

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Vancomycin resistance
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Diese Gebrauchsanweisung gilt für die folgende Referenz:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERENZ
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. / Referenz für das Produkt, das mit dem BD MAX™ System verwendet werden soll.

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

Inhalt

1.	Verwendungszweck.....	19
2.	Zusammenfassung und Erläuterung	19
3.	Verfahrensprinzip.....	20
4.	Bereitgestellte Reagenzien.....	20
5.	Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung	21
6.	Transport- und Lagerbedingungen	21
7.	Sicherheitshinweise für den Benutzer	21
8.	Testverfahren	22
8.1.	Probenentnahme, -lagerung und -transport.....	22
8.2.	Probenvorbereitung und DNA-extraktion.....	23
8.3.	PCR-protokoll.....	23

9.	Ergebnisinterpretation.....	27
10.	Grenzen des Tests.....	29
11.	Qualitätskontrolle	30
12.	Testeigenschaften.....	30
12.1.	Klinische Empfindlichkeit und Spezifität	30
12.2.	Analytische Empfindlichkeit	31
12.3.	Analytische Spezifität	32
12.4.	Analytische Reaktivität	33
	Bibliography/ Literaturverzeichnis.....	34
	Symbols for IVD components and reagents/ Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien	34
	Trademarks.....	34

ENGLISH

1. Intended use

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

2. Summary and Explanation

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

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

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

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

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

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

3. Principle of the procedure

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

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

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

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

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

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

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

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

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

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

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

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

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

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

8. Test procedure

8.1. Sample collection, transport and storage

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

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

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

8.2. Sample preparation and DNA extraction

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

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

8.3. PCR protocol

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

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

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

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

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

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

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

Table 3. PCR settings.

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

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

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

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 5. PCR protocol.

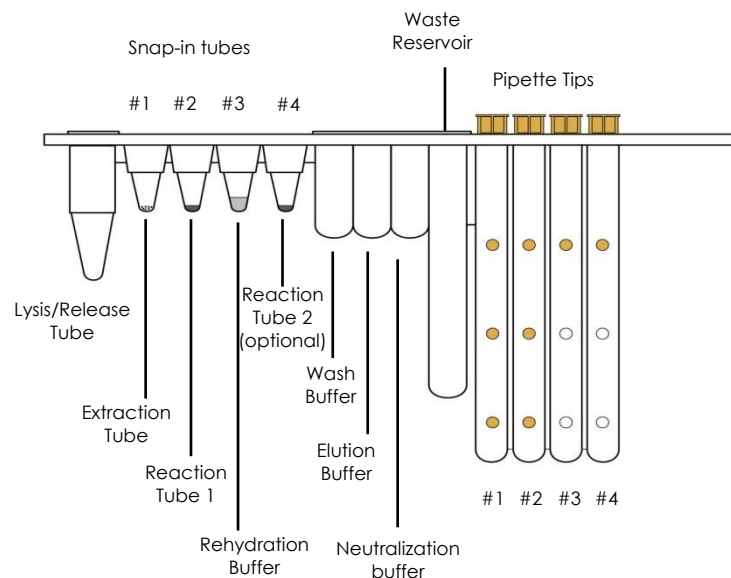
- 12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

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

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

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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

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

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

8.3.4. BD MAX™ report

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

9. Result interpretation

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

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

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

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

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

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

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

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

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

REPEAT TEST PROCEDURE

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

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

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

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

10. Limitations of the test

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

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

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12.2. Analytical sensitivity

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

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

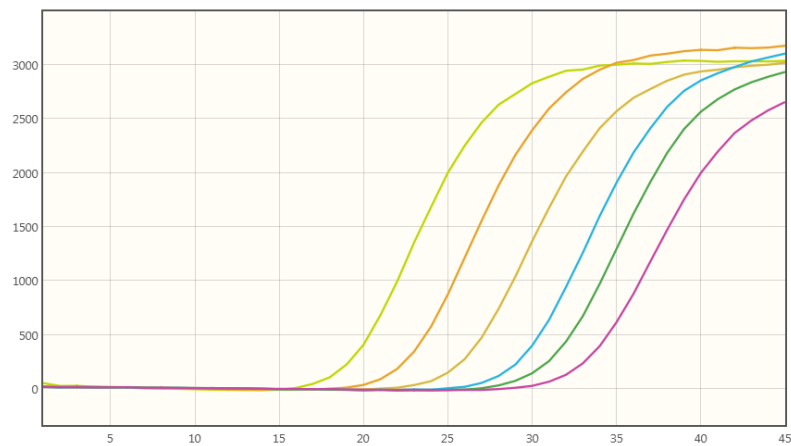
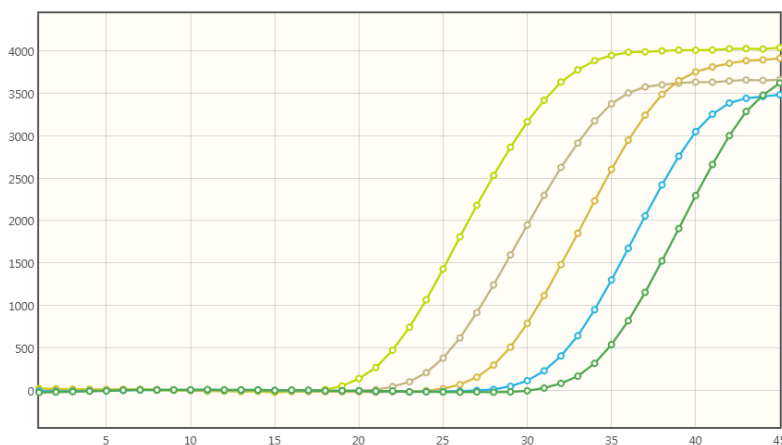


