

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Vancomycin resistance
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Dessa bruksanvisningar gäller för följande referens:

PRODUCT / PRODUKTO	REFERENCE / REFERENS
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. / Referens för produkt som ska användas med BD MAX™-systemet.

Content

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

Innehåll

1.	Avsedd användning	19
2.	Sammanfattning och förklaring.....	19
3.	Pocedurprincip.....	20
4.	Medföljande reagenser.....	20
5.	Reagenser och utrustning som ska tillhandahållas av användaren.....	20
6.	Transport- och förvaringsförhållanden	21
7.	Försiktighetsåtgärder.....	21
8.	Testa förfarande.....	22
8.1.	Insamling, förvaring och transport av prover	22
8.2.	Provberedning och DNA-extraktion	23
8.3.	PCR-protokoll.....	23

9.	Resultatfolkning	26
10.	Testets begränsningar.....	28
11.	Kvalitetskontroll	29
12.	Prestandaegenskaper	29
12.1.	Klinisk sensitivitet och specificitet	29
12.2.	Analytisk sensitivitet	30
12.3.	Analytisk specificitet.....	31
12.4.	Analytisk reaktivitet	32
	Bibliography/Bibliografi.....	33
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboler för IVD-komponenter och reagenser.....	33
	Trademarks.....	33

ENGLISH

1. Intended use

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

2. Summary and Explanation

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

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

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

The first type of vancomycin resistance in enterococci is intrinsic resistance (i.e. associated with *vanC* gene). Isolates of *Enterococcus gallinarum* and *E. casseliflavus/E. 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.

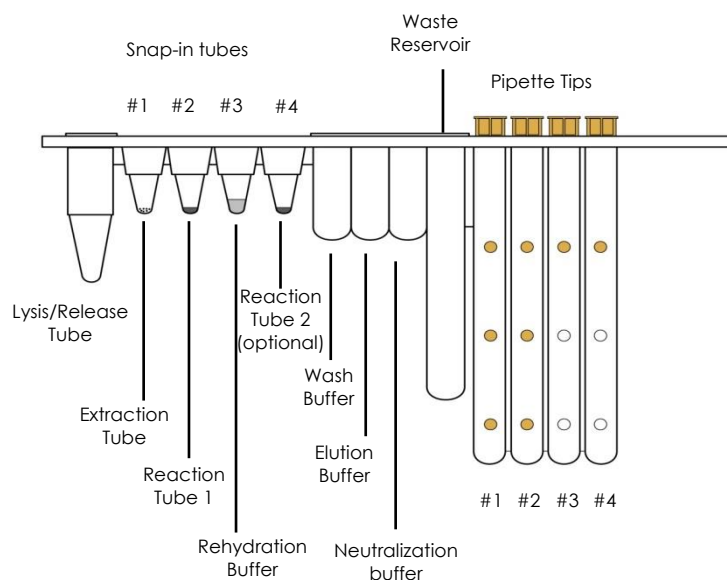
- 12) Click the "Save Test" button.

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).

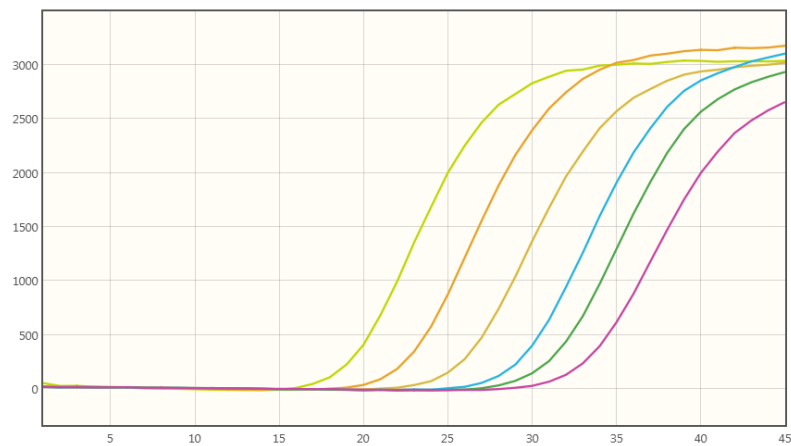
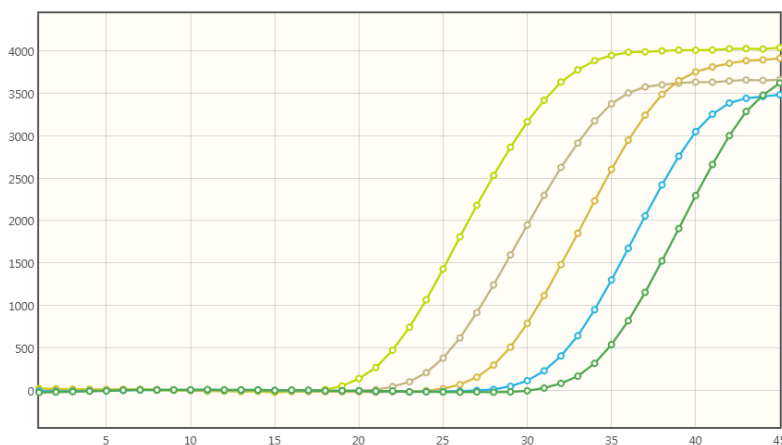


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene (5.65×10^4 - 9.98 CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



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.

SVENSKA

1. Avsedd användning

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit är utformat för specifik detektion och differentiering av *vanA*- och *vanB*-genen som kan associeras med vankomycin-resistenta enterokocker (VRE) direkt från perianala och/eller rektala svabbprover och kolonier. Detta test är avsett att användas som en hjälp för identifiering av vankomycin-resistenta organismer i kombination med patientens kliniska tecken och symtom samt epidemiologiska riskfaktorer. Analysen använder BD MAX™-systemet för automatiserad extraktion av DNA och efterföljande reallids-PCR som använder medföljande reagenser kombinerade med universella reagenser och engångsartiklar för BD MAX™-systemet. DNA från perianala och/eller rektala svabbprover och kolonier detekteras med användning av fluorescerande rapportörfärgprober som är specifika för *vanA*- och *vanB*-genen.

2. Sammanfattning och förklaring

Enterokocker är vanliga kommensala organismer som finns i magtarmkanalen och kvinnans könsorgan. Nyligen påvisades de vara opportunistiska patogener som orsakar vårdrelaterade infektioner såsom infektioner i urinvägar, hud, andningsvägar, endokardit och sepsis i en komprometterad värd.

Vankomycin är ett glykopeptidantibiotikum som hämmar cellväggssyntes och används för att behandla allvarliga infektioner med grampositiva bakterier. Vankomycin-resistenta enterokocker (VRE) rapporterades för första gången i England och Frankrike 1986 och sprids nu på sjukhus över hela världen.

Resistensen mot vankomycin är en komplex process och den behöver förekomst av olika genkluster. De kan huvudsakligen delas in i två typer beroende på pentapeptidprekursorer som bildas av vankomycin-resistenta gener: prekursor som slutar med D-alanin-D-serin (*VanC*-, *VanE*-, *VanG*-, *VanL*- och *VanN*-typ) eller som slutar med D-alanin-D-laktat (*VanA*-, *VanB*-, *VanD*- och *VanM*-typ). Dessa pentapeptidprekursorer uppvisade låg affinitet för glykopeptider och tilldelade vankomycin-resistens till enterokocker.

Den första typen av vankomycin-resistens för enterokocker är inneboende resistens (dvs. associerad med *vanC*-genen). Isolat av *Enterococcus gallinarum* och *E. casseliflavus/E. flavescens* uppvisar en ärftlig lågnivåresistens mot vankomycin. Den andra typen är förvärvad resistens (dvs. *vanA*- eller *vanB*-genen) och enterokocker kan bli resistenta genom förvärv av mobila genetiska element (transposoner och plasmider) från en annan *Enterococcus*-art eller organism. Vanligtvis påvisas denna resistens i *E. faecium* och *E. faecalis* men även i *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* och flera andra enterokockarter. *vanA*- och *vanB*-genen är ansvariga för höga eller måttliga nivåer av vankomycin-resistens.

Överföring av vankomycin-resistenta enterokocker (VRE) kan inträffa genom direkt kontakt med kroppsvätskor från koloniserade eller infekterade patienter (bland annat blod, sårsvätska, urin, avföring och septum) eller genom indirekt kontakt via sjukvårdspersonals händer eller via kontaminerad vårdutrustning eller kontaminerade ytor.

I början tillämpades en odlingsbaserad screeningmetod som är tidskrävande och i allmänhet tar från en till fem dagar att slutföra. Reallids-PCR-analyser har visat sig vara ett verktyg för detektionen av kliniskt relevanta gener associerade med vankomycin-resistens.

3. Pocedurprincip

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit är utformat för identifiering och differentiering av DNA från vankomycin-resistenta enterokocker och andra organismer som bär på vankomycin-resistensgenen *vanA* och *vanB*. Efter DNA-isolering utförs identifiering av vankomycin-resistens genom amplifiering av en konserverad region av *vanA*- och *vanB*-genen med användning av specifika primrar och en fluorescensmärkt prob.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit baseras på 5'-exonukleasaktivitet av DNA-polymeras. Under DNA-amplifiering klyver detta enzym proben som är bunden till den komplementära DNA-sekvensen vilket separerar quencher-färgen (släckare) från rapportören. Denna reaktion genererar en ökning av fluorescenssignalen som är proportionell mot mängden av målmall. Denna fluorescens mäts på BD MAX™-systemet.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit innehåller i varje rör alla komponenter som är nödvändiga för reelltids-PCR-analys (specifika primrar/prober, dNTP (deoxynukleosidtrifosfater), buffert, polymeras) i en stabiliserad form samt en intern kontroll för att övervaka extraktionsprocessen och/eller inhiberingen av polymerasaktivitet.

Mål	Kanal	Gen
vankomycin-resistensgenen	475/520	<i>vanA</i>
vankomycin-resistensgenen	585/630	<i>vanB</i>
Intern Konyttoll (IC)	530/565	-

Tabell 1. Mål, kanal och genen.

4. Medföljande reagenser

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit omfattar följande material och reagenser som anges i tabell 2:

Reagens/Material	Beskrivning	Streckkod	Mängd
<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube	En blandning av enzymer, primrar, prober, buffert, dNTP, stabiliserande medel och intern kontroll i stabiliserad form	1B-folie	2 påsar med 12 genomskinlig rör
Rehydration Buffer tube	Lösning för att bereda den stabiliserade produkten	11-folie	1 påse med 24 genomskinlig rör

Tabell 2. Reagens och material som medföljer VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit med kat nr. VS-VAN124 (444202).

5. Reagenser och utrustning som ska tillhandahållas av användaren

Följande lista omfattar material och utrustning som krävs för användning men som inte medföljer VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit.

- Realtids-PCR-instrument: BD MAX™-system.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref:442825 eller 442826).

- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortexblandare.
- Mikropipetter (noggrannhet mellan 2 och 1 000 µl).
- Nukleasfritt vatten.
- Filterspetsar.
- Puderfria engångshandskar.

6. Transport- och förvaringsförhållanden

- Satserna kan transporteras och förvaras vid 2–40 °C fram till utgångsdatumet som anges på etiketten.
- Efter öppnande kan aluminiumpåsarna som innehåller reaktionsrören användas i upp till 28 dagar.

7. Försiktighetsåtgärder

- Produkten är avsedd att endast användas av yrkesmässiga användare som t.ex. laboratoriepersonal, sjukvårdspersonal och tekniker som har utbildning i molekylärbiologiska tekniker.
- För *in vitro*-diagnostik.
- Använd inte utgångna reagenser och/eller utgången material.
- Använd inte satsen om etiketten som förseglar den yttre lådan är bruten.
- Använd inte reagenser om den skyddande lådan är öppen eller förseglingen är bruten vid ankomst.
- Använd inte reagenser om de skyddande påsarna är öppna eller förseglingen är bruten vid ankomst.
- Använd inte reagenser om torkmedel inte finns eller inte har fungerat i reagenspåsarna.
- Ta inte ut torkmedel från reagenspåsarna.
- Stäng reagensernas skyddande påsar med blixtlåsförseglingen direkt efter varje användning. Avlägsna eventuell luft i påsarna före försegling.
- Använd inte reagenser om folien är bruten eller skadad.
- Blanda inte reagenser från olika påsar och/eller satser och/eller partier.
- Skydda reagenser från fukt. Längre tids exponering för fukt kan påverka produktprestanda.
- Förvara komponenter borta från ljus.
- I fall då andra PCR-tester utförs i samma allmänna område av laboratoriet måste varsamhet iakttas för att säkerställa att VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit, ytterligare reagenser som krävs för testning och BD MAX™-systemet inte är kontaminerade. Undvik alltid kontamination av reagenser från mikroorganismer och ribonukleas (RNAs)/deoxyribonukleas (DNAs). Användning av sterila, RNAs/DNAs-fria och aerosolresistenta pipettspetsar eller pipettspetsar av typen positiv förskjutning ("positive displacement"). Använd en ny spets för varje prov. Skyddshandskar måste bytas före hantering av reagenser och kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Bryt inte itu PCR kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge) efter användning för att undvika kontamination av miljön från amplikoner. Tätningarna på PCR kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge) är utformade för att förhindra kontamination.
- Utforma ett enkelriktat arbetsflöde. Det bör börja i extraktionsområdet och sedan flytta till amplifierings- och detektionsområdet. Flytta inte prover, utrustning och reagenser tillbaka till området där det föregående steget utfördes.

- Följ god laboratoriesed. Bär skyddskläder, använd engångshandskar, skyddsglasögon och mask. Ät inte, drick inte, rök inte eller används inte kosmetiska produkter i arbetsområdet. Tvätta händerna efter att testet har slutförts.
- Prover måste behandlas som potentiellt smittsamma och / eller biofarligt precis som alla reagenser och material som har exponerats för proverna och de måste hanteras enligt nationella säkerhetsbestämmelser. Vidta nödvändiga försiktighetsåtgärder vid insamling, transport, förvaring, behandling och kassering av prover.
- Prover och reagenser måste hanteras i ett biologiskt säkerhetsskåp. Använd personlig skyddsutrustning (PS) som uppfyller aktuella riktlinjer för hantering av potentiellt smittsamma prover. Kassera avfall enligt lokala och nationella bestämmelser.
- Regelbunden dekontaminering av vanligt använd utrustning rekommenderas, särskilt mikropipetter och arbetsytor.
- I enlighet med direktiv (EG) nr 1907/2006 (REACH), "VIASURE Real Time PCR Detection Kits" kräver inte materialsäkerhetsdatablad (Safety Data Sheets), pga. deras klassificering som ofarliga för hälsa och miljö, eftersom de inte innehåller ämnen och/eller blandningar som uppfyller kriterierna i direktiv (EG) nr 1272/2008 (CLP) eller som förekommer i koncentrationer högre än värdet som etablerats i nämnda direktiv för deras deklaration.
- Se användarhandboken för BD MAX™-systemet för ytterligare varningar, försiktighetsåtgärder och procedurer.

8. Testa förfarande

8.1. Insamling, förvaring och transport av prover

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit har validerats för perianala och/eller rektala svabbprover som omedelbart har placerats i ESwab™-transportmedium (flytande Amies-baserat insamlings- och transportsystem) (Copan, Italien). VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit har även validerats med kolonisuspension. Andra typer av prover måste valideras av användaren.

Insamling, förvaring och transport av prover ska ske enligt villkoren som validerats av användaren. I allmänhet ska perianala och/eller rektala svabbprover samlas in och märkas på lämpligt sätt i rent ESwab™-transportmedium och bearbetas så snart som möjligt för att garantera testets kvalitet. Proverna får transporteras vid 2 till 8 °C i upp till 24 timmar enligt lokala och nationella bestämmelser för transporten av patogent material. För långvarig transport (mer än 24 timmar) rekommenderar vi transport vid ≤ -20 °C eller lägre. Det rekommenderas att använda färskta prover för testet. Proverna kan förvaras vid 25 °C i upp till 24 timmar, 2 till 8 °C i upp till 144 timmar (6 dagar) eller fryst vid -20 °C i upp till 192 timmar (8 dagar) eller frysta vid -70 °C för bevarande. Upprepade nedfrysningar och upptiningar bör undvikas för att förhindra nedbrytning av provet och nukleinsyorna.

Avföringsproverna måste samlas in, transporteras och förvaras enligt lämpliga laboratorieriktlinjer. Se CDC guideline för mer information (Specimen collection guidelines. Webbplats <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) och IDSA-riktlinje (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: uppdaterad 2018 av Infectious Diseases Society of America och American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

8.2. Provberedning och DNA-extraktion

Utför provberedning enligt rekommendationerna i bruksanvisningen för extraktionssatsen som används, BD MAX™ ExK™ TNA-2. Observera att vissa andra prover kan kräva förbearbetning. Tillämpningsspecifika procedurer för extraktionsförberedelse ska utvecklas och valideras av användaren.

1. Copan ESwab™: Pipettera 200 µl ESwab™-provet i ett BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube och stäng röret med ett membranlock. Säkerställ fullständig blandning genom att vortexa provet vid hög hastighet i en minut. Fortsätt till drift av BD MAX™ System Operation.
2. Kolonier: Plocka upp två kolonier från odlingsmediet och suspendera dem i 500 µl nukleasfritt vatten. Säkerställ fullständig blandning genom att vortexa. Tillsätt 10 µl av suspensionen i ett BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube och stäng röret med ett membranlock. Säkerställ fullständig blandning genom att vortexa provet vid hög hastighet i en minut. Fortsätt till drift av BD MAX™ System Operation.

8.3. PCR-protokoll

Obs! Se användarhandboken för BD MAX™-systemet för detaljerade anvisningar.

8.3.1. Skapa PCR-testprogram för VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

Obs! Om du redan har skapat testet för VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, kan du hoppa över steg 8.3.1 och gå direkt till 8.3.2.

- 1) Välj fliken "Test Editor" (Testredigerare) på BD MAX™-systemets skärm "Run" (Kör).
- 2) Klicka på knappen "Create" (Skapa).
- 3) Döp testet, dvs. VIASURE Vancomycin resistance i fönstret "Test Name" (Testnamn) på fliken för grundläggande information.
- 4) Välj "ExK TNA-2" i listrutan "Extraction Type" (Extraktionstyp).
- 5) Välj "Type 5" (Typ 5) i listrutan "Master Mix Format" (Masterblandningsform).
 - a. Obs! Produkten kan användas i kombination med ett ytterligare VIASURE for BD MAX™-test och välj då "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel masterblandning – koncentrerad frystorkad masterblandning med rehydreringsbuffert (typ 5)).
- 6) Välj "User defined" (Användardefinierad) i "Sample extraction parameters" (Provextraktionsparametrar) och justera provvolymen till 500 µl.
- 7) Välj "Call Ct at Threshold Crossing" (Hämta Ct vid tröskelvärdesgräns) i "Ct Calculation" (Ct-beräkning).
- 8) Välj följande konfiguration i "Custom Barcodes" (Anpassa streckoder) om du kör programvaruversion 5.00 eller senare:
 - a. "Snap-In 2 Barcode" (Streckkod för rör 2): 1B (gällande Vancomycin resistance reaction tube).
 - b. "Snap-In 3 Barcode" (Streckkod för rör 3): 11 (gällande Rehydration Buffer tube).

- c. "Snap-In 4 Barcode" (Streckkod för rör 4): en annan VIASURE reaction tube (annan folie) om du väljer formen "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel masterblandning – koncentrerad frystorkad masterblandning med Rehydration Buffer (typ 5)) (avsnitt 8.3.1).

- 9) Ange följande parametrar på fliken "PCR settings" (PCR-inställningar): "Channel Settings" (Kanalinställningar), "Gains" (Förstärkningar) och "Threshold" (Tröskelvärde) (tabell 3).

- a. Obs! Produkten kan användas i kombination med ett ytterligare VIASURE för BD MAX-test och PCR-inställningar och teststeg ska slutföras för positionerna för rör 2 (grön) och rör 4 (blå).

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

Tabell 3. PCR settings (PCR-inställningar).

Obs! Det rekommenderas att ställa in minimitröskelvärdena som anges ovan för varje kanal som en startpunkt men de slutliga inställningarna måste fastställas av slutanvändaren under resultatuttolkningen för att säkerställa att tröskelvärdena faller inom fluorescenskurvornas exponentiella fas och över eventuell bakgrundssignal. Tröskelvärdet för olika instrument kan variera på grund av olika signalintensiteter.

- 10) Ange även följande parametrar "Spectral Cross Talk" (Spektral överhörning) på fliken "PCR settings" (PCR-inställningar) (tabell 4).

		False Receiving Channel (Falsk mottagarkanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Excitationskanal)	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0	
	530/565	0.0	-	0.0	0.0	0.0	
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0	
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0	
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-	

Tabell 4. Parametrar "Spectral cross-talk" (spektral överhörning).

- 11) Ange PCR-protokollet på fliken "Test Steps" (Teststeg) (tabell 5).

Step Name (Stegnamn)	Profile Type (Profiltyp)	Cycles (Cykler)	Time (s) (Tid (s))	Temperature (Temperatur)	Detect (Detektion)
Initial denaturation (Inledande denaturering)	Uppehåll	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing (Denaturering och hybridisering) / Extension (Data collection) (förlängning (datainsamling))	2-Temperatur	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

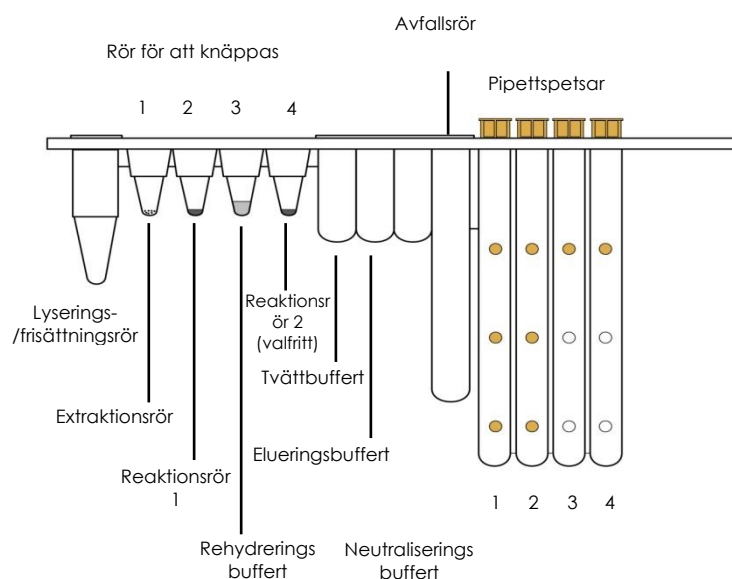
Tabell 5. PCR-protokoll.

