VIASURE

Real Time PCR Detection Kit

Vancomycin resistance

for BD MAX™ System

CE IVD

These instructions for use apply to the following reference / *Bu kullanım talimatları aşağıdaki referans için geçerlidir:*

PRODUCT / ÜRÜN	REFERENCE / REFERANS
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. / *BD MAX™ Sistemiyle kullanılacak ürün için referans.*

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

İçerik

1. Kullanım amacı 19
2. Özet ve Açıklama 19
3. Prosedür ilkesi 20
4. Verilen reaktifler 20
5. Kullanıcı tarafından tedarik edilecek olan reaktifler ve ekipman 20
6. Taşıma ve depolama koşulları 21
7. Kullanıcılara uyarılar 21
8. Test prosedürü 22
8.1. Numunelerin toplanması, saklanması ve taşınması 22
8.2. Numunelerin hazirlanmasi ve DNA ekstraksiyonu 22
8.3. PCR protokolü 23

9. Sonuçların yorumlanması 26
10. Testin kısıtlamaları 28
11. Kalite kontrol 29
12. Performans özellikleri 29
12.1. Klinik duyarlılık ve özgüllük 29
12.2. Analitik hassasiyet 30
12.3. Analitik özgüllük 31
12.4. Analitik reaktivite 32
Bibliography/ Bibliyografi 33
Symbols for IVD components and reagents/ IVD bileşenlerinin ve reaktiflerin sembolleri 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	*vanA*
Vancomycin resistance genes	585/630	*vanB*
Internal control (IC)	530/565	-

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

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

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

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

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

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

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

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

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

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

8. Test procedure

8.1. Sample collection, transport and storage

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

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

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

8.2. Sample preparation and DNA extraction

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

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

8.3. PCR protocol

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

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

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

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

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

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

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

Table 3. PCR settings.

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

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

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

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 5. PCR protocol.

12) Click the "Save Test" button.

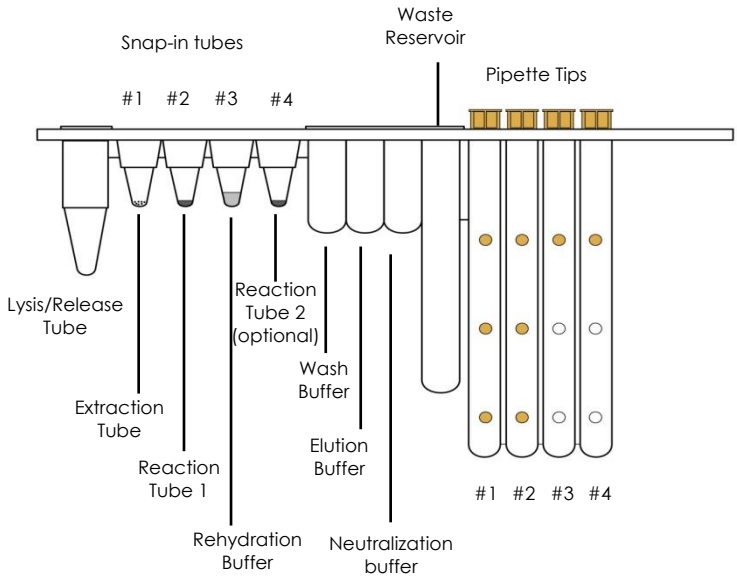
8.3.2. BD MAX™ Rack set up

1) 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.
2) Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip

(Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.

3) Determine and separate the appropriate number of *Vancomycin resistance* reaction tubes (1B foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
    a. Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
    b. In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
        i. Note: If you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (11 foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air and close the pouch with the zip seal.
    a. In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the buffer is at the bottom of the tube.

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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

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

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

8.3.4. BD MAX™ report

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

9. Result interpretation

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

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

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 3). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.

- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred.

- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Table 6.

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

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

vanA gene (475/520)	*vanB* gene (585/630)	Internal control (530/565)	Interpretation
+	+	+/-[1]	***vanA* and *vanB* genes DNA Detected[1]**
+	-	+/-[1]	***vanA* gene DNA Detected, *vanB* gene DNA Not Detected[1]**
-	+	+/-[1]	***vanB* gene DNA Detected, *vanA* gene DNA Not Detected[1]**
-	-	+[2]	***vanA* and *vanB* genes DNA Not Detected[2]**
-	-	-[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*

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

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

These results show that VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit can properly detect *van*A and *van*B 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 ≥ 95% on perianal and rectal swabs.

Figure 2. Dilution series of *vanA* gene (3.62*10⁴-3.62 CFU/rxn) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

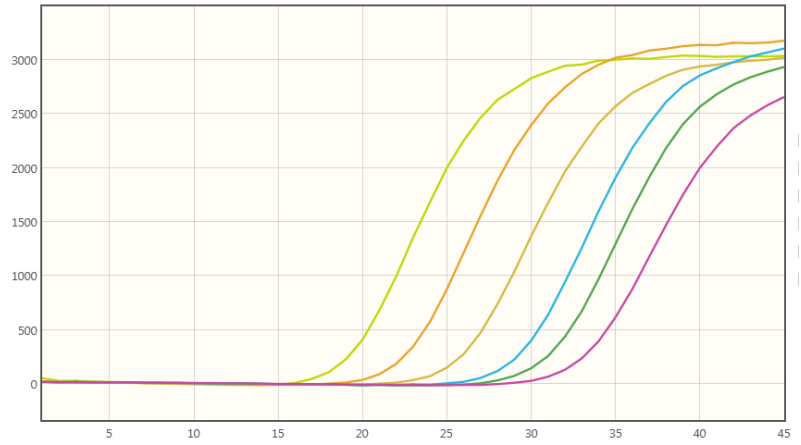
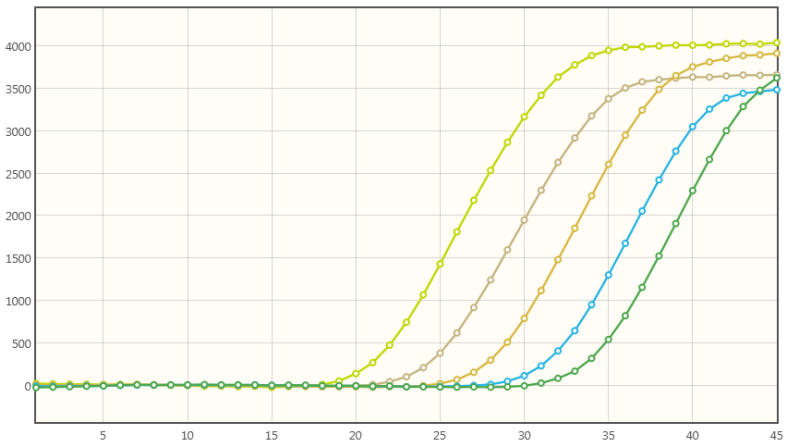


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene (5.65*10⁴-9.98 CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



12.3. Analytical specificity

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

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

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

TÜRKÇE

1. Kullanım amacı

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, perianal ve/veya rektal swab ve kolonilerden doğrudan gelen vankomisin direnci enterekok (VRE) ile ilişkili olabilecek *vanA* ve *vanB* genlerinin tespit ve ayırt edilmesi için tasarlanmıştır. Bu tahlil, vankomisine dirençli organizmaların, hastanın klinik belirti ve semptomları ve epidemiyolojik risk faktörleri ile birlikte tanımlanmasında yardımcı olarak kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Analiz, BD MAX™ Sistemini, otomatik olarak DNA'nın ekstraksiyonu için kullanır ve ardından BD MAX™ Sistemi için evrensel reaktifler ve atılabilir maddeler ile birlikte sağlanan reaktiflerin kullanıldığı gerçek zamanlı PCR'yi kullanır. Perianal ve/veya rektal swablardan ve kolonilerden gelen DNA *vanA* ve *vanB* genlerineözgü flüoresan raportör boya probları kullanılarak tespit edilir.

2. Özet ve Açıklama

Enterokoklar, gastrointestinal sistemde ve kadın üreme organlarında bulunan ortakçı organizmalardır. Yakın zamanda, idrar yolu enfeksiyonları, cilt enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları, endokardit ve sepsis gibi hastane enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı patojenler olarak tanınmışlardır.

Vankomisin, hücre duvarı sentezini inhibe eden ve ciddi oranda Gram-pozitif bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan bir glikopeptid antibiyotiktir. Vankomisine direnci enterokoklar (VRE) ilk olarak 1986'da İngiltere ve Fransa'da rapor edilmiş olup, günümüzde dünya çapındaki hastanelerde yaygın olarak görülmektedir.

Vankomisine direnç, karmaşık bir süreçtir ve farklı gen kümelerinin varlığına ihtiyaç duyar. Esas olarak, vankomisin direnç genleri tarafından üretilen pentapeptid öncüllerine bağlı olarak iki türe ayrılabilir; D-Alanine-D-Serine (VanC-, VanE-, VanG-, VanL- ve VanN-tipi) ile biten veya D-Alanine-D-Laktat (VanA-, VanB-, VanD- ve VanM-tipi) ile biten. Bu pentapeptid öncülleri, glikopeptitler için düşük oranda benzerlik göstermiş ve enterokoklarda vankomisin dirençleri vermiştir.

Enterokoklarda birinci tip vankomisin direnci intrinsik dirençtir (örn. vanC geni ile ilişkilidir). *Enterococcus gallinarum* ve *E. Casseliflavus E flavescens* izolatları vankomisine karşı doğal, düşük seviyeli bir direnç gösterir. İkinci tür ise kazanılan dirençtir (örneğin vanA veya vanB genleri) ve enterokok, başka bir Enterokok türünden veya organizmasından mobil genetik elementlerin (transpozonlar ve plazmitler) alınması yoluyla direnç kazanabilir. Bu direnç en sık olarak E. faecium ve E. faecalis'te görülür, ancak aynı zamanda E. raffinosus, E. avium, E. durans ve diğer bazı enterokok türlerinde de görülmüştür. Van A ve van B genleri yüksek ya da orta dereceli vankomisin direncinden sorumludur.

Vankomisine direnci enterokokların (VRE) iletimi, kolonize olmuş veya enfekte olmuş hastaların (kan, yara drenajı, idrar, dışkı, septum ve diğer yollardan) vücut sıvılarıyla doğrudan temas yoluyla veya sağlık çalışanlarının elleriyle dolaylı temas yoluyla veya Kirlenmiş hasta bakım ekipmanı veya çevresel yüzeyler aracılığıyla olur.

İlk başta, uygulanan tarama metodu kültür temelliydi ve zaman alıcıydı ve genellikle tamamlanması bir ila beş gün sürmekteydi. Gerçek zamanlı PCR analizlerinin, vankomisine dirençle klinik olarak ilgili genlerin tespiti için bir araç olduğu gösterilmiştir.

3. Prosedür ilkesi

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, DNA'nın vankomisine direnci enterokoklardan ve vankomisine direnci genler vanA ve vanB'yi taşıyan diğer organizmalardan ayırt edilmesi ve ayrılması için tasarlanmıştır. DNA izolasyonundan sonra, vankomisin direncinin belirlenmesi, spesifik primerleri ve flüoresan etiketli bir probu kullanarak, vanA ve vanB genlerinin korunmuş bir bölgesinin amplifikasyonuyla gerçekleştirilir.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, DNA polimerazının 5' nükleaz aktivitesine dayanır. DNA amplifikasyonu sırasında, bu enzim tamamlayıcı DNA sekansına bağlı probu ayırarak; söndürücü boyanın raportörden ayırt edilmesini sağlar. Bu reaksiyon, hedef şablonun miktarıyla orantılı olan floresan sinyalinde bir artış meydana getirir. Bu floresans BD MAX™ Sisteminde ölçülür.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit her tüpte, stabilize edilmiş bir formatta gerçek zamanlı PCR testi için gerekli tüm bileşenleri (spesifik primer/problar, dNTPs, tampon, polimeraz) ve ayrıca PCR inhibisyonunu izlemek için bir , endojen dahili kontrol içerir.

Hedef	Kanalinda	Geni
Vankomisine direnci genler	475/520	*vanA*
Vankomisine direnci genler	585/630	*vanB*
Dahili Kontrol (IC)	530/565	-

Tablo 1. Hedef, kanalinda ve genler.

4. Verilen reaktifler

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit Tablo 2'de ayrıntılı olarak verilen aşağıdaki maddeleri ve reaktifleri içerir:

Reaktif/Materyal	Açıklama	Barkod	Miktar
Vancomycin resistance reaction tube	Enzimler, primer probları, tampon, dNTP'ler, stabilizatörler ve stabilize edilmiş formatta dahili kontrol içeren bir karışım	1B folyo	12 şeffaf tüp içeren 2 poşet
Rehydration Buffer tube	Stabilize edilmiş ürünü sulandırmak için solüsyon	11 folyo	24 şeffaf tüp içeren 1 kese

Tablo 2. VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit with Cat içinde sağlanan reaktif ve materyaller. N°. VS-VAN124 (444202).

5. Kullanıcı tarafından tedarik edilecek olan reaktifler ve ekipman

Aşağıdaki liste, kullanım için gerekli olan ancak VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit içinde bulunmayan materyalleri ve ekipmanları içerir.

- Gerçek Zamanlı PCR cihazı: BD MAX™ Sistemi.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref:442825 veya 442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vorteks.
- Mikropipetler (2 ile 1000 µL arasında hatasız).

