

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Vancomycin resistance for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Aceste instrucțiuni de utilizare se aplică pentru următoarea referință:

PRODUCT / PRODUS	REFERENCE / REFERINȚĂ
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. / Referința pentru produsul de utilizat împreună cu 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

Cuprins

1.	Domeniu de utilizare	19
2.	Rezumat și explicare	19
3.	Principiile procedurii.....	20
4.	Reactivi furnizați	20
5.	Reactivi și echipamente care trebuie asigurate de către utilizator	21
6.	Condiții de transport și depozitare	21
7.	Precauții pentru utilizatori	21
8.	Procedura de testare	22
8.1.	Recoltarea, transportul și depozitarea probei	22
8.2.	Pregătirea probei și extragerea ADN.....	23
8.3.	Protocol PCR.....	23

9.	Interpretarea rezultatelor	27
10.	Limitările testului.....	29
11.	Controlul de calitate.....	30
12.	Caracteristici de performanță	30
12.1.	Sensibilitate și specificitate clinică.....	30
12.2.	Sensibilitate analitică	31
12.3.	Specificitate analitică.....	32
12.4.	Reactivitate analitică	33
	Bibliography/Bibliografie	34
	Symbols for IVD components and reagents/ Simboluri pentru componentele și reactivii 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 ≤-20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 25°C for up to 24 hours, 2 to 8°C for up to 144 hours (6 days), frozen at -20°C for up to 192 hours (8 days) or ideally at -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

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

8.2. Sample preparation and DNA extraction

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

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

8.3. PCR protocol

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

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

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

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

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

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

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	<i>vanA</i>	50	200	0	40
530/565 (HEX)	IC	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

Table 3. PCR settings.

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

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

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

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 5. PCR protocol.

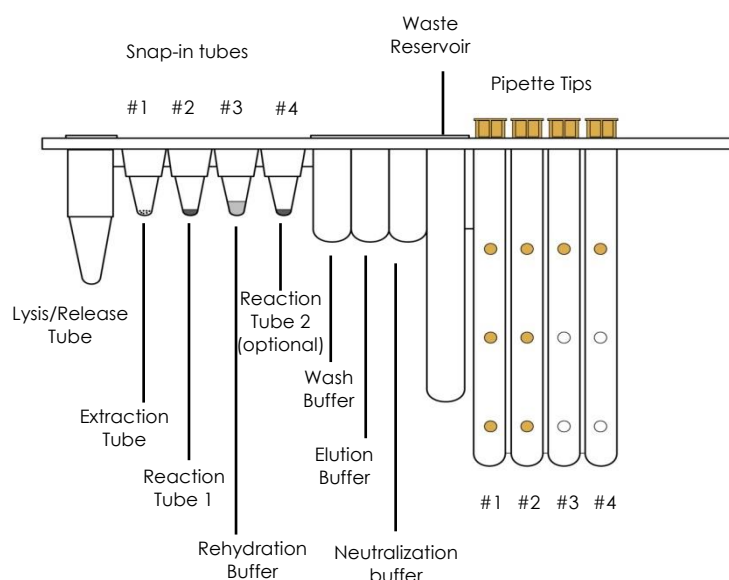
- 12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

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

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

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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

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

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

8.3.4. BD MAX™ report

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

9. Result interpretation

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

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

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

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

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

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

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

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

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

REPEAT TEST PROCEDURE

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

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

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

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

10. Limitations of the test

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

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

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 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).

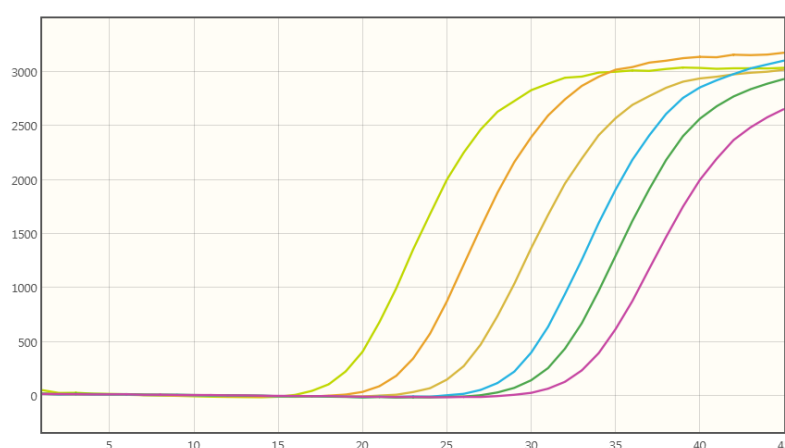
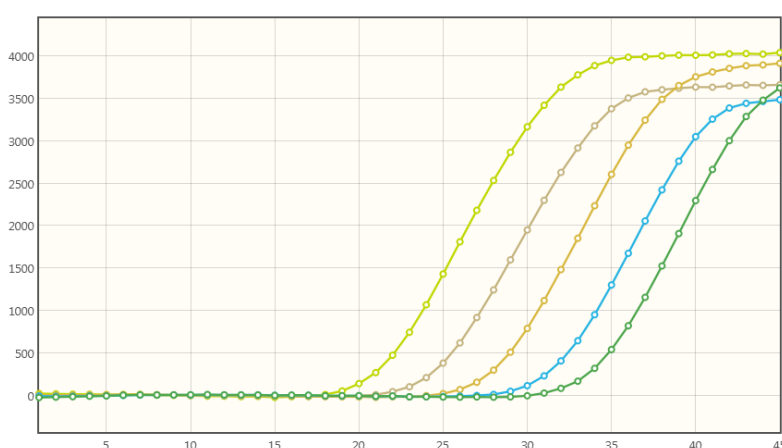


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene (5.65×10^4 -9.98 CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



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.