- 12) Klicka på knappen "Save Test" (Spara test).

8.3.2. Installation av BD MAX™-ställ

- 1) För varje prov som ska testas ska du ta ut en sammansatt reagensremsa från BD MAX™ ExK TNA-2 kit. Knacka försiktigt varje remsa mot en hård yta för att säkerställa att alla vätskor finns på rörens botten och ladda den på BD MAX™-systemets provrörsställ.
- 2) Ta ut nödvändigt antal BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (vit folie) från den skyddande påsen. Knäpp fast extraktionsrören (vit folie) på motsvarande positioner på TNA-remsan (rörposition 1, vit färgkodning på stället, se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng påsen med blixtlåsförseglingen.
- 3) Bestäm och separera lämpligt antal *Vancomycin resistance reaction tubes* (1B folie) och knäpp fast dem på motsvarande positioner på remsan (rörposition 2, grön färgkodning på stället, se figur 1).
 - a. Avlägsna överskott av luft och stäng aluminiumpåsarerna med blixtlåsförseglingen.
 - b. Utför en korrekt rehydrering genom att se till att den frystorkade produkten finns på rörets botten och att den inte klibbar fast på rörets övre del eller på folieförseglingen. Knacka försiktigt varje rör mot en hård yta för att se till att all produkt hamnar på botten av röret.
 - i. Obs! Om du väljer formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel masterblandning – koncentrerad frystorkad masterblandning med återhydreringsbuffert (typ 5)) (avsnitt 8.3.1) ska du bestämma och separera lämpligt antal ytterligare VIASURE-reaktionsrör (annan folie) och knäppa fast dem på motsvarande positioner på remsan (rörposition 4, blå färgkodning på stället, se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng aluminiumpåsarerna med blixtlåsförseglingen.
- 4) Ta ut lämpligt antal Rehydration Buffer tubes (1I folie) och knäpp fast rören på motsvarande positioner på remsan (rörposition 3, färglös kodning på stället, se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng påsen med blixtlåsförseglingen.
 - a. Utför en korrekt överföring genom att se till att vätskan finns på rörets botten och att den inte klibbar fast på rörets övre del eller på folieförseglingen. Knacka försiktigt varje rör mot en hård yta för att se till att all produkt hamnar på botten av röret.

Figura 1. BD MAX™ TNA-reagensremsa (TNA) från BD MAX™ ExK™ TNA-2 kit.



8.3.3. Inställning av BD MAX™-instrument

- 1) Välj fliken "Work List" (Arbetslista) på skärmen "Run" (Kör) i BD MAX™-systemets programvara v4.50A eller senare.
- 2) I listrutan "Test" (Test) väljer du VIASURE *Vancomycin resistance* (se avsnitt 8.3.1 om det inte redan har skapats).
- 3) Välj lämpligt satslotnummer (finns angivet på den använda extraktionssatsens ytterlåda) från listrutan (valfritt).
- 4) Ange provbuffertrörets identifikationsnummer i fönstret för provrör i arbetslistan, antingen genom att läsa av streckkoden med en streckkodsläsare eller genom manuell inmatning.
- 5) Fyll i fönstret för prov-/patient-ID och/eller accession i arbetslistan och klicka på knappen "Save" (Spara). Fortsätt tills alla provbuffertrör har angivits. Säkerställ att prov-/patient-ID och provbuffertrör nogga överensstämmer.
- 6) Placera det förberedda provbuffertröret i BD MAX™-stället.
- 7) Ladda stället/ställen i BD MAX™-systemet (ställ A är positionerat på BD MAX™-systemets vänstra sida och ställ B på dess högra sida).
- 8) Placera lämpligt antal BD MAX™ PCR Cartridge (s) i BD MAX™-systemet.
- 9) Stäng BD MAX™-systemets lucka.
- 10) Klicka på "Start Run" (Starta körning) för att påbörja proceduren.

8.3.4. BD MAX™-rapport

- 1) Klicka på knappen "Results" (Resultat) i huvudmenyn.
- 2) Antingen dubbelklicka på din körning i listan eller tryck på "visningsknappen".
- 3) Klicka på "Print" (Skriv ut) och välj: "Run Details, Test Details and Plot..." (Körningsinformation, testinformation och kurva ...).
- 4) Klicka på knappen "Print or Export" (Skriv ut eller exportera) på skärmen "Run Reports" (Körningsrapport).

9. Resultattolkning

Se användarhandboken för BD MAX™-systemet för en detaljerad beskrivning av dataanalys.

Dataanalys utförs av BD MAX™-programvaran enligt tillverkarens anvisningar. BD MAX™-programvaran rapporterar Ct-värden och amplifieringskurvor för varje detektorkanal för varje testat prov på följande sätt:

- Ct-värde på 0 anger att det inte fanns något Ct-värde beräknat av programvaran med det specificerade tröskelvärdet (se tabell 3). Amplifieringskurvan för provet med ett Ct-värde på 0 måste kontrolleras manuellt.
- Ct-värde på -1 anger att ingen amplifieringsprocess har inträffat.
- Ett annat Ct-värde ska tolkas i korrelation med amplifieringskurvan och enligt riktlinjerna för provtolkning som finns i tabell 6.

Kontrollera signalen för den interna kontrollen för att bekräfta korrekt funktion av amplifieringsblandningen. Kontrollera dessutom att det inte föreligger någon rapport om BD MAX™-systemfel.

– Resultat bör avläsas och analyseras med hjälp av följande tabell:

vanA-gen (475/520)	vanB-gen (585/630)	Intern kontroll (530/565)	Tolkning
+	+	+/- ¹	vanA och vanB-gener DNA detekterad¹
+	-	+/- ¹	vanA-gen DNA detekterad, vanB-gen DNA inte detekterad¹
-	+	+/- ¹	vanB-gen DNA detekterad, vanA-gen DNA inte detekterad¹
-	-	+ ²	vanA och vanB-gener DNA inte detekterad²
-	-	- ²	Olösta resultat (UNR) erhålls när det förekommer inhibitorer i PCR-reaktionen eller när ett allmänt problem (som inte rapporterats av en felkod) inträffar under bearbetningen av provet och/eller amplifieringen².
IND	IND	IND	Obestämt analysresultat (IND). Beror på fel i BD MAX™-systemet. Analysresultat som visas vid instrumentfel som är kopplade till en felkod.
INC	INC	INC	Ofullständigt analysresultat (INC). Beror på fel i BD MAX™-systemet. Analysresultat som visas om körningen inte kan slutföras.

Tabell 6. Provtolkning

+: Amplifiering inträffade

–: Ingen amplifiering inträffade

1 Ett prov anses vara positivt om Ct-värdet som erhålls är lägre än 40. Den interna kontrollen kan visa eller visar inte en amplifieringssignal eftersom ett högt kopianantal av målet kan orsaka föredragen amplifiering av målspecifika nukleinsyror i stället för den interna kontrollen. I dessa fall är detektion av den interna kontrollen inte nödvändig.

2 Ett prov anses vara negativt om provet inte visar någon amplifieringssignal i detektionssystemet men den interna kontrollen är positiv (Ct lägre än 40). En inhibering av PCR-reaktionen kan uteslutas genom amplifieringen av den interna kontrollen. I fall av olösta resultat (UNR), frånvaro av signal för den interna kontrollen i negativa prover, rekommenderas att analysen upprepas genom att följa nedanstående indikationer.

UPPREPA TESTPROCEDUR

Det rekommenderas att konsultera bruksanvisningen, granska extraktionsprocessen som används av användaren, bekräfta korrekt prestanda för varje RT-qPCR-steg och granska parametrarna samt kontrollera den sigmoida formen på kurvan och fluorescensintensiteten om ett tvetydigt resultat fortsätter att visas.

OBS! Tillräcklig volym finns tillgänglig för ett upprepat test från provbuffertröret. Upprepad testning måste utföras inom 24 timmar för beredda BD MAX-provbuffertrör som förvaras vid 2–8 °C eller 25 °C.

OBS! Nya prover kan testas i samma körning med upprepade prover.

Resultat av testet bör utvärderas av sjukvårdspersonal med beaktande av medicinsk anamnes, kliniska symtom och andra diagnostiska tester.

10. Testets begränsningar

- Resultat av testet bör utvärderas av sjukvårdspersonal med beaktande av medicinsk anamnes, kliniska symtom och andra diagnostiska tester.
- Även om denna analys kan användas med andra typer av prover, har den validerats med perianala och/eller rektala svabbprover tagna med användning av ESwab™-transportmedium och kolonisuspension.
- Den frystorkade produkten ska finnas i botten av röret för god testprestanda och inte häfta fast vid rörets överdel eller folieförseglingen. Knacka försiktigt varje rör mot en hård yta för att se till att all produkt hamnar på botten av röret.
- Testets funktion påverkas inte om reaktionsblandningen i stabiliserad form, vanligtvis i botten av röret, inte ser ut som vanligt (utan konisk form, icke-homogen, mindre/större i storlek och/eller annan färg än vit).
- Testets kvalitet beror på provets kvalitet. Extraktion av nukleinsyra från perianala och/eller rektala svabbprover och kolonier måste ske på lämpligt sätt.
- Testets kvalitet beror på provets kvalitet. Extraktion av nukleinsyra från luftvägsprover måste ske på lämpligt sätt.
- Extremt låga nivåer av mål under detektionsgränsen kan detekteras men resultaten är kanske inte reproducerbara.
- Det finns en risk för falskt positiva resultat på grund av korskontamination av prover som misstänks innehålla vankomycin-resistens med höga koncentrationer av mål-DNA eller kontamination på grund av PCR-produkter från tidigare reaktioner.
- Falskt negativa resultat kan inträffa på grund av flera faktorer och deras kombinationer, inklusive:
 - Olämplig insamling, transport, förvaring och/eller hantering av prover.
 - Olämpliga processförfaranden (inklusive DNA-extraktion).
 - Nedbrytning av DNA under provtransport-/förvaring och/eller bearbetning.
 - Mutationer eller polymorfismer i primer- eller probbindande regioner kan påverka detektion av nya eller okända vanA-gen- och / eller vanB-genvarianter.
 - En belastning med vankomycinresistensorganism i provet under analysens detektionsgräns.
 - Förekomsten av RT-qPCR-inhibitorer eller andra typer av störande ämnen.
 - Underlåtelse att följa bruksanvisningar och analysförfarandet.
- Ett negativt IC-resultat utesluter inte förekomsten av vanA- och/eller vanB-gen DNA i ett kliniskt prov.
- Ett positivt testresultat anger inte nödvändigtvis förekomsten av livskraftiga vankomycin-resistenta organismer och antyder inte att dessa organismer är smittsamma eller orsakar kliniska symtom. Ett positivt resultat anger dock förekomsten av vankomycin-resistenta målsekvenser.
- Negativa resultat utesluter inte infektion av vankomycin-resistenta organismer och ska inte användas som den enda grunden för beslut om behandling eller annan patienthantering.
- Om resultaten blir olösta, obestämda eller ofullständiga med VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit krävs omtestning. Olösta prover kan vara på grund av förekomsten av inhibitorer i provet eller en inkorrekt rehydrering av röret med frystorkad reaktionsblandning. Om det föreligger ett instrumentfel kommer obestämda eller ofullständiga resultat att erhållas.