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene (5.65×10^4 - 9.98 CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



12.3. Analytical specificity

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

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

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

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

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

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

DEUTSCH

1. Verwendungszweck

Das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit ist für den spezifischen Nachweis und die Differenzierung zwischen *vanA*- und *vanB*-Genen, die mit Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) assoziiert werden können, aus direkten perianalen und/oder rektalen Abstrichen sowie Kolonien vorgesehen. Dieser Test soll die Identifizierung von Vancomycin-resistenten Keimen in Kombination mit den klinischen und epidemiologischen Risikofaktoren des Patienten erleichtern. Der Assay verwendet das BD MAX™ System zur automatisierten DNA-Extraktion und anschließenden Echtzeit-PCR durch Einsatz der mitgelieferten Reagenzien in Kombination mit universellen Reagenzien und Einwegartikeln des BD MAX™ Systems. Die DNA aus perianalen und/oder rektalen Abstrichen und Kolonien wird über Sonden mit fluoreszierendem Reporterfarbstoff, der spezifisch an die *vanA*- und *vanB*-Gene bindet, nachgewiesen.

2. Zusammenfassung und Erläuterung

Enterokokken sind häufige kommensale Keime, die im Magendarmtrakt und den weiblichen Geschlechtsorganen vorkommen. In jüngster Zeit wurden sie als opportunistische Pathogene anerkannt, die nosokomiale Infektionen wie Harnwegsinfektionen, Hautinfektionen, Atemwegsinfektionen, Endokarditis und Sepsis beim immungeschwächten Wirt auslösen können.

Vancomycin ist ein Glykopeptid-Antibiotikum, das Zellwandsynthese hemmt und zur Behandlung von schweren Infektionen mit grampositiven Bakterien eingesetzt wird. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) wurden 1986 zum ersten Mal in England und Frankreich gemeldet und sind heute weltweit in Krankenhäusern anzutreffen.

Die Resistenz gegenüber Vancomycin ist ein komplexer Prozess und erfordert die Präsenz verschiedener Gencluster. Je nach den Pentapeptid-Präkursoren, die von Vancomycin-Resistenz-Genen erzeugt werden, können diese hauptsächlich in folgende zwei Arten unterteilt werden: der auf D-Alanin-D-Serin (VanC-, VanE-, VanG-, VanL- und VanN-Typ) oder auf D-Alanin-D-Laktat (VanA-, VanB-, VanD- und VanM-Typ) endende Präkursor. Diese Pentapeptid-Präkursoren zeigten eine niedrige Affinität für Glykopeptide und übertrugen Vancomycin-Resistenzen auf Enterokokken.

Die erste Art von Vancomycin-Resistenz bei Enterokokken ist eine intrinsische Resistenz (d. h. eine mit dem *vanC*-Gen assoziierte Resistenz). Isolate von *Enterococcus gallinarum* und *E. casseliflavus*/*E. flavescens* zeigen eine inhärente, niedriggradige Resistenz gegenüber Vancomycin. Der zweite Typ ist eine erworbene Resistenz (d. h. *vanA*- oder *vanB*-Gen), bei der Enterokokken durch Erwerb mobiler genetischer Elemente (Transposons und Plasmide) von anderen *Enterococcus*-Arten oder Keimen resistent werden können. Am häufigsten wird diese Resistenz bei *E. faecium* und *E. faecalis* beobachtet, wurde jedoch auch bei *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* und weiteren anderen Enterokokken-Arten festgestellt. Die *vanA*- und *vanB*-Gene sind für hoch- oder mittelgradige Vancomycin-Resistenzen verantwortlich.

Die Übertragung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) kann durch direkten Kontakt mit Körperflüssigkeiten von kolonisierten oder infizierten Patienten (Blut, nässende Wunden, Urin, Stuhl, Septum und ähnliches) oder durch indirekten Kontakt über die Hände von medizinischem Personal bzw. über kontaminierte Patientengeräte oder umgebende Flächen erfolgen.

Die ursprünglich angewandte Screening-Methode beruhte auf der Anlage von Kulturen, was zeitaufwändig ist und in der Regel ein bis fünf Tage in Anspruch nimmt. Echtzeit-PCR-Assays haben sich als Mittel zum Nachweis von klinisch relevanten Genen, die mit Vancomycin-Resistenz assoziiert sind, erwiesen.

3. Verfahrensprinzip

Das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit ist für die Identifizierung und Differenzierung von DNA aus Vancomycin-resistenten Enterokokken und anderen Keimen, die Träger der Vancomycin-Resistenz-Gene *vanA* und *vanB* sind, vorgesehen. Nach der DNA-Isolation erfolgt die Identifizierung von Vancomycin-Resistenz durch Amplifikation einer konservierten Region der *vanA*- und *vanB*-Gene mithilfe spezifischer Primer und einer fluoreszenzmarkierten Sonde.

Das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit nutzt die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase. Während der DNA-Amplifikation spaltet dieses Enzym die an die komplementäre DNA-Sequenz gebundene Sonde, wