funcionamento da técnica.

12. Características do teste

12.1. Sensibilidade e especificidade clínica

O desempenho clínico do VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit foi testado utilizando amostras clínicas (amostras retais) de doentes com suspeita de infeção por VRE. Os resultados foram os seguintes:

	Centro	Tipo de amostra	Fluxo de trabalho	Alvo
1	Microbiologia Clínica - Centro de Doenças Infecciosas e Serviços de Microbiologia Laboratorial, NSW Health Pathology, Westmead Hospital (Sidney, Austrália)	Esfregaço retal	BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System	Gene <i>VanA</i>
				Gene <i>VanB</i>
				Genes <i>VanA</i> + <i>VanB</i>

Tabela 7. Centro, tipo de amostra, fluxo de trabalho e alvo.

Os valores positivos e negativos verdadeiros, valores positivos e negativos falsos, valores de sensibilidade e especificidade para o VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit foram calculados em relação a cada ensaio comparador conforme indicado na tabela seguinte:

Centro	Ensaio comparador	Alvo	TP	TN	FP	FN	Sensibilidade	Especificidade
1	PCR interno de VRE (Westmead – WMD)	<i>VanA</i>	65	151	0	0	100% (93%-100%)	100% (96%-100%)
		<i>VanB</i>	36	179	1	0	100% (87% - 100%)	99% (96%-100%)
		<i>VanA+VanB</i>	17	199	0	0	100% (97% - 100%)	100%(97% -100%)

Tabela 8. Valores positivos (TP) e negativos (TN) verdadeiros, valores positivos (FP) e negativos (FN) falsos, valores de sensibilidade e especificidade para o VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Os resultados mostram uma elevada concordância para detetar genes *vanA* e *vanB* utilizando o VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Adicionalmente, foi calculada a taxa de falha de controlo de processamento das amostras. O número inicial de reações não resolvidas (UNR) foi 3 (Taxa de UNR inicial: 1,39%). O número de UNR após repetição foi 0 (Taxa de UNR final: 0,00%).

De modo a avaliar a compatibilidade do VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, adaptado para o BD MAX™, com outras matrizes de amostra diferentes, foi realizada uma avaliação para confirmar a deteção de suspensões de colónias de enterococos resistentes a vancomicina.

Foram preparadas diferentes suspensões de colónias adicionando duas colónias de uma determinada cultura em 500 µl de água sem nuclease. As estirpes utilizadas para esta avaliação foram: CECT 5253 *Enterococcus faecium vanA*, CECT 8120 *Enterococcus faecalis vanB*, NCTC 12201 *Enterococcus faecalis vanA*, e NCTC 13632 *Enterococcus faecalis vanA*. Um volume de 10 µl de cada suspensão de colónia foi adicionado diretamente ao tubo com tampão de amostra. O fluxograma utilizado para realizar esta avaliação foi: BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System.

Os resultados obtidos revelaram que as suspensões de colónias de CECT 5253, NCTC 12220 e NCTC 13632 eram positivas para o gene *vanA* e a suspensão da colónia de CECT 8120 era positiva para o gene *vanB*.

12.2. Sensibilidade analítica

O VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit tem um limite de deteção ≥ 4 unidades formadoras de colónias por reação (UFC/reação) para o gene *vanA* e ≥ 10 UFC/reação para o gene *vanB* (Figuras 2 e 3), com uma taxa positiva $\geq 95\%$ em esfregaços perianais e retais.

Figura 2. Diluições em série de um padrão de gene *vanA* ($3,62 \cdot 10^4$ -3,62 UFC/reação). Teste executado no sistema BD MAX™ (canal 475/520 (FAM)).

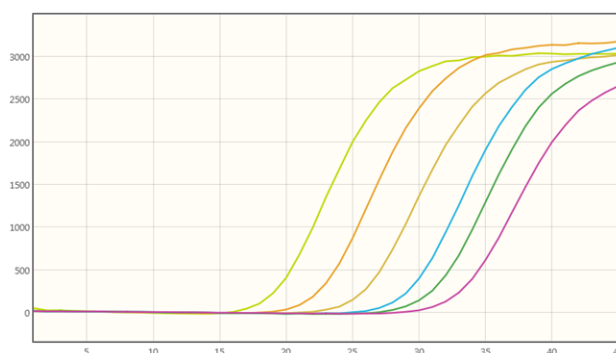
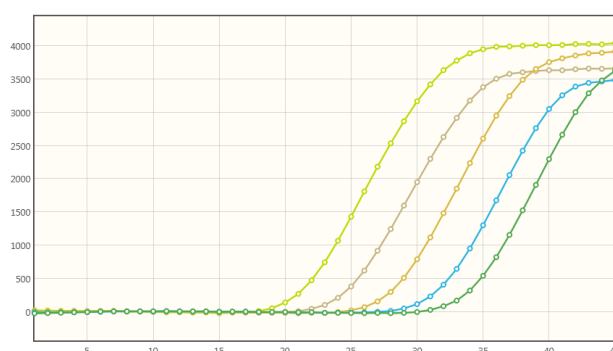


Figura 3. Diluições em série de um padrão de gene *vanB* ($5,65 \cdot 10^4$ -9,98 UFCU /reação). Teste executado no sistema BD MAX™ (canal 585/630 (ROX)).