- Nükleaz içermeyen su.
- Filtre uçları.
- Pudrasız tek kullanımlık eldivenler

6. Taşıma ve depolama koşulları

- Kitler, etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar 2-40 °C'de sevk edilip saklanabilir.
- Reaksiyon tüplerini içeren alüminyum poşetler, açıldıktan sonra 28 güne kadar kullanılabilir.

7. Kullanıcılara uyarılar

- Ürün yalnızca moleküler biyolojik teknikler konusunda eğitimli laboratuar veya sağlık uzmanları ve teknisyenler gibi profesyonel kullanıcılar tarafından kullanılmak üzere tasarlanmıştır.
- *In vitro* tanısal kullanım içindir.
- Son kullanma tarihi geçmiş reaktifleri ve/veya materyalleri kullanmayın.
- Dış kutuyu mühürleyen etiket açılmışsa kiti kullanmayın.
- Koruyucu kutu ulaştığında açılmış veya kırılmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Koruyucu poşetler ulaştığında açıksa veya kırılmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Reaktif poşetler içinde kurutucu mevcut değilse veya parçalanmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Kurutucu maddeyi reaktif poşetlerinden çıkarmayın.
- Her kullanımdan sonra hemen reaktif koruyucu poşetlerin fermuarını kapatın. Kapatmadan önce poşetlerdeki fazla havayı giderin.
- Folyo kırılmış veya hasar görmüşse reaktifleri kullanmayın.
- Farklı poşetlerden ve/veya kitlerden ve/veya partilerden reaktifleri karıştırmayın.
- Reaktifleri nemden koruyun. Neme uzun süre maruz kalmak ürün performansını etkileyebilir.
- Bileşenleri ışıktan koruyun.
- Laboratuvarın genel alanında başka PCR testlerinin yapıldığı durumlarda, VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit, bunun için gerekli herhangi bir reaktif ile Test ve BD MAX ™ Sisteminin kontamine olmamasına dikkat edilmelidir. Reaktiflerin mikrobiyal ve ribonükleaz (RNaz)/deoksiribonükleaz (DNaz) kontaminasyonundan daima kaçının. Steril RNaz/DNaz içermeyen, tek kullanımlık, aerosole dirençli veya pozitif deplasmanlı pipet uçlarının kullanılması önerilir. Her numune için yeni uç kullanın. Reaktifler ve kartuşlar kullanılmadan önce eldivenler değiştirilmelidir (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Ortamın amplikonlarla kontaminasyonunu önlemek için, PCR kartuşlar (BD MAX™ PCR Cartridge) kullandıktan sonra parçalamayın. PCR kartuşlar (BD MAX ™ PCR Cartridge) contaları kontaminasyonu önleyecek şekilde tasarlanmıştır.
- Tek yönlü bir iş akışı tasarlayın. Ekstraksiyon Alanında başlanmalı ve Amplifikasyon ve Tespit Alanında devam edilmelidir. Numuneleri, ekipmanı ve reaktifleri önceki adımın gerçekleştirildiği alana geri götürmeyin.
- İyi Laboratuvar Uygulamalarına Uyun. Koruyucu kıyafet giyin, tek kullanımlık eldivenler, gözlükler ve maske kullanın. Çalışma alanında bir şey yemeyin, içmeyin sigara kullanmayın veya kozmetik ürünler uygulamayın. Testi bitirdikten sonra ellerinizi yıkayın.
- Numuneler ile numunelere maruz kalan tüm reaktifler ve materyaller potansiyel olarak bulaşıcı ve / veya biyolojik olarak tehlikeli muamelesi görmeli ve ulusal güvenlik düzenlemelerine uygun olarak ele alınmalıdır. Numunelerin toplanması, ulaşım, saklanması, işlenmesi ve bertarafı sırasında gerekli önlemleri alın.

- Numuneler ve reaktifler biyolojik güvenlik kabininde kullanılmalıdır. Potansiyel olarak bulaşıcı numunelerin işlenmesine yönelik mevcut talimatlara uygun personal protective equipment (PPE) (kişisel koruyucu ekipman) kullanın. Atıkları yerel düzenlemelere ve eyalet düzenlemelerine uygun olarak atın.
- Yaygın olarak kullanılan ekipmanın, özellikle mikropipetler ve çalışma yüzeylerinin düzenli olarak dekontamine edilmesi önerilir.
- 1907/2006 (REACH) sayılı Yönetmelik (AK) uyarınca, "VIASURE Real Time PCR Detection Kits"; Yönetmelik (AK) No 1272/2008'de (CLP) yer alan tehlike sınıfı kriterlerini karşılayan veya söz konusu yönetmelikte beyan için belirlenen değerden daha yüksek konsantrasyonlarda bulunan maddeler ve/veya karışımlar "içermediklerinden sağlığa ve çevreye zararsız olarak sınıflandırılmaları nedeniyle Malzeme Güvenlik Bilgi Formları (Safety Data Sheets) gerektirmezler.
- Ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için BD MAX™ Sistemi Kullanıcı El Kitabına bakın.

8. Test prosedürü

8.1. Numunelerin toplanması, saklanması ve taşınması

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, derhal ESwab™ taşıma ortamına (sıvı Amies bazlı toplama ve taşıma sistemi) yerleştirilen perianal ve/veya rektal swablarla doğrulanmıştır (Copan, İtalya). VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit koloni süspansiyonunda da doğrulanmıştır. Diğer numune türleri kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Toplanan, saklanan ve taşınan numuneler, kullanıcı tarafından doğrulanan şartlarda muhafaza edilmelidir. Genel olarak, perianal ve/veya rektal swablar temiz bir ESwab™ taşıma ortamında uygun şekilde toplanmalı ve etiketlenmeli ve testin kalitesini garanti etmek için en kısa sürede işleme konmalıdır. Numuneler patojen materyalin taşınması ile ilgili yerel ve ulusal düzenlemelere uyularak, 24 saate kadar 2 - 8°C sıcaklıkta taşınmalıdır. Uzun süreli taşımalar için (24 saatten fazla), sevkıyatın °-20°C'eya daha düşük'de yapılması önerilir. Test için taze örneklerin kullanılması tavsiye edilir. Numuneler 25°C'de 24 saate kadar, 2 ila 8°C'de 144 saate kadar (6 gün) saklanabilir veya -20°C'de 192 saate (8 gün) kadar dondurulabilir veya ideal olarak -70°C'de dondurulabilir. Numune ve nükleik asitlerin bozulmasını önlemek için tekrarlanan donma-çözülme döngülerinden kaçınılmalıdır.