ROMÂNĂ

1. Domeniu de utilizare

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit este destinat pentru detectarea specifică și diferențierea genelor *vanA* și *vanB*, care pot fi asociate cu enterococi rezistenți la vancomicină (VRE), direct din tampoane și colonii perianale și/sau rectale. Acest test este destinat pentru utilizare ca ajutor în identificarea organismelor rezistente la vancomicină, în combinație cu semnele și simptomele clinice ale pacientului și cu factorii de risc epidemiologic. Testul utilizează sistemul BD MAX™ pentru extragerea automată de ADN și efectuarea ulterioară în timp real a PCR, folosind reactivii furnizați în combinație cu reactivi universali și cu consumabile pentru sistemul BD MAX™. ADN-ul din tampoanele și coloniile perianale și/sau rectale este detectat folosind sonde reporter cu pigment fluorescent specifice pentru genele *vanA* și *vanB*.

2. Rezumat și explicare

Enterococii sunt organisme comensale comune care se găsesc în tractul gastrointestinal și în organele genitale feminine. Recent, acestea sunt recunoscute ca agenți patogeni oportuniști care cauzează infecții nosocomiale, cum ar fi infecții ale tractului urinar, infecții ale pielii, infecții respiratorii, endocardită și sepsis în gazdă compromisă.

Vancomicina este un antibiotic glicopeptidic care inhibă sinteza peretelui celular și este utilizat pentru a trata infecțiile bacteriene Gram-pozitive severe. Enterococii rezistenți la vancomicină (VRE) au fost raportați pentru prima dată în Anglia și Franța în 1986 și acum s-au răspândit prin spitale din întreaga lume.

Rezistența la vancomicină este un proces complex și necesită prezența diferitelor grupuri de gene. În principal, ele pot fi împărțite în două tipuri, în funcție de precursorii pentapeptidici produși de genele de rezistență la vancomicină: precursorul care se termină în D-alanină-D-serină (tipul *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* și *vanN*) sau care se termină în D-alanină-D-lactat (tipul *vanA*, *vanB*, *vanD* și *vanM*). Acești precursori pentapeptidici au prezentat afinități scăzute pentru glicopeptide și au conferit enterococilor rezistențe la vancomicină.

Primul tip de rezistență la vancomicină a enterococilor este rezistența intrinsecă (adică asociată cu gena *vanC*). Izolatele de *Enterococcus gallinarum* și *E. casseliflavus*/*E. flavescens* demonstrează o rezistență inerentă, de nivel scăzut, la vancomicină. Al doilea tip este rezistența dobândită (adică genele *vanA* sau *vanB*), iar enterococii pot deveni rezistenți prin achiziționarea de elemente genetice mobile (transpozoni și plasmide) de la o altă specie sau organism *Enterococcus*. Cel mai frecvent, această rezistență este văzută la *E. faecium* și *E. faecalis*, dar, de asemenea, a fost recunoscută la *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans*, și alte câteva specii enterococice. Genele *vanA* și *vanB* sunt responsabile pentru niveluri ridicate sau moderate de rezistență la vancomicină.

Transmiterea enterococilor rezistenți la vancomicină (VRE) poate avea loc prin contact direct cu fluidele corporale de la pacienții colonizați sau infectați (sânge, drenarea rănilor, urină, scaun, spută și altele) sau prin contact indirect prin mâinile lucrătorilor din domeniul sănătății sau prin echipamente de îngrijire a pacientului sau suprafețe de mediu contaminate.

La început, metoda de screening aplicată a fost bazată pe cultură, care necesită mult timp și durează, în general, de la una la cinci zile până la finalizare. Testele PCR în timp real s-au dovedit a fi un instrument pentru detectarea genelor relevante clinic asociate cu rezistența la vancomicină.

3. Principiile procedurii

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit este destinat pentru identificarea și diferențierea ADN-ului de la enterococi rezistenți la vancomicină și de la alte organisme care transportă genele de rezistență vancomicină *vanA* și *vanB*. După izolarea ADN-ului, identificarea rezistenței la vancomicină se realizează prin amplificarea unei regiuni conservate a genelor *vanA* și *vanB*, folosind primeri specifici și o sondă cu marcaj fluorescent.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit se bazează pe activitatea de tip 5' exonuclează a ADN polimerazei. În cursul amplificării ADN, această enzimă clivează sonda legată la secvența de ADN complementar, separând molecula blocantă de substanța fluoroforă. Această reacție generează o creștere a semnalului fluorescent care este proporțională cu cantitatea de model țintă. Această fluorescență este măsurată de sistemul BD MAX™.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit conține în fiecare tub toate componentele necesare pentru un test PCR în timp real (primeri /sonde specifice, dNTPS, tampon, polimeriză) în format stabilizat, precum și un control intern, pentru a monitoriza procesul de extracție și/sau de inhibare a activității polimerazei.

Țintă	Canal	Genă
Gene de rezistență la vancomicină	475/520	<i>vanA</i>
Gene de rezistență la vancomicină	585/630	<i>vanB</i>
Control intern (IC)	530/565	-

Tabelul 1. Țintă, canal și gene

4. Reactivi furnizați

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit include următoarele materiale și următorii reactivi detaiați/detaiate în Tabelul 2:

Reactiv/Material	Descriere	Cod de bare	Cantitate
<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube	Un amestec de enzime, sonde, primeri, tampon, dNTPs, stabilizatori și control intern în format stabilizat.	Folie 1B	2 pungi cu câte 12 tuburi transparente
Rehydration Buffer tube	Soluție pentru reconstituirea produsului stabilizat	Folie 11	1 pungă cu 24 tuburi transparente

Tabelul 2. Reactivi și materiale furnizate în VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit cu Cat. Nr.VS-VAN124 (444202).

5. Reactivi și echipamente care trebuie asigurate de către utilizator

Lista de mai jos include materiale și echipamente care sunt necesare pentru utilizare, însă nu sunt incluse în VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

- Instrument PCR în timp real: sistem BD MAX™.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref: 442825 sau 442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipete (cu funcționare precisă între 2 și 1000 µl).
- Apă fără nucleaze.
- Vârfuri filtrante.
- Mănuși consumabile, fără pulbere.

6. Condiții de transport și depozitare

- Kiturile pot fi transportate și depozitate la 2-40°C până la data de expirare, care este înscrisă pe etichetă.
- După deschiderea pungilor de aluminiu care conțin tuburile de reacție, acestea pot fi utilizate timp de până la 28 de zile.