12.3. Especificidade analítica

A especificidade do teste de resistência à vancomicina foi confirmada através do ensaio de um painel constituído por diferentes organismos resistentes a agentes antimicrobianos e diferentes microrganismos representando os agentes patogénicos entéricos mais frequentes ou flora presente no intestino. Não foi detetada nenhuma reatividade cruzada entre os seguintes microrganismos testados, exceto os agentes patogénicos visados em cada ensaio:

Teste de reação cruzada					
Serotipos de adenovírus 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	Isolado de <i>Klebsiella pneumonia</i> produtor de TEM-1 (não ESBL), SHV-1 (não ESBL), CTX-M-2 (ESBL) e KPC-2	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> tipo VanC	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> da subespécie <i>hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> tipo VanC2	-	Norovírus GI e GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Genótipos de astrovírus I-VIII	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanB	- / +	Rotavírus A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> tipo VanA	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> tipo VanB	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> tipos VanB e VanC	- / +	<i>Salmonella paratyphi</i> A	-
<i>Campylobacter jejuni</i> , subespécie <i>jejuni</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> tipo VanC	-	<i>Salmonella paratyphi</i> B	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> tipo VanC1	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Isolado de <i>Citrobacter braakii</i> produtor de VIM-1	-	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	-	Sapovírus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Isolado de complexo de <i>Citrobacter freundii</i> produtor de KPC-3 e VIM-4	-	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	-	Isolado de <i>Serratia marcescens</i> produtor de OXA-48	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	Isolado de <i>Escherichia coli</i> produtor de OXA-244	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	Isolado de <i>Escherichia coli</i> produtor de TEM-1 (não ESBL) e IMP-1	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> , subespécie <i>aureus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Estirpe N315 de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA)	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	Estirpe ST398 de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Estirpe (oxa ^R , PVL-positivo, tipo spa t310) de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA)	-
Isolado de <i>Enterobacter cloacae</i> produtor de SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) e OXA-48	-	<i>Helicobacter pylori</i> resistente à claritromicina (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
Isolado de <i>Enterobacter cloacae</i> produtor de TEM-1 (não ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) e NDM-1	-	<i>Helicobacter pylori</i> resistente à claritromicina (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Isolado de complexo de <i>Enterobacter cloacae</i> produtor de NDM-7	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Enterococcus avium</i> do tipo VanA	+ / -	Isolado de <i>Klebsiella pneumonia</i> produtor de SHV-1 (não ESBL), KPC-3 e OXA-48	-		

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

12.4. Reactividade analítica

A reatividade do VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit para com o gene *vanA* foi avaliada em relação a ADN extraído de estirpes de *Enterococcus avium* do tipo *vanA*, *Enterococcus faecalis* do tipo *vanA* (NCTC 13632, NCTC 12201) e *Enterococcus faecium* do tipo *vanA* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202), revelando resultados positivos.











A reatividade do VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit para com o gene *vanB* foi avaliada em relação a ADN extraído de estirpes de *Enterococcus faecalis* do tipo *vanB* (ATCC 51299, CECT 8120), *Enterococcus faecium* do tipo *vanB* (IOWA 2) e *Enterococcus gallinarum* dos tipos *vanB* e *vanC* (ENT20120142), revelando resultados positivos.

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/ Símbolos para componentes

IVD e reagentes

 IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device Produto para diagnóstico <i>In vitro</i>	 Keep dry Armazenar em local seco	 Use by Data de validade	 Manufacturer Fabricante	 LOT Batch code Código do lote (Lot)
 i	Consult instructions for use Consultar as instruções de utilização	 Temperature limitation Limitação de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contém <n> test	 UDI Unique Device Identification Identificação Única de Dispositivo	 REF Catalogue number Número de referência

Trademarks

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

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

Change Control / Controlo de alterações		
Version No. / Versão n.º	Changes / Alterações	Date / Data
00	Unification of all instructions for use associated with the different catalogue references in a single format / Unificação de todas as instruções de uso associadas às diferentes referências do catálogo em um único formato.	21/06/2021

Table A 2. Control change table / Tabela de controlo de alterações.

Revision: 21st June 2021.

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev01