11. Kvalitetskontroll

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit innehåller en intern kontroll (IC) i varje reaktionsrör som bekräftar korrekt prestanda för tekniken.

12. Prestandaegenskaper

12.1. Klinisk sensitivitet och specificitet

Den kliniska prestandan för VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit testades med användning av kliniska prover (rektala svabbar) från patienter med misstänkt infektion av vankomycin-resistenta enterokocker. Resultaten var enligt följande:

	Plats	Provtyp	Arbetsflöde	Mål
1	Clinical Microbiology, Centre for Infectious Diseases and Microbiology Laboratory services, NSW Health Pathology, Westmead Hospital (Sydney, Australien)	Rektal svabb	BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System	VanA-gen
				VanB-gen
				VanA + VanB-gener

Tabell 7. Plats, provtyp, arbetsflöde och mål.

Sanna positiva och negativa värden, falska positiva och negativa värden, känslighet, specificitet för VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit beräknades i relation till varje jämförelseanalys, enligt vad som visas i följande tabell:

Plats	Komparatoranalys	Mål	TP	TN	FP	FN	Känslighet	Specificitet
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 %)

Tabell 8. Sanna positiva (TP) och negativa (TN) värden, falska positiva (FP) och negativa (FN) värden, känslighet och specificitet för VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Resultaten visar en hög överensstämmelse för att detektera *vanA*- och *vanB*-genen med användning av VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Förutom detta har kontrollfelfrekvensen för provbearbetningen beräknats. Det inledade antalet olösta reaktioner (UNR) var 3 (inledande UNR-frekvens: 1,39 %). Antalet UNR efter repetition var 0 (slutlig UNR-frekvens: 0,00 %).

För att utvärdera kompatibiliteten för VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit anpassad för BD MAX™, med andra olika matrisprover, gjordes en utvärdering för att verifiera detektionen av vancomycinresistenta enterococci-kolonilösningar.

Olika kolonilösningar bereddes genom att två kolonier av en fastställd kultur tillsattes i 500 µl nukelasfritt vatten. Stammarna som användes för denna utvärdering var CECT 5253 *Enterococcus faecium* vanA, CECT 8120 *Enterococcus faecalis* vanB, NCTC 12201 *Enterococcus faecalis* vanA, och NCTC 13632 *Enterococcus faecalis* vanA. En volym på 10 µl av varje kolonilösning tillsattes direkt i provbuffertörret. Flödesschemat som användes för att göra denna utvärdering var: BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System.

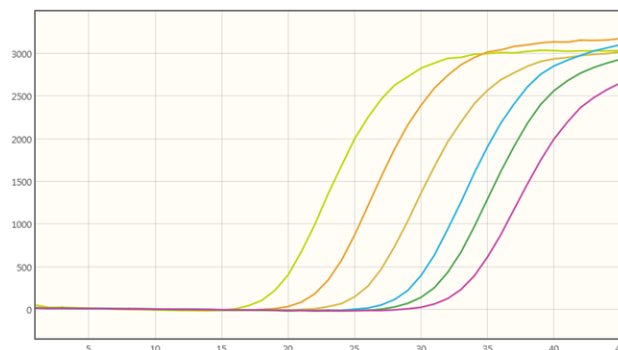
Resultaten visade att kolonilösningart med CECT 5253, NCTC 12220, och NCTC 13632 var positiva för vanA-genen och kolonilösningem med CECT 8120 var positiv för vanB-genen.

Dessa resultat visar att VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit troligen kan detektera vanA- och vanB-gener i kolonilösningar.

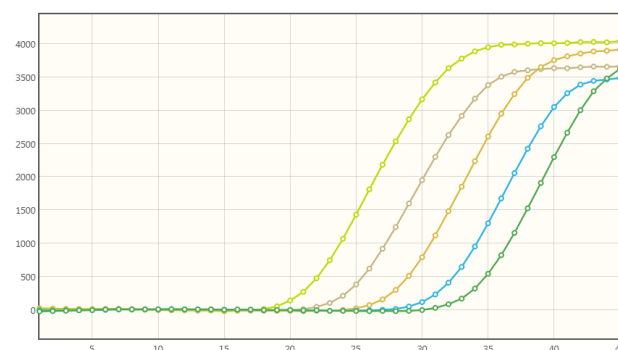
12.2. Analytisk sensitivitet

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit har en detektionsgräns på ≥ 4 kolonibildande enheter per reaktion (CFU/rxn) för vanA och ≥ 10 CFU/rxn för vanB (figur 2 och 3) med en positiv frekvens på ≥ 95 % på perianala och rektala svabbar.

Figur 2. Spädningsserie för en körning av vanA-genmall ($3,62 \cdot 10^4$ - $3,62$ CFU/rxn) på BD MAX™-systemet (475/520 (FAM)-kanal).



Figur 3. Spädningsserie för en körning av vanB-genmall ($5,65 \cdot 10^4$ - $9,98$ CFU/rxn) på BD MAX™-systemet (585/630 (ROX)-kanal).