7. Precauții pentru utilizatori

- Acest produs este destinat pentru utilizare numai de către utilizatori profesioniști, cum sunt profesioniști de laborator sau din domeniul sănătății și tehnicieni, instruiți în ceea ce privește tehnicile de biologie moleculară.
- Pentru utilizare în diagnostic *in vitro*.
- Nu utilizați reactivi și/sau materiale expirate.
- Nu utilizați kitul dacă eticheta care sigilează cutia exterioră este ruptă.
- Nu utilizați reactivii dacă cutia de protecție este deschisă sau ruptă la primire.
- Nu utilizați reactivii dacă pungile de protecție sunt deschise sau rupte la primire.
- Nu utilizați reactivii dacă desicantul nu este prezent sau este rupt în interiorul pungilor cu reactivi.
- Nu îndepărtați desicantul din pungile cu reactivi.
- Închideți prompt pungile de protecție care conțin reactivi, cu fermoarul, după fiecare utilizare. Îndepărtați din pungi aerul în exces înainte de sigilare.
- Nu utilizați reactivii dacă folia a fost ruptă sau deteriorată.
- Nu amestecați reactivii din pungi și/sau kituri și/sau loturi diferite.
- Protejați reactivii împotriva umidității. Expunerea prelungită la umiditate poate afecta performanța produsului.
- Feriți componentele de lumină.
- În cazul în care sunt efectuate alte teste PCR în aceeași arie generală a laboratorului, trebuie să aveți grijă ca VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit, orice reactivi suplimentari necesari pentru testare și sistemul BD MAX™ să nu fie contaminate. Evitați întotdeauna contaminarea microbiană și cu ribonuclează (RNază)/dezoxiribonuclează (Dnază) a reactivilor. Se

recomandă utilizarea vârfurilor de pipetare consumabile, lipsite de RNază/DNază, rezistente la aerosoli sau cu dislocuire pozitivă. Utilizați câte un vârf nou pentru fiecare probă. Trebuie să schimbați mănușile înainte de manipularea reactivilor și cartușelor.

- Pentru a evita contaminarea mediului cu ampliconi, nu rupeți cartușul BD MAX™ PCR după utilizare. Elementele de sigilare ale cartușului BD MAX™ PCR sunt concepute să prevină contaminarea.
- Puneți la punct un flux de lucru unidirecțional. Acesta trebuie să înceapă în zona de extracție și să continue în zona de amplificare și zona de detectare. Nu duceți probele, echipamentele și reactivii înapoi în zona în care a fost efectuată etapa precedentă.
- Respectați bunele practici de laborator. Purtați echipament de protecție, utilizați mănuși de unică folosință, ochelari de protecție și mască. Nu mâncați, nu beți, nu fumați și nu aplicați produse cosmetice în zona de lucru. Spălați-vă pe mâini după ce terminați testul.
- Probele trebuie tratate ca potențial infecțioase și/sau periculoase biologic, precum și toți reactivii și toate materialele care au fost expuse la probe și trebuie manipulate conform reglementărilor naționale privind siguranța. Luați măsurile de precauție necesare în cursul recoltării, depozitării, tratării și eliminării probelor.
- Probele și reactivii trebuie manipulate/manipulați într-un dulap de siguranță biologică. Utilizați echipament individual de protecție (EIP) în conformitate cu îndrumările actuale pentru manipularea probelor potențial infecțioase. Eliminați deșeurile în conformitate cu reglementările locale și de stat.
- Se recomandă decontaminarea cu regularitate a echipamentului utilizat, în special micropipetele și suprafețele de lucru.
- În conformitate cu Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits nu au nevoie de fișe tehnice de securitate (Safety Data Sheets) din cauza clasificării lor ca nepericuloase pentru sănătate și mediu, deoarece nu conțin substanțe și/sau amestecuri care îndeplinesc criteriile de clasificare a pericolelor disponibile în Regulamentul (CE) Nr. 1272/2008 (CLP) sau care sunt în concentrații mai mari decât valoarea stabilită în regulamentul menționat pentru declararea lor.
- Consultați manualul de utilizare al sistemului BD MAX™ System pentru avertizări, precauții și proceduri suplimentare.

8. Procedura de testare

8.1. Recoltarea, transportul și depozitarea probei

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit a fost testat pe tampoane perianale și/sau rectale plasate imediat în mediul de transport ESwab™ (sistem lichid de colectare și transport pe bază de Amies) (Copan, Italia). VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit a fost, de asemenea, testat pe suspensie de colonie. Alte tipuri de probe trebuie validate de către utilizator.

Recoltarea, depozitarea și transportul specimenelor trebuie să se încadreze în condițiile validate de către utilizator. În general, tampoanele perianale și/sau rectale trebuie colectate și etichetate corespunzător într-un mediu curat de transport ESwab™ și prelucrate cât mai curând posibil pentru a garanta calitatea testului. Specimenele trebuie transportate la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C timp de cel mult 24 de ore, cu respectarea reglementărilor naționale și locale pentru transportul materialelor patogene. În cazul transportului cu durată mare (mai mult de 24 de ore), recomandăm transportul la ≤-20 °C sau mai jos. Se recomandă să se utilizeze probe proaspete pentru fiecare test. Probele pot fi depozitate la temperatura de 25 °C timp de cel mult

24 de ore, la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C timp de cel mult 144 de ore (6 zile), pot fi congelate la -20 °C pentru cel mult 192 de ore (8 zile) sau, ideal, la -70 °C, pentru conservare. Trebuie evitate ciclurile repetate de congelare-decongelare, pentru a se preveni degradarea probei și a acizilor nucleici.

Specimenele fecale trebuie colectate, transportate și depozitate în conformitate cu îndrumările de laborator corespunzătoare. Pentru detalii, consultați linia directoare CDC (Centrul pentru Prevenirea și Controlul Bolilor din SUA) (Linii directoare de colectare a specimenelor. Site-ul web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) și ghidul IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). Un ghid de utilizare a laboratorului de microbiologie pentru diagnosticarea bolilor infecțioase: actualizare 2018 de către Societatea Americană de Boli Infecțioase și Societatea Americană pentru Microbiologie. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

8.2. Pregătirea probei și extragerea ADN

Efectuați pregătirea probei conform recomandărilor date în instrucțiunile de utilizare ale kitului de extracție folosit, BD MAX™ ExK™ TNA-2. Rețineți faptul că o parte din celelalte probe ar putea necesita pre-procesare. Procedurile de pregătire a extracției, specifice aplicației, trebuie să fie dezvoltate și validate de către utilizator.

1. Copan ESwab™: pipetați 200 μl din proba ESwab™ într-un tub pentru probă cu tampon BD MAX™ ExK™ TNA-2 și închideți tubul cu un capac prevăzut cu sept. Asigurați amestecarea completă prin vortexarea probei la viteză mare, timp de 1 minut. Continuați cu operarea sistemului BD MAX™ System Operation.
2. Colonii: luați două colonii din mediul cultivat și suspendați-le în 500 μl de apă fără nuclează. Asigurați amestecarea completă prin vortexare. Adăugați 200 μl din suspensie într-un tub pentru probă cu tampon BD MAX™ ExK™ TNA-2 și închideți tubul cu un capac prevăzut cu sept. Asigurați amestecarea completă prin vortexarea probei la viteză mare, timp de 1 minut. Continuați cu operarea sistemului BD MAX™ System Operation.

8.3. Protocol PCR

Notă: Pentru instrucțiuni detaliate, vă rugăm să consultați manualul de utilizare al sistemului BD MAX™.

8.3.1. Crearea programului de testare PCR pentru VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

Notă: Dacă ați creat deja testul pentru VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, puteți săriți punctul 8.3.1 și să mergeți direct la 8.3.2.

- 1) Deschideți ecranul „Run” (Rulare) al sistemului BD MAX™, selectați fila „Test Editor” (Editor test).
- 2) Dați click pe butonul „Create” (Creare).
- 3) În fila cu informații de bază, în fereastra „Test Name” (Nume test), denumiți testul: adică, VIASURE Vancomycin resistance.
- 4) În meniul defilant „Extraction Type” (Tip extracție), selectați „ExK TNA-2”.

- 5) În meniul defilant „Master Mix Format” (Format general amestecare), alegeți „Type 5” (Tip 5).
 - a. Notă: Produsul poate fi utilizat în combinație cu un test VIASURE pentru BD MAX™ suplimentar, apoi selectați „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (MM liofilizat concentrat general de amestecare dual cu tampon de rehidratare (Tip 5)).
- 6) În „Sample extraction parameters” (Parametri de extracție probă) selectați „User defined” (Definit de utilizator) și ajustați volumul probei până la 500 µl.
- 7) În „Ct Calculation” (Calcul Ct), selectați „Call Ct at Threshold Crossing” (Apelare Ct la depășirea pragului).
- 8) Dacă rulați versiunea de software 5.00 sau mai recentă, în „Custom Barcodes” (Coduri de bare personalizate) selectați următoarea configurație:
 - a. „Snap-In 2 Barcode” (Cod de bare poziția de fixare 2): 1B (referitor la tub de reacție *Vancomycin resistance*).
 - b. „Snap-In 3 Barcode” (Cod de bare poziția de fixare 3): 11 (referitor la tub cu tampon de rehidratare)
 - c. „Snap-In 4 Barcode” (Cod de bare poziția de fixare 4): un alt tub de reacție VIASURE (folie diferită) dacă alegeți formatul „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (MM liofilizat concentrat de amestecare generală dual cu tampon de rehidratare (Tip 5)) (Secțiunea 8.3.1).
- 9) În fila „PCR settings” (Setări PCR), introduceți următorii parametri: „Channel Settings” (Setări canal), „Gains” (Câștiguri) și „Threshold” (Prag) (Tabelul 3).
 - a. Notă: Produsul poate fi utilizat în combinație cu un test VIASURE pentru BD MAX™ suplimentar, „PCR settings” (Setări PCR) și „Test Steps” (Etapete de testare) trebuie completate pentru poziția de fixare 2 (verde) și poziția de fixare 4 (albastru).

Channel (Canal)	Alias (Alias)	Gain (Câștig)	Threshold (Prag)	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

Tabelul 3. PCR settings (Setări PCR).

Notă: Se recomandă să setați valorile de prag minime listate mai sus pentru fiecare canal la un moment inițial, dar setările finale trebuie determinate de către utilizatorul final în cursul interpretării rezultatelor, pentru a exista siguranța că pragurile se situează în interiorul fazei exponențiale a curbei de fluorescență și deasupra oricărui semnal de fundal. Valoarea prag pentru diferite instrumente poate varia datorită intensităților diferite ale semnalului.

- 10) În fila „PCR settings” (Setări PCR) introduceți și următorii parametri „Spectral Cross Talk” (Diafonie spectrală) (Tabelul 4).

		False Receiving Channel (Canal fals receptor)					
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal excitare)	475/520	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	0,0	-	0,0	0,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0
	630/665	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0

Tabelul 4. Parametri „spectral cross-talk” (diafonie spectrală).

11) În fila „Test Steps” (Etape test), introduceți protocolul PCR (Tabelul 5).

Step Name (Nume etapă)	Profile Type (Tip profil)	Cycles (Cicluri)	Time (s) (Timp (s))	Temperature (Temperatură)	Defect (Detectare)
Initial denaturation (Denaturare inițială)	Menținere	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturare și annealing/extensie (Colectare date))	2 temperaturi	45	10	95 °C	-
			58	60 °C	✓

Tabelul 5. Protocol PCR.

12) Dați click pe butonul „Save Test” (Salvare test).

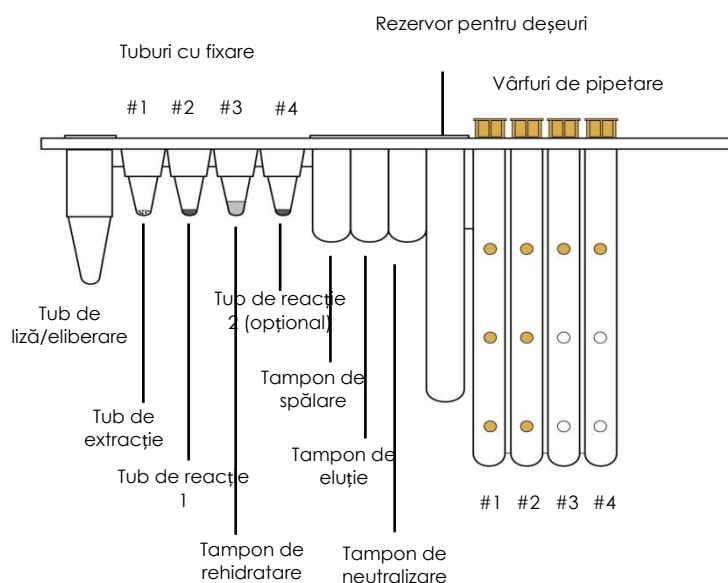
8.3.2. Configurarea stativului BD MAX™

- Pentru fiecare probă de testat, scoateți o bandetă de reactiv unitarizată din kitul BD MAX™ ExK™ TNA-2. Loviți cu blândețe fiecare bandetă de o suprafață dură pentru a vă asigura că toate lichidele se află la fundul tuburilor și încărcăți pe stativele pentru probe ale sistemului BD MAX™.
- Scoateți numărul necesar de BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (folie albă) din punga de protecție respectivă. Fixați tuburile de extracție (folie albă) în pozițiile corespunzătoare de pe bandelela TNA (poziția de fixare 1, cod de culoare alb pe stativ. Consultați Figura 1). Îndepărtați excesul de aer și închideți punga cu sigiliul cu fermoar.
- Determinați și separați numărul adecvat de tuburi de reacție *Vancomycin resistance* (folie 1B) și fixați-le în pozițiile lor corespunzătoare de pe bandelela (poziția de fixare 2, cod de culoare verde pe stativ. Consultați Figura 1).
 - Îndepărtați excesul de aer și închideți pungile de aluminiu cu sigiliul cu fermoar.
 - Pentru a face o rehidratare corectă, vă rugăm să vă asigurați că produsul liofilizat se află la fundul tubului și că nu este aderent la partea de sus a tubului sau la folia de sigilare. Loviți cu blândețe fiecare tub de o suprafață dură pentru a vă asigura că toate produsele se află la fundul tuburilor.
 - Notă: Dacă alegeți formatul „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (MM liofilizat concentrat de amestecare generală dual cu tampon de rehidratare (Tip 5)), determinați și separați numărul adecvat de tuburi de reacție VIASURE suplimentare (folie diferită) și fixați-le în pozițiile lor corespunzătoare de

pe bandeletă (poziția de fixare 4, cod de culoare albastru pe stativ. Consultați Figura 1). Îndepărtați excesul de aer și închideți pungile de aluminiu cu sigiliul cu fermoar.

- 4) Îndepărtați numărul necesar de tuburi cu tampon de rehidratare (folie 11) și fixați-le în pozițiile corespunzătoare pe bandeletă (poziția de fixare 3, fără cod de culoare pe stativ. Consultați Figura 1). Îndepărtați excesul de aer și închideți punga cu sigiliul cu fermoar.
 - a. Pentru a asigura un transfer corect, vă rugăm să vă asigurați că lichidul este la fundul tubului și că nu este aderent la partea de sus a tubului sau la folia de sigilare. Loviți cu blândețe fiecare tub de o suprafață dură pentru a vă asigura că întregul tampon se află la fundul tuburilor.

Figura 1. Bandeletă de reactiv BD MAX™ TNA (TNA) de la BD MAX™ ExK TNA-2 kit.



8.3.3. Configurarea instrumentului BD MAX™

- 1) Selectați fila „Work List” (Listă de lucru) din ecranul „Run” al software-ului sistemului BD MAX™, versiunea v4.50A sau mai recentă.
- 2) În meniul defilant „Test”, selectați VIASURE Vancomycin resistance (dacă nu este deja creat, consultați Secțiunea 8.3.1).
- 3) Selectați numărul de lot adecvat al kitului (înscris pe cutia externă a kitului de extracție utilizat) din meniul defilant (opțional).
- 4) Introduceți numărul de identificare al tubului pentru probă cu tampon în câmpul „Sample Tube” (Tub probă) de pe „Work List” (Listă de lucru), fie prin scanarea codului de bare, fie prin introducere manuală.
- 5) Completați câmpul ID probă/pacient și/sau câmpul Număr de ordine în „Work List” (Listă de lucru) și faceți click pe butonul „Save” (Salvează). Continuați până când toate tuburile pentru probă cu tampon sunt introduse. Asigurați-vă că există o potrivire precisă între ID probă/pacient și tuburile pentru probă cu tampon.
- 6) Puneți tubul pentru probă cu tampon pregătit în stativul/stativele BD MAX™.
- 7) Încărcați stativul/stativele în sistemul BD MAX™ (stativul A este poziționat pe partea stângă a sistemului BD MAX™ iar stativul B pe partea dreaptă).
- 8) Puneți numărul necesar de BD MAX™ PCR Cartridge(s) în sistemul BD MAX™.

- 9) Închideți ușa sistemului BD MAX™.
- 10) Dați click pe „Start Run” (Pornește rulare) pentru a începe procedura.

8.3.4. Raportul BD MAX™

- 1) În meniul principal, dați click pe „Results” (Rezultate).
- 2) Fie dați dublu click pe rularea dorită în listă, fie apăsați „view button” (butonul de vizualizare).
- 3) Dați click pe „Print” (Imprimare) și selectați: „Run Details, Test Details and Plot...” (Detalii rulare, detalii test și compilare...)
- 4) Dați click pe „Print or Export button” (Butonul Imprimare sau Export) din ecranul „Run Reports” (Rapoarte rulare)

9. Interpretarea rezultatelor

Pentru o descriere detaliată a modului de analiză a datelor, consultați manualul de utilizare a sistemului BD MAX™.

Analiza datelor este efectuată de către software-ul BD MAX™, conform instrucțiunilor producătorului. Software-ul BD MAX™ raportează valorile Ct și curbele de amplificare pentru fiecare canal detector al fiecărei probe testate, în felul următor:

- valoarea Ct de 0 indică faptul că nu a existat o valoare Ct calculată de către software cu pragul specificat (consultați Tabelul 3). Curba de amplificare a probei care arată o valoare Ct „0” trebuie să fie verificată manual.
- valoarea Ct de -1 indică faptul că nu a avut loc niciun proces de amplificare.
- orice altă valoare Ct trebuie interpretată în corelație cu curba de amplificare și conform îndrumărilor de interpretare a probei, expuse în Tabelul 6.

Verificați semnalul de control intern pentru a verifica corecta funcționare a amestecului de amplificare. În plus, verificați dacă există o raportare de defecțiune a sistemului BD MAX™.

-Rezultatele trebuie să fie citite și analizate folosind următorul tabel:

genă <i>vanA</i> (475/520)	genă <i>vanB</i> (585/630)	Control intern (530/565)	Interpretare
+	+	+/- ¹	ADN gene <i>vanA</i> și <i>vanB</i> detectat ¹
+	-	+/- ¹	ADN genă <i>vanA</i> detectat, ADN genă <i>vanB</i> nedetectat ¹
-	+	+/- ¹	ADN genă <i>vanB</i> detectat, ADN genă <i>vanA</i> nedetectat ¹
-	-	+ ²	ADN gene <i>vanA</i> și <i>vanB</i> nedetectat ²
-	-	- ²	Rezultat Nerezolvat (UNR) obținut în prezența inhibitorilor din reacția PCR sau când intervine o problemă generală (neraportată printr-un cod de eroare) în legătură cu etapele de procesare a probei și/sau amplificarea. ²
IND	IND	IND	Rezultat test Nedeterminat (IND) Datorat defectării sistemului BD MAX™. Rezultat al testului afișat în caz de defectare a instrumentului, asociată unui cod de eroare.
INC	INC	INC	Rezultat test Incomplet (INC). Datorat defectării sistemului BD MAX™ Rezultat al testului afișat în caz de eșec la finalizarea rulării.

Tabelul 6. Interpretarea probei.

+: A avut loc amplificarea

-: Nu a avut loc amplificarea

1 O probă este considerată pozitivă dacă valoarea Ct obținută este mai mică de 40. Controlul intern (IC) poate sau nu să arate un semnal de amplificare. Uneori, detectarea IC nu este necesară deoarece un număr înalt de copii de țintă poate cauza amplificarea preferențială a acizilor nucleici specifici țintei.

2 O probă este considerată negativă dacă proba nu prezintă niciun semnal de amplificare în sistemul de detecție, dar controlul intern este pozitiv (Ct mai mic de 40). O inhibare a reacției PCR poate fi exclusă de amplificarea controlului intern. În cazul rezultatelor nerezolvate (UNR), în absența semnalului controlului intern în proba negativă se recomandă repetarea testului urmând indicațiile de mai jos.

REPETAȚI PROCEDURA DE TESTARE

În cazul unui rezultat ambiguu obținut în mod continuu, se recomandă să se revadă instrucțiunile de utilizare, procesul de extracție folosit de către utilizator; să se verifice corecta performanță a fiecărei etape qPCR și să se revizuiască parametrii; și să se verifice forma sigmoidă a curbei și intensitatea fluorescenței.

NOTĂ: Este disponibil un volum suficient pentru un test repetat din tubul pentru probă cu tampon. Pentru tuburile pentru probă cu tampon BD MAX™ preparate depozitate la 2–8 °C sau 25 °C, retestarea trebuie efectuată în 24 de ore.

NOTĂ: Probele noi pot fi testate în aceeași rulare cu probele repetate.

Rezultatele testului trebuie să fie evaluate de un profesionist din domeniul medical, ținând seama de antecedentele medicale, simptomele clinice și alte teste cu rol diagnostic.

10. Limitările testului

- Rezultatele testului trebuie să fie evaluate de un profesionist din domeniul medical, ținând seama de antecedentele medicale, simptomele clinice și alte teste cu rol diagnostic.
- Deși acest test poate fi utilizat cu alte tipuri de probe, acesta a fost validat cu tampoane perianale și/sau rectale colectate utilizând mediul de transport ESwab™ și suspensie de colonie.
- Pentru o bună performanță a testului, produsul liofilizat trebuie se afle la fundul tubului și să nu fie aderent la partea de sus a tubului sau la folia de sigilare. Loviți cu blândețe fiecare tub de o suprafață dură pentru a vă asigura că toate produsele se află la fundul tuburilor.
- Un aspect al amestecului de reacție în format stabilizat, aflat în mod normal la fundul tubului, care este diferit de cel obișnuit (fără formă conică, neomogen, de dimensiune mai mare/mai mică și cu culoare alta decât alburie) nu afectează funcționalitatea testului.
- Calitatea testului depinde de calitatea probei; trebuie să fie extras acid nucleic de calitate din probele tampoanelor perianale și/sau rectale și colonii.
- Acest test este un test calitativ și nu furnizează valori cantitative, nici nu indică numărul de organisme prezente.
- Pot fi detectate nivele extrem de joase ale țintei, aflate sub limita de detectare, însă rezultatele ar putea să nu fie reproductibile.
- Există posibilitatea unor rezultate fals pozitive datorită contaminării încrucișate de la probele suspecte de rezistență la vancomicină conținând concentrații înalte de ADN țintă sau contaminării datorată produselor PCR provenite de la reacții efectuate anterior.
- Rezultatele fals negative pot apărea datorită mai multor factori și combinațiilor dintre aceștia, incluzând:
 - Metode necorespunzătoare de recoltare, transport, depozitare și/sau manipulare a probelor.
 - Proceduri necorespunzătoare de procesare (inclusiv de extracție a ADN).
 - Degradarea ADN în cursul transportului/depozitării și/sau procesării probei.
 - Mutațiile sau polimorfismele în regiunile de legare ale primerului sau sondei pot afecta detectarea variantelor noi sau necunoscute ale genei *vanA* și/sau genei *vanB*.
 - O încărcare în specimen a organismului rezistent la vancomicină sub limita de detectare a testului.
 - Prezența inhibitorilor qPCR sau a altor tipuri de substanțe interferente.
 - Nerespectarea instrucțiunilor de utilizare și a procedurii de testare.
- Un semnal IC negativ nu exclude prezența ARN-ului genei *vanA* și/sau genei *vanB* într-un specimen clinic.
- Un rezultat pozitiv al testului nu indică neapărat prezența organismului viabil cu rezistență la vancomicină și nu implică faptul că aceste organisme sunt infecțioase sau sunt agenți cauzali ai simptomelor clinice. Totuși, un rezultat pozitiv indică prezența secvențelor țintei rezistentă la vancomicină.
- Rezultatele negative nu exclud infecția cu un organism rezistent la vancomicină și nu trebuie utilizate ca unică bază pentru deciziile de tratament sau de gestionare a pacientului.
- În cazul în care se obțin rezultate Nerezolvat, Nedeterminat sau Incomplet folosind VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, va fi necesară retestarea. Rezultatele Nerezolvat s-ar putea datora prezenței inhibitorilor în probă sau unei incorecte rehidratări a tubului cu amestec de reacție liofilizat. În cazul unei defecțiuni a instrumentului, vor fi obținute rezultatele Nedeterminat sau Incomplet.