Fekal numuneler uygun laboratuvar talimatlarına uygun şekilde toplanmalı, taşınmalı ve saklanmalıdır. Ayrıntılı bilgi için CED guideline (CDC kılavuzu) belgesine bakın (Specimen collection guidelines (Numune toplama talimatları)). Web sitesi https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf) and the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). Enfeksiyon hastalıklarının teşhisi için mikrobiyoloji laboratuvarını kullanma rehberi: Infectious Diseases Society of America ve American Society for Microbiology (Amerika Bulaşıcı Hastalıklar Derneği ve Amerikan Mikrobiyoloji Derneği) 2018 güncellemesi. *Clinical Infectious Diseases* (Klinik Bulaşıcı Hastalıklar), 67(6), e1-e94).

8.2. Numunelerin hazirlanmasi ve DNA ekstraksiyonu

Numune hazırlama işlemini kullanılan ekstraksiyon kiti olan BD MAX™ ExK™ TNA-2'nin kullanım talimatlarındaki önerilere uyarak gerçekleştirin. Bazı numunelerin ön işlem gerektirebileceğini unutmayın. Uygulamaya özel ekstraksiyon hazırlama prosedürleri kullanıcı tarafından geliştirilmeli ve doğrulanmalıdır.

1. Copan ESwab™: Bir BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube (Numune Tampon Tüpü)ne 200 µL ESwab™ numunesini pipetleyin ve tüpü bir septum başlığıyla kapatın. Numuneyi 1 dakika boyunca yüksek hızda vorteksleyerek tamamen karıştırın. BD MAX™ System Operation'a (Kullanımına) geçin.

2. Koloniler: Kültürlenmiş ortamdan iki koloni alın ve bunları 500 µL nükleaz içermeyen suda süspansiyon halinde tutun. Vorteksleyerek tam karıştırma sağlayın. Bir BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube (Numune Tampon Tüpü)ne 10 µL süspansiyon ekleyin ve tüpü septumlu kapakla kapatın. Numuneyi 1 dakika boyunca yüksek hızda vorteksleyerek tamamen karıştırın. BD MAX™ System Operation'a (Kullanımına) geçin.

8.3. PCR protokolü

Not: Lütfen ayrıntılı talimatlar için BD MAX™ Sistemi Kullanıcı El Kitabına bakın.

8.3.1. VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit için PCR test programı oluşturma

Not: Halihazırda testi VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit oluşturduysanız, 8.3.1 adımını atlayıp doğrudan 8.3.2'ye geçebilirsiniz.

1) BD MAX™ Sisteminin "Run" (Çalıştır) ekranında, "Test Editor" (Test Düzenleyici) sekmesini seçin.
2) "Create" (Oluştur) düğmesine tıklayın.
3) 3) "Test Name" (Test Adı) penceresindeki "Basic Information" (Temel Bilgi) sekmesinde, testinize bir ad verin: örneğin VIASURE *Vancomycin resistance*.
4) "Extraction Type" (Ekstraksiyon Tipi) açılır menüsünde, "ExK TNA-2"yi seçin.
5) "Master Mix Format" (Master Karışım Formatı) açılır menüsünde, "Type 5"i (Tip 5) seçin.
   b. Not: Ürün BD MAX testi için ek bir VIASURE ile birlikte kullanılabilir, ardından "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Rehidrasyon Tamponlu (Tip 5) Çift Master Karışım Konsantre Liyofilize MM) öğesini seçin.
6) "Sample extraction parameters" (Numune ekstraksiyon parametreleri) içinde "User defined" (Kullanıcı tanımlı) seçeneğini seçin ve numune hacmini 500 µL olarak ayarlayın.
7) "Ct Calculation" (Ct Hesaplaması)'nda "Call Ct at Threshold Crossing" (Eşiğin Geçilmesi Halinde Ct'yi Ara)'yı seçin.
8) Yazılım sürümü 5.00 veya üzeri ise, "Custom Barcodes" (Özel Barkodlar) kısmında aşağıdaki yapılandırmayı seçin:
   a. "Snap-In 2 Barcode" (Barkodu): 1B (*Vancomycin resistance* reaction tube ile ilgili).
   b. "Snap-In 3 Barcode" (Barkodu): 11 (Rehydration Buffer tube için).
   c. "Snap-In 4 Barcode" (Barkodu): "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Bölüm 8.3.1) (Rehidrasyon Tamponlu Dual Master Mix Konsantre Liyofilize MM (Tip 5)) seçmeniz halinde, başka bir VIASURE reaksiyon tüpü (farklı folyo).

9) "PCR settings" (PCR ayarları) sekmesinde aşağıdaki parametreleri girin: "Channel Settings" (Kanal Ayarları), "Gains" (Kazanımlar) ve "Threshold" (Eşik) (Tablo 3).

   a. Not: Ürün BD MAX™ testi için ek bir VIASURE ile birlikte kullanılabilir, snap 2 (yeşil) ve snap 4 (mavi) konumları için PCR Ayarları ve Test Adımları tamamlanmalıdır.

Channel (Kanal)	Alias (Takma İsim)	Gain (Kazanım)	Threshold (Eşik)	Ct Min (Ct Asgari)	Ct Max (Ct Azami)
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

Tablo 3. PCR settings (PCR ayarları).

Not: Her kanal için başlangıç noktası olarak yukarıda listelenen minimum eşik değerlerinin ayarlanması önerilir, ancak eşiklerin floresan eğrilerinin üstel fazı dahilinde ancak arka plan sinyallerinin üzerinde kalmasını sağlamak için nihai ayarların sonuç enterpolasyonu sırasında son kullanıcı tarafından belirlenmesi gerekir. Farklı cihazlar için eşik değeri, farklı sinyal yoğunlukları nedeniyle değişebilir.

10) "PCR settings" (PCR ayarları) sekmesinde aşağıdaki parametreleri girin: "Spectral Cross Talk" (Spektral Tartışma) (Tablo 4).

		False Receiving Channel (Yanlış Alıcı Kanal)				
	Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Eksitasyon Kanalı)	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	-

Tablo 4. "Spectral cross-talk" parametreleri (Spektral tartışma).

11) "Test Steps" (Test Adımları) sekmesine PCR protokolünü girin (Tablo 5).

Step Name (Adım İsmi)	Profile Type (Profil Tipi)	Cycles (Döngüler)	Time (s) (Süreler)	Temperature (Sıcaklık)	Detect (Tespit)
Initial denaturation (Başlangıç Denatürasyonu)	Hold (Tutma)	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denatürasyon ve Yeniden Birleştirme/Genişletme (Veri toplama))	2-Temperature (Sıcaklık)	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

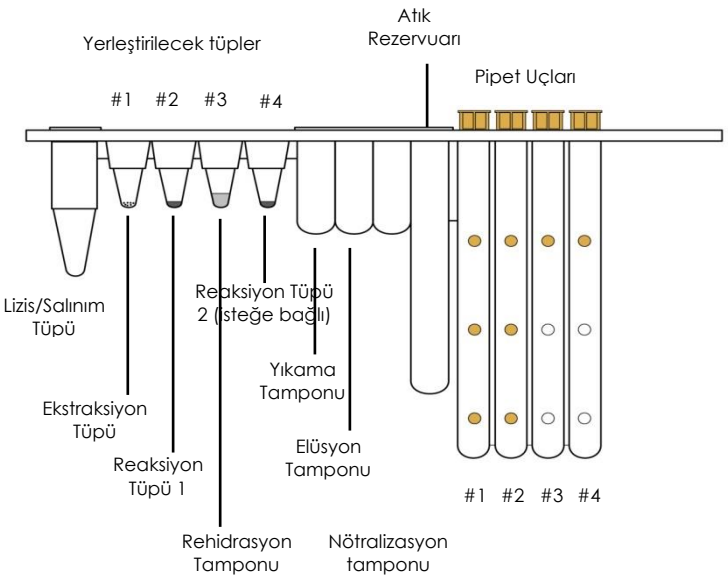
Tablo 5. PCR protokolü.

12) "Save Test (Testi Kaydet) düğmesine tıklayın.

8.3.2. BD MAX™ Raf kurulumu

1) Test edilecek her bir numune için, BD MAX™ ExK™ TNA-2 kitinden bir adet Birimlere Ayrılmış Reaktif Şerit çıkarın. Tüm sıvıların tüplerin alt kısmında olduğundan ve BD MAX™ Sistemi numune raflarına yüklendiğinden emin olmak için her bir şeridi hafifçe sert bir yüzeye vurun.
2) Gerekli sayıda BD MAX™ ExK™ TNA Ekstraksiyon Tüpü'nü (B4) (beyaz folyo) koruyucu poşetlerinden çıkarın. Ekstraksiyon Tüpünü/Tüplerini (beyaz folyo) TNA şeridindeki ilgili pozisyonlara yerleştirin (1. Yerleştirme pozisyonu, raftaki beyaz renkli kodlama. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve poşeti fermuar ile kapatın.
3) Uygun sayıda Vankomisin *resistance* reaction tubes (1B folyo) belirleyin ve ayırın ve şeritte karşılık gelen konumlarına yerleştirin (2. Yerleştirme pozisyonu, raftaki yeşil renkli kodlama. Şekil 1'e bakın).
    a. Fazla havayı çıkartın ve alüminyum poşetleri fermuar ile kapatın.
    b. Rehidrasyonu doğru şekilde gerçekleştirebilmek için, lütfen liyofilize ürünün tüpün dibinde olduğundan ve tüpün üst kısmına veya folyo kapamasına yapışmadığından emin olun. Tüm ürünün tüpün altında olduğundan emin olmak için her bir tüpü sert bir yüzeye hafifçe vurun.
        i. Not: "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Rehidrasyon Tamponlu Çift Master Karışımlı Konsantre Liyofilize MM (Tip 5)) (Bölüm 8.3.1) formatını seçtiyseniz, uygun sayıda ilave VIASURE reaksiyon tüpünü (farklı folyo) belirleyin ve ayırın ve şeritteki konumlarına yerleştirin (4. Yerleştirme pozisyonu, raftaki mavi renkli kodlama. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve alüminyum poşetleri fermuar ile kapatın.
4) Gerekli sayıda Rehydration Buffer tubes (11 folyo) çıkarın ve şeritteki konumlarına yerleştirin (3. Yerleştirme pozisyonu, raftaki renksiz kodlama. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve poşeti fermuar ile kapatın.
    a. Aktarımı doğru şekilde gerçekleştirebilmek için, sıvının tüpün dibinde olduğundan ve tüpün üst kısmına veya folyo kapamasına yapışmadığından emin olun. Tüm ürünün tüpün altında olduğundan emin olmak için her bir tüpü sert bir yüzeye hafifçe vurun.

Figura 1. BD MAX™ ExK™ TNA-2 kitindeki BD MAX™ TNA Reaktif Şerit (TNA).



8.3.3. BD MAX™ Cihaz kurulumu.

1) BD MAX™ Sistem yazılımı v4.50A veya daha üstü sürümünde "Run" (Çalıştır) ekranında "Work List" (İş Listesi) sekmesini seçin.
2) "Test" aşağı açılır menüsünde VIASURE Vancomycin resistance öğesini seçin (daha önce oluşturulmadıysa, Bölüm 8.3.1'e bakın).
3) Aşağı açılır menüden uygun kit parti numarasını (kullanılan ekstraksiyon kitinin dış kutusunda bulunur) seçin (isteğe bağlı).
4) Barkod tarayıcı ile tarayarak veya elle girerek İş Listesinin (Worklist) Numune tüpü (Sample tube) penceresine Numune Tampon Tüpü kimlik numarasını girin.
5) İş Listesinin (Worklist) Numune/Hasta Kimliği ve/veya Erişim (Specimen/Patient ID and/or Accession) penceresini doldurun ve "Save" (Kaydet) düğmesine tıklayın. Tüm Örnek Tampon Tüpleri girilene kadar devam edin. Numune/hasta kimliğinin ve Numune Tampon Tüplerinin doğru şekilde eşleştiğinden emin olun.
6) Hazırlanan Numune Tampon Tüpünü BD MAX™ Raflarına yerleştirin.
7) Rafları BD MAX™ Sistemine yükleyin (A Rafı, BD MAX™ Sisteminin sol tarafında ve B Rafı sağ tarafta yer alır).
8) BD MAX™ Sistemine gerekli sayıda BD MAX™ PCR Cartridges yerleştirin.
9) BD MAX™ Sisteminin kapağını kapatın.
10) Prosedüre başlamak için "Start Run" (Çalıştırmaya Başla) düğmesine tıklayın.

8.3.4. BD MAX™ raporu

1) Ana menüde "Results" (Sonuçlar) düğmesine tıklayın.
2) Ya listenizdeki çalıştır tuşuna çift tıklayın ya da "view button"a (görüntüle düğmesi) basın.
3) "Print" (Yazdır) öğesine tıklayın ve: "Run Details, Test Details and Plot…" (Çalıştırma Detayları, Test Detayları ve Çizit....) öğesini seçin.
4) "Run Reports" (Raporları Çalıştır) ekranında "Print or Export" (Yazdır veya Dışa Aktar) düğmesine tıklayın-

9. Sonuçların yorumlanması

Verilerin nasıl analiz edileceğine dair ayrıntılı açıklama için, BD MAX™ Sistemi Kullanım Kılavuzuna bakın.

Verilerin analizi, üreticinin talimatlarına göre BD MAX™ yazılımı tarafından yapılır. BD MAX™ yazılımı, aşağıdaki şekilde test edilen her bir numunenin her bir tespit kanalı için Ct değerlerini ve amplifikasyon eğrilerini raporlar:

- 0'ın Ct değeri, belirtilen Eşik değerine sahip yazılım tarafından hesaplanan hiçbir Ct değerinin olmadığını gösterir (bkz. Tablo 3). "0" Ct değeri gösteren numunenin amplifikasyon eğrisi manuel olarak kontrol edilmelidir.