12.3. Analytisk specificitet

Specificiteten för analysen av vankomycin-resistens bekräftades genom testning av en panel bestående av olika antimikrob-resistenta organismer och olika mikroorganismer som representerar de vanligaste enteriska patogenerna eller flora i tarmen. Ingen korsreaktivitet detekterades mellan någon av följande mikroorganismer som testades, förutom målpatogenerna för varje analys:

Test av korsreaktivitet					
Adenovirus-serotyper 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	–	<i>Enterococcus durans</i>	–	<i>Klebsiella pneumonia</i> -isolat som bildar TEM-1 (icke-ESBL), SHV-1 (icke-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) och KPC-2	–
<i>Aeromonas caviae</i>	–	<i>Enterococcus casseliflavus</i> av vanC-typ	–	<i>Listeria monocytogenes</i>	–
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	–	<i>Enterococcus casseliflavus</i> av vanC2-typ	–	Norovirus GI och GII	–
<i>Arcobacter butzleri</i>	–	<i>Enterococcus faecalis</i>	–	<i>Proteus vulgaris</i>	–
Astrovirus genotyp I–VIII	–	<i>Enterococcus faecalis</i> av vanA-typ	–/+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–
<i>Bacteroides fragilis</i>	–	<i>Enterococcus faecalis</i> av vanB-typ	–/+	Rotavirus A	–
<i>Blastocystis hominis</i>	–	<i>Enterococcus faecium</i>	–	<i>Salmonella bongori</i>	–
<i>Campylobacter coli</i>	–	<i>Enterococcus faecium</i> av vanA-typ	+/-	<i>Salmonella enteritidis</i>	–
<i>Campylobacter fetus</i>	–	<i>Enterococcus faecium</i> av vanB-typ	–/+	<i>Salmonella gallinarum</i>	–
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	–	<i>Enterococcus gallinarum</i> av vanB- och vanC-typ	–/+	<i>Salmonella paratyphi</i> A	–
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	–	<i>Enterococcus gallinarum</i> av vanC-typ	–	<i>Salmonella paratyphi</i> B	–
<i>Campylobacter lari</i>	–	<i>Enterococcus gallinarum</i> av vanC1-typ	–	<i>Salmonella pullorum</i>	–
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	–	<i>Enterococcus hirae</i>	–	<i>Salmonella typhi</i>	–
<i>Candida albicans</i>	–	Enterohemorragisk <i>Escherichia coli</i>	–	<i>Salmonella typhimurium</i>	–
<i>Citrobacter braakii</i> -isolat som bildar VIM-1	–	Enteroinvasiv <i>Escherichia coli</i>	–	Sapovirus	–
<i>Citrobacter freundii</i>	–	Enteropatogen <i>Escherichia coli</i>	–	<i>Serratia liquefaciens</i>	–
<i>Citrobacter freundii</i> -komplexisolat som bildar KPC-3 och VIM-4	–	Enterotoxigen <i>Escherichia coli</i>	–	<i>Serratia marcescens</i> -isolat som bildar OXA-48	–
<i>Clostridium difficile</i>	–	<i>Escherichia coli</i> -isolat som bildar OXA-244	–	<i>Shigella dysenteriae</i>	–
<i>Clostridium difficile</i> 027	–	<i>Escherichia coli</i> -isolat som bildar TEM-1 (icke-ESBL) och 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>	–	Meticillin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i> (mecC)	–
<i>Dientamoeba fragilis</i>	–	<i>Helicobacter heilmannii</i>	–	Meticillin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) stam N315	–
<i>Entamoeba dispar</i>	–	<i>Helicobacter hepaticus</i>	–	Meticillin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ST398	–
<i>Entamoeba histolytica</i>	–	<i>Helicobacter pylori</i>	–	Meticillin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) stam (oxa ^R , PVL-positiv, spa-typ t310)	–
<i>Enterobacter cloacae</i> -isolat som bildar SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) och OXA-48	–	Klaritromycin-resistent <i>Helicobacter pylori</i> (23S rDNA A2146G)	–	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	–
<i>Enterobacter cloacae</i> -isolat som bildar TEM-1 (icke-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) och NDM-1	–	Klaritromycin-resistent <i>Helicobacter pylori</i> (23S rDNA A2147G)	–	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	–
<i>Enterobacter cloacae</i> -komplexisolat som bildar NDM-7	–	<i>Klebsiella oxytoca</i>	–	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	–
<i>Enterococcus avium</i> av vanA-typ	+/-	<i>Klebsiella pneumonia</i> -isolat som bildar SHV-1 (icke-ESBL), KPC-3 och OXA-48	–		

Tabell 9. Patogena referensmikroorganismer som används i denna studie.

12.4. Analytisk reaktivitet











Reaktiviteten för VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit för *vanA*-gen utvärderades mot RNA från stammar av *Enterococcus avium* av *vanA*-typ, *Enterococcus faecalis* av *vanA*-typ (NCTC 13632, NCTC 12201) och *Enterococcus faecium* av *vanA*-typ (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202) och uppvisade positiva resultat.

Reaktiviteten för VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit för *vanB*-gen utvärderades mot RNA från stammar av *Enterococcus faecalis* av *vanB*-typ (ATCC 51299, CECT 8120), *Enterococcus faecium* av *vanB*-typ (IOWA 2) och *Enterococcus gallinarum* av *vanB*- och *vanC*-typ (ENT20120142) och uppvisade positiva resultat.

Bibliography/Bibliografi

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

Symbols for IVD components and reagents/ Symboler för IVD-komponenter och reagenser

	<i>In vitro</i> diagnostic device <i>In vitro</i> -diagnostik		Keep dry Håll torrt		Use by Utgångsdatum		Manufacturer Tillverkare		Batch code Satskod (Lot)
	Consult instructions for use Se bruksanvisning		Temperature limitation Temperaturgräns		Contains sufficient for <n> test Innehåller tillräckligt för <n> tester		Unique Device Identification Unik enhetsidentifiering		Catalogue number Katalognummer

Trademarks

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

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

Change Control / Ändringskontroll		
Version No. / Version nr.	Changes / Ändringar	Date / Datum
00	Unification of all instructions for use associated with the different catalogue references in a single format / Enande av alla bruksanvisningar förknippade med olika katalogreferenser i ett enda format.	21/06/2021

Table A 2. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

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