11. Controlul de calitate

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit conține un control intern (IC) în fiecare tub de reacție care confirmă efectuarea corectă a tehnicii.

12. Caracteristici de performanță

12.1. Sensibilitate și specificitate clinică

Performanța clinică a VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit a fost testată folosind specimene clinice (tampoane rectale) de la pacienți cu suspiciune de infecție cu VRE. Rezultatele au fost următoarele:

	Centru	Tipul de probă	Flux de lucru	Țintă
1	Microbiologie clinică, Centrul pentru boli infecțioase și servicii de laborator de microbiologie, NSW Health Pathology, Westmead Hospital (Sydney, Australia)	Tampon rectal	BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System	Gena <i>VanA</i>
				Gena <i>VanB</i>
				Gene <i>VanA</i> + <i>VanB</i>

Tabelul 7. Situația, tipul de probă, fluxul de lucru și țintă.

Valorile adevărat pozitive și negative, valorile fals pozitive și negative, valorile pentru sensibilitate și specificitate pentru VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit au fost calculate în raport cu fiecare test comparativ așa cum se arată în tabelul următor:

Centru	Test comparativ	Țintă	TP	TN	FP	FN	Sensibilitate	Specificitate
1	PCR VRE (Westmead – WMD) realizat intern	<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%)

Tabelul 8. Valorile adevărat pozitive (TP) și negative (TN), valorile fals pozitive (FP) și negative (FN), valorile pentru sensibilitate și specificitate pentru VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Rezultatele indică un nivel înalt de acord la detectarea genelor *vanA* și *vanB* utilizând VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

În plus, a fost calculată rata de eșec la controlul procesării probei. Numărul inițial al reacțiilor nerezolvate (UNR) a fost 3 (rata UNR inițială: 1,39%). Numărul UNR după repetare a fost 0 (rata finală a UNR: 0,00%).

Pentru a evalua compatibilitatea VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit adaptat pentru BD MAX™ cu alte probe, cu matrici diferite, a fost efectuată o evaluare pentru detectarea suspensiilor de colonii de enterococi rezistenți la vancomicină.

Au fost preparate diferite suspensii de colonii prin adăugarea a două colonii dintr-o cultură determinată, în 500 µl de apă fără nucleaze. Tulpinile utilizate pentru această evaluare au fost CECT 5253 *Enterococcus faecium* vanA, CECT 8120 *Enterococcus faecalis* vanB, NCTC 12201 *Enterococcus faecalis* vanA și NCTC 13632 *Enterococcus faecalis* vanA. A fost adăugat un volum de 10 µl din fiecare suspensie de colonie direct în tubul pentru probă cu tampon. Diagrama utilizată pentru efectuarea acestei evaluări a fost: BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System.

Rezultatele obținute au arătat că suspensiile de colonii pentru CECT 5253, NCTC 12220 și NCTC 13632 au fost pozitive pentru gena vanA iar suspensia de colonii pentru CECT 8120 a fost pozitivă pentru gena vanB.

Aceste rezultate arată că VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit poate detecta în mod corespunzător genele vanA și vanB în suspensiile de colonii.

12.2. Sensibilitate analitică

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit are o limită de detecție de ≥ 4 unități formatoare de colonii per reacție (UCF/reacție) pentru vanA și ≥ 10 unități formatoare de colonii per reacție (UFC/reacție) pentru vanB (Figurile 2 și 3), cu o rată de pozitivare de $\geq 95\%$ pentru tampoanele perianale și rectale.

Figura 2. Modelul de rulare pentru seriile de diluție ale genei vanA ($3,62 \times 10^4$ - $3,62$ UCF/reacție) pe sistemul BD MAX™ (canal 475/520 (FAM)).