- -1'lik Ct değeri, amplifikasyon işleminin gerçekleşmediğini gösterir.

- Diğer herhangi bir Ct değeri, amplifikasyon eğrisi ile ilintili olarak ve Tablo 6'te verilen numune yorumlama kılavuzlarına göre yorumlanmalıdır.

Amplifikasyon karışımının doğru çalıştığını doğrulamak için Dahili Kontrol sinyalini kontrol edin. Ek olarak, herhangi bir BD MAX™ Sistem hatası raporu olup olmadığını kontrol edin.

-Sonuçlar aşağıdaki tabloyu kullanarak okunmalı ve analiz edilmelidir:

***vanA* geni (475/520)**	***vanB* geni (585/630)**	**Dahili kontrol (530/565)**	**Yorumlama**
+	+	+/-[1]	***vanA* ve *vanB* genler DNA Tespit**
+	-	+/-[1]	***vanA* gene DNA Tespit, *vanB* gen DNA Tespit edilmedi[1]**
-	+	+/-[1]	***vanB* gene DNA Tespit, *vanA* gen DNA Tespit edilmedi[1]**
-	-	+[2]	***vanA* ve *vanB* genler DNA Tespit edilmed[2]**
-	-	-[2]	**Resultado no resuelto (UNR) debido a la presencia de inhibidores en la reacción de PCR o a un problema general (no informado por un código de error) durante el procesamiento de la muestra y/o la etapa de amplificación[2]**
IND	IND	IND	**Resultado indeterminado (IND) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de un fallo del instrumento vinculado a un código de error.**
INC	INC	INC	**Resultado de ensayo incompleto (INC) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de que no se complete la prueba.**

Tablo 6. Numunelerin yorumlanması

+: Amplifikasyon meydana geldi

-: Amplifikasyon meydana gelmedi

1 Elde edilen Ct değeri 40'tan küçükse, numune pozitif olarak kabul edilir. Yüksek sayıda hedef kopyası olması, dahili kontrol yerine hedefe özgü nükleik asitlerin tercihli amplifikasyonuna neden olabileceğinden; dahili kontrol, bir amplifikasyon sinyali gösterebilir veya göstermeyebilir. Bu durumlarda, IC'nin tespit edilmesi gerekli değildir.

2 Numune, tespit sistemi içerisinde amplifikasyon sinyali göstermiyorsa ancak dahili kontrol pozitifse, numune negatif olarak kabul edilir (Ct değeri 40'tan küçük). PCR reaksiyonunun inhibisyonu, dahili kontrolün amplifikasyonu ile hariç tutulabilir. Çözümlenmemiş sonuçlarda (UNR), negatif numunede dahili kontrol sinyalinin olmaması durumunda aşağıdaki belirtileri izleyerek testi tekrarlamanız önerilir.

TEST PROSEDÜRÜNÜN TEKRARLANMASI

Belirsiz sonucun devam etmesi durumunda, kullanma talimatlarının, kullanıcı tarafından kullanılan ekstraksiyon işleminin gözden geçirilmesi; her bir RT-qPCR adımının doğru performansının teyidi ve parametrelerin gözden geçirilmesi; ayrıca eğrinin sigmoid şeklinin ve flüoresans yoğunluğunun kontrol edilmesi önerilir.

NOT: Numune Tampon Tüpünde bir tekrar testi için yeterli hacim mevcuttur. 2-8 °C veya 25 °C'de saklanan, hazırlanmış BD MAX™ Numune Tampon Tüpleri için tekrar testi 24 saat içinde yapılmalıdır.

NOT: Yeni numuneler aynı çalışmada tekrarlanan numunelerle birlikte test edilebilir.

Test sonuçları tıbbi geçmiş, klinik semptomlar ve diğer tanı testleri baz alınarak, bir sağlık uzmanı tarafından değerlendirilmelidir.

10. Testin kısıtlamaları

- Test sonuçları tıbbi geçmiş, klinik semptomlar ve diğer tanı testleri baz alınarak, bir sağlık uzmanı tarafından değerlendirilmelidir.
- Her ne kadar bu analiz diğer numune tipleriyle birlikte kullanılabilse de, ESwab™ taşıma ortamı ve koloni süspansiyonu kullanılarak toplanan perianal ve/veya rektal swablar ile doğrulanmıştır.
- İyi bir test performansı için liyofilize ürün, tüpün altında olmalı ve tüpün üst alanına veya folyo kapamaya yapışmamalıdır. Tüm ürünün tüpün altında olduğundan emin olmak için her bir tüpü sert bir yüzeye hafifçe vurun.
- Reaksiyon karışımının, normalde tüpün altında, normalden farklı (konik şekil olmayan, homojen olmayan, boyut olarak daha küçük/daha büyük ve/veya beyazımsı renkten farklı) stabilize formatta görünümü, testin işlevini değiştirmez.
- Testin kalitesi numunenin kalitesine bağlıdır; perianal ve/veya rektal swablardan ve kolonilerden uygun şekilde ekstrakte edilmiş nükleik asitlerin varlığı önemlidir.
- Testin kalitesi numunenin kalitesine bağlıdır; solunum numunelerinden uygun şekilde ekstrakte edilmiş nükleik asitlerin varlığı önemlidir.
- Bu gibi durumlarda, tespit sınırının altında son derece düşük hedef seviyeleri tespit edilebilir, ancak sonuçlar tekrarlanamayabilir.
- Yüksek konsantrasyonlarda hedef DNA içeren vankomisin direnci şüphesi olan numunelerin çapraz kontaminasyonu nedeniyle veya önceki reaksiyonlardan kalan PCR ürünleriyle kontaminasyon gibi sebepler yüzünden hatalı pozitif sonuçların ortaya çıkma olasılığı bulunmaktadır.
- Yalancı Negatif sonuçlar, aşağıdakiler dahil çeşitli faktörlerden ve bunların kombinasyonlarından kaynaklanabilir:
    - Uygun olmayan örneklerin toplanması, taşınması, depolanması ve/veya muamele yöntemleri.
    - Uygun olmayan işleme prosedürleri (DNA ekstraksiyonu dahil).
    - Numunelerin taşınması/depolanması ve/veya işlenmesi sırasında DNA'nın bozulması.
    - Primer veya prob bağlama bölgelerindeki mutasyonlar veya polimorfizmler, yeni veya bilinmeyen vanA geninin ve/veya vanB gen varyantlarının tespitini etkileyebilir.
    - Örnekteki vankomisin dirençli organizma yükü, tahlil için tespit sınırının altında.
    - RT-qPCR inhibitörlerinin veya diğer türden müdahale edici maddelerin varlığı.
    - Kullanım talimatlarına ve test prosedürüne uyulmaması.
- Negatif IC sinyali, klinik bir numunede *vanA* geni ve/veya *vanB* geni DNA'sının varlığını dışlamaz.
- Pozitif test sonucu, mutlaka canlı vancomycin resistance (vankomisin dirençli) organizmaların varlığını göstermez ve bu organizmaların bulaşıcı olduğu veya klinik semptomlara neden olan ajanlar olduğu anlamına gelmez. Ancak pozitif sonuç, hedef vancomycin resistance (vankomisin dirençli) dizilerin varlığının göstergesidir.
- Negatif sonuçlar vancomycin resistance (vankomisin dirençli) organizma enfeksiyonunu dışlamaz ve tedavi veya diğer hasta yönetimi kararları için yegane dayanak olarak kullanılmamalıdır.
- VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit kullanılarak Çözümlenmemiş, Belirsiz veya Eksik sonuçların alınması durumunda, yeniden test yapılması gerekecektir. Çözümlenmemiş sonuçlar, numunede inhibitörlerin varlığından veya liyofilize edilmiş reaksiyon karışımı tüpünün yanlış rehidrasyonundan kaynaklanabilir. Bir cihaz arızası varsa, Belirsiz veya Eksik sonuçlar elde edilecektir.