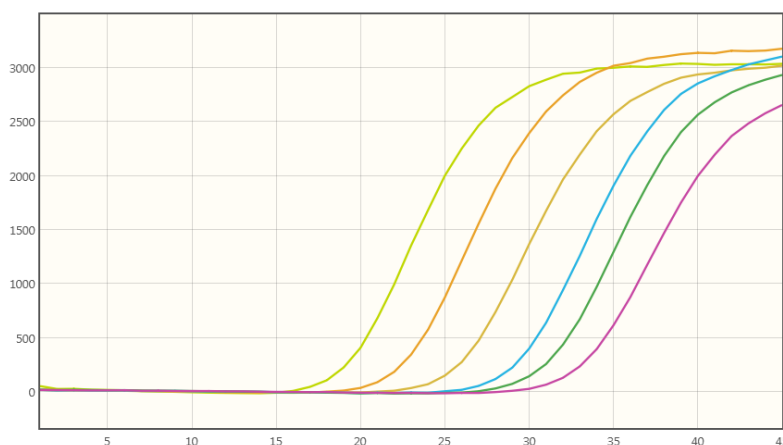
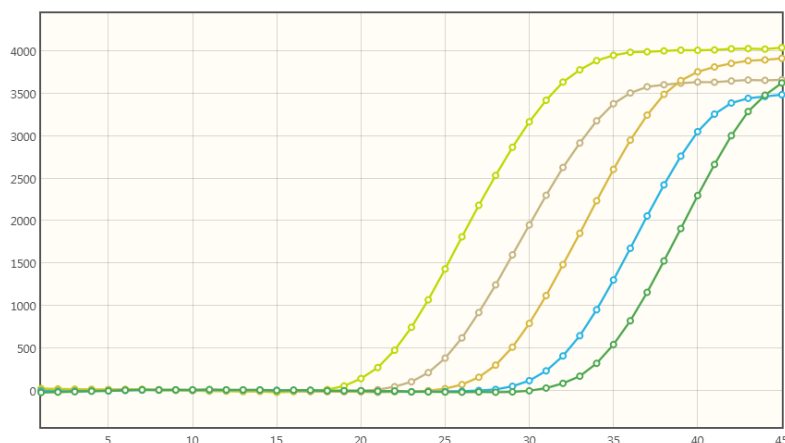


Figura 3. Modelul de rulare pentru seriile de diluție ale genei *vanB* ($5,65 \cdot 10^4$ - $9,98$ UCF/reacție) pe sistemul BD MAX™ System (canal 585/630 (ROX)).



12.3. Specificitate analitică

Specificitatea testului pentru rezistență la vancomicină a fost confirmată prin testarea unui panel constând din diferite organisme rezistente la antimicrobiene și diferite microorganisme care reprezintă cei mai frecvenți patogeni enterici sau floră prezentă în intestin. Nu a fost detectată nicio reactivitate încrucișată între oricare dintre următoarele microorganisme testate, cu excepția patogenilor țintiți de fiecare test:

Testarea reactivității încrucișate					
Adenovirus serotipuri 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	Izolot de <i>Klebsiella pneumonia</i> producătoare de TEM-1 (fără ESBL), SHV-1 (fără ESBL), CTX-M-2 (ESBL), și KPC-2	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> tip <i>vanC</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> tip <i>vanC2</i>	-	Norovirus GI și GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrovirus genotipul I-VIII	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tip <i>vanA</i>	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> tip <i>vanB</i>	- / +	Rotavirus A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> tip <i>vanA</i>	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> tip <i>vanB</i>	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> tip <i>vanB</i> și <i>vanC</i>	- / +	<i>Salmonella paratyphi</i> A	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> tip <i>vanC</i>	-	<i>Salmonella paratyphi</i> B	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> tip <i>vanC1</i>	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Escherichia coli</i> enterohemoragic	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Izolot de <i>Citrobacter braakii</i> producătoare de VIM-1	-	<i>Escherichia coli</i> enteroinvaziv	-	Sapovirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Escherichia coli</i> enteropatogenic	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Izolot complex de <i>Citrobacter freundii</i> producătoare de KPC-3 și VIM-4	-	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigenic	-	Izolot de <i>Serratia marcescens</i> producătoare de OXA-48	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	Izolot de <i>Escherichia coli</i> producătoare de OXA-244	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	Izolot de <i>Escherichia coli</i> producătoare de TEM-1 (fără ESBL) și 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> rezistent la metilina (mecC)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Tulpină N315 de <i>Staphylococcus aureus</i> rezistent la metilina (MRSA)	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> rezistent la metilina (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Tulpină de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) (oxa ^R , PVL-pozitiv, tip spa t310)	-
Izolat de <i>Enterobacter cloacae</i> producătoare de SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) și OXA-48	-	<i>Helicobacter pylori</i> rezistentă la claritromicina (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
Izolat de <i>Enterobacter cloacae</i> producătoare de TEM-1 (fără ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) și NDM-1	-	<i>Helicobacter pylori</i> rezistentă la claritromicina (23S rDNA A2146G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Izolat complex de <i>Enterobacter cloacae</i> producătoare de NDM-7	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Enterococcus avium</i> tip vanA	+ / -	Izolat de <i>Klebsiella pneumoniae</i> producătoare de SHV-1 (fără ESBL), KPC-3 și OXA-48	-		

Tabelul 9. Microorganisme patogene de referință utilizate în acest studiu.

12.4. Reactivitate analitică

Reactivitatea VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit pentru gena *vanA* a fost evaluată în raport cu ADN extras de la tulpinile de *Enterococcus avium* tip *vanA*, *Enterococcus faecalis* tip *vanA* (NCTC 13632, NCTC 12201) și *Enterococcus faecium* tip *vanA* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202), prezentând rezultat pozitiv.

Reactivitatea VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit pentru gena *vanB* a fost evaluată în raport cu ADN extras de la tulpinile de *Enterococcus faecalis* tip *vanB* (ATCC 51299, CECT 8120), *Enterococcus faecium* tip *vanB* (IOWA 2) și *Enterococcus gallinarum* tip *vanB* și tip *vanC*, (ENT20120142), prezentând rezultat pozitiv.

Bibliography/Bibliografie

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/ Simboluri pentru componentele și reactivii IVD

 IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device Dispozitiv de diagnostic <i>in vitro</i>	 Keep dry A se păstra la loc uscat	 Use by Data de expirare	 Manufacturer Producător	 LOT Batch code Cod lot
 i	Consult instructions for use Consultați instrucțiunile de utilizare	 Temperature limitation Limite de temperatură	 Contains sufficient for <n> test Conținut suficient pentru <n> teste	 UDI Unique Device Identification Identificator unic al dispozitivului	 REF Catalogue number Număr de catalog

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 / Controlul modificărilor		
Version n° / Versiunea nr.	Changes / Modificări	Date / Dată
00	Unification of all instructions for use associated with the different catalogue references in a single format / Unificarea tuturor instrucțiunilor de utilizare asociate cu diferitele referințe de catalog într-un singur format.	21/06/2021

Table A 2. Control change table / Tabel de control al modificărilor.

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