11. Kalite kontrol

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, her reaksiyon tüpünde tekniğin doğru biçimde uygulandığını onaylayan dahili bir kontrol (IC) içerir.

12. Performans özellikleri

12.1. Klinik duyarlılık ve özgüllük

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit'in klinik performansı, VRE enfeksiyonundan şüphelenilen hastalardan alınan klinik örnekler (rektal sürüntüler) kullanılarak test edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki gibiydi:

	Saha	Numune türü	İş akışı	Hedef
1	Klinik Mikrobiyoloji, Enfeksiyon Hastalıkları Merkezi ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı hizmetleri, NSW Sağlık Patolojisi, Westmead Hastanesi (Sidney, Avustralya)	Rektal sürüntü	BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System	*VanA* geni
				VanB geni
				VanA + *VanB* genleri

Tablo 6. Saha, numune türü, iş akışı ve hedef.

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit için gerçek pozitif ve negatif değerler, yalancı pozitif ve negatif değerler, duyarlılık ve özgüllük değerleri aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi her bir karşılaştırıcı testle ilgili olarak hesaplanmıştır:

Saha	Karşılaştırma testi	Hedef	TP	TN	FP	FN	Hassasiyet	Özgüllük
1	Dahili 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)

Tablo 7. Gerçek pozitif (TP) ve negatif (TN) değerler, hatalı pozitif (FP) ve negatif (FN) değerler, VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit için hassasiyet ve özgüllük.

Sonuçlar, VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit kullanılarak *vanA* ve *vanB* genlerinin saptanmasında yüksek düzeyde uyum olduğunu göstermektedir.

Buna ek olarak numune işleme kontrol başarısızlık oranı hesaplanmıştır. Çözümlenmemiş reaksiyonların (UNR) başlangıç sayısı 3'tür (Başlangıç UNR oranı: %1,39). Tekrar sonrası UNR sayısı 0 idi (Nihai UNR oranı: %0,00).

BD MAX™ için uyarlanmış VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit'in diğer farklı matris numuneleriyle uyumluluğunu değerlendirmek için vankomisine dirençli enterokok kolonileri süspansiyonlarının tespitini doğrulamak amacıyla bir değerlendirme yapıldı.

500 µl nükleaz içermeyen su içinde belirli bir kültürün iki kolonisi eklenerek farklı koloni süspansiyonları hazırlandı. Bu değerlendirme için kullanılan suşlar CECT 5253 *Enterococcus faecium van*A, CECT 8120 *Enterococcus faecalis van*B, NCTC 12201 *Enterococcus faecalis van*A ve NCTC 13632 *Enterococcus faecalis van*A idi. Her koloni süspansiyonundan 10 µl'lik bir hacim doğrudan numune tampon tüpüne ilave edildi. Bu değerlendirmeyi gerçekleştirmek için kullanılan akış şeması: BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System.

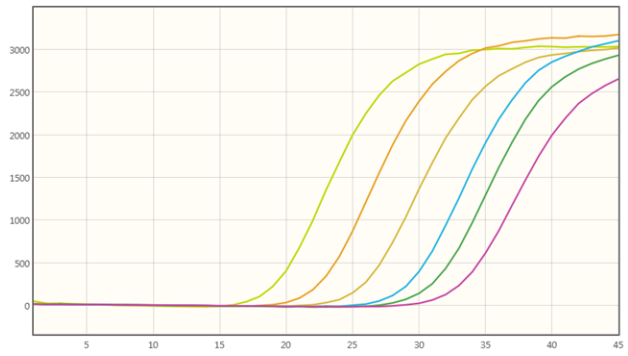
Elde edilen sonuçlar, CECT 5253, NCTC 12220 ve NCTC 13632 koloni süspansiyonlarının *van*A geni için pozitif olduğunu ve CECT 8120 koloni süspansiyonunun *van*B geni için pozitif olduğunu gösterdi.

Bu sonuçlar, VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit'in koloni süspansiyonlarındaki *van*A ve *van*B genlerini düzgün bir şekilde tespit edebildiğini göstermektedir.

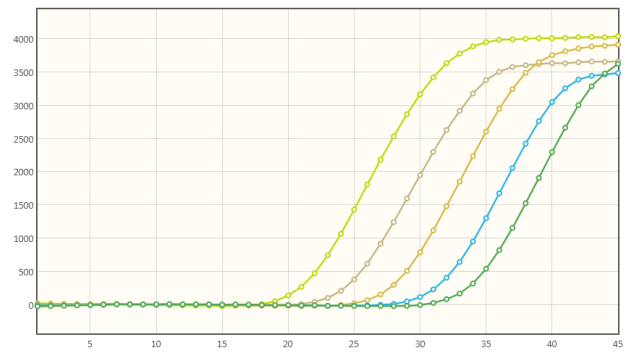
12.2. Analitik hassasiyet

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, *vanA* için her reaksiyonda ≥4 koloni oluşturan birim(CFU / rxn) ve *vanB* için ≥10 reaksiyon başına koloni oluşturucu ünite (CFU/rxn) (Şekil 2 ve 3) perianal ve rektal sürüntülerde ≥% 95 oranında pozitif bir tespit sınırına sahiptir.

Şekil 2. *vanA* geni (3.62*10⁴-3.62 CFU/rxn) şablonunun BD MAX™ Sisteminde çalıştırılmasında dilüsyon serileri (475/520 (FAM) kanalı).



Şekil 3. *vanB geni (5.65*10⁴-9.98 CFU/rxn) şablonunun BD MAX™ Sisteminde çalışılmasında dilüsyon serileri (585/630 (ROX) kanalı).*



12.3. Analitik özgüllük

Vankomisin direnç testinin özgüllüğü, farklı antimikrobiyal dirençli organizmalardan ve bağırsakta bulunan en yaygın enterik patojenleri veya florayı temsil eden farklı mikroorganizmalardan oluşan bir panelin test edilmesiyle doğrulanmıştır. Her bir testin hedeflenen patojenleri hariç, test edilen aşağıdaki mikroorganizmaların hiçbiri arasında çapraz reaktivite tespit edilmemiştir:

Çapraz reaktivite testi					
Adenovirüs serotipleri 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	*Enterococcus durans*	-	TEM-1 (ESBL olmayan), SHV-1 (ESBL olmayan), CTX-M-2 (ESBL) ve KPC-2 üreten Klebsiella pnömonisi izolatı	-
Aeromonas caviae	-	VanC tipi Enterokok casseliflavus	-	*Listeria monocytogenes*	-
Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila	-	VanC2 tipi Enterokok casseliflavus	-	Norovirüs GI ve GII	-
Arcobacter butzleri	-	*Enterococcus faecalis*	-	*Proteus vulgaris*	-
Astrovirüs Genotipi I-VIII	-	VanA tipi Enterokok faecalis	- / +	*Pseudomonas aeruginosa*	-
Bacteroides fragilis	-	VanB tipi Enterokok faecalis	- / +	Rotavirüs A	-
Blastocystis hominis	-	*Enterococcus faecium*	-	*Salmonella bongori*	-
Campylobacter coli	-	VanA tipi Enterokok faecium	+ / -	*Salmonella enteritidis*	-
Campylobacter fetus	-	VanB tipi Enterokok faecium	- / +	*Salmonella gallinarum*	-
Campylobacter hyointestinalis	-	VanB ve VanC tipleri Enterokok gallinarum	- / +	*Salmonella paratyphi A*	-
Campylobacter jejuni subsp. jejuni	-	VanC - tipi Enterokok gallinarum	-	*Salmonella paratyphi B*	-
Campylobacter lari	-	VanC1 tipi Enterokok gallinarum	-	*Salmonella pullorum*	-
Campylobacter upsaliensis	-	*Enterococcus hirae*	-	*Salmonella typhi*	-
Candida albicans	-	Enterohemorajik Escherichia coli	-	*Salmonella typhimurium*	-
Citrobacter braakii izolatı üreten VIM-1	-	Enteroinvaziv Escherichia coli	-	Sapovirüs	-
Citrobacter freundii	-	Enteropatojenik Escherichia coli	-	*Serratia liquefaciens*	-
Citrobacter freundii-kompleks izolatı üreten KPC-3 ve VIM-4	-	Enterotoksijenik *Escherichia coli*	-	Serratia marcescens izolatı üreten OXA-48	-
Clostridium difficile	-	Escherichia coli izolatı üreten OXA-244	-	*Shigella dysenteriae*	-
Clostridium difficile 027	-	Escherichia coli izolatı üreten TEM-1 (ESBL olmayan) ve IMP-1	-	*Shigella flexneri*	-
Clostridium perfringens	-	*Giardia intestinalis*	-	*Staphylococcus aureus subsp. aureus*	-
Cryptosporidium parvum/hominis	-	*Helicobacter cinaedi*	-	Metisiline dirençli Staphylococcus aureus (mecC)	-
Dientamoeba fragilis	-	*Helicobacter heilmannii*	-	Metisiline dirençli Staphylococcus aureus (MRSA) suşu N315	-
Entamoeba dispar	-	*Helicobacter hepaticus*	-	Metisiline dirençli Staphylococcus aureus (MRSA) ST398	-
Entamoeba histolytica	-	*Helicobacter pylori*	-	Metisiline dirençli Staphylococcus aureus (MRSA) suşu (oxa R, PVL pozitif, spa tipi t310)	-
Enterobacter cloacae izolatı üreten SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) ve OXA-48	-	Klaritromisine dirençli Helicobacter pylori (23S rDNA A2146G)	-	*Vibrio parahaemolyticus*	-
Enterobacter cloacae izolatı üreten TEM-1 (ESBL olmayan), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) ve NDM-1	-	Klaritromisine dirençli Helicobacter pylori (23S rDNA A2147G)	-	*Yersinia enterocolitica* O:3	-
Enterobacter kloak kompleksi izolatı üreten NDM-7	-	*Klebsiella oxytoca*	-	*Yersinia enterocolitica* O:9	-
VanA tipi Enterokok avium	+ / -	Klebsiella pnömonisi izolatı üreten SHV-1 (ESBL olmayan), KPC-3 ve OXA-48	-		

Tablo 8. Bu çalışmada kullanılan referans patojenik mikroorganizmalar.

12.4. Analitik reaktivite

VanA geni için VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit'in reaktivitesi, *vanA* tipi Enterococcus avium, vanA tipi *Enterococcus faecalis* (NCTC 13632, NCTC 12201) ve *vanA*- tipi *Enterococcus faecium* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202) suşlarından ekstrakte edilen DNA ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş olup, pozitif sonuçlar göstermiştir.

VanB geni için VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit'in reaktivitesi, *vanB* tipi *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299, CECT 8120), *vanB* tipi *Enterococcus faecium* (IOWA 2) ve *vanB* ve *vanC Enterococcus gallinarum* (ENT20120142) suşlarından ekstrakte edilen DNA ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş olup, pozitif sonuçlar göstermiştir.

Bibliography/ Bibliyografi

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/ IVD bileşenlerinin ve reaktiflerin sembolleri

IVD	*In vitro* diagnostic device *In vitro* tanı cihazı		Keep dry Kuru halde tutun		Use by Son kullanma tarihi		Manufacturer Üretici	LOT	Batch code Parti kodu (Lot)
	Consult instructions for use Kullanım Talimatlarına Bakın		Temperature limitation Sıcaklık sınırlaması	Σ	Contains sufficient for <n> test <n> testi için yeterli içerik	UDI	Unique Device Identification Benzersiz Cihaz Kimliği	REF	Catalogue number Katalog numarası

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 / Kontrol Değişimi		
Version No. / Versiyon nº	**Changes / Değişiklikler**	**Date / Tarih**
00	Unification of all instructions for use associated with the different catalogue references in a single format / Farklı katalog referanslarıyla ilişkili tüm kullanım talimatlarının tek bir formatta birleştirilmesi.	21/06/2021

Table A 2. Control change table / Kontrol değişim tablosu.

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

CSQ MED ISO 13485

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.
The products, services and data set out in this document may suffer changes and/or variations on the texts and pictures shown.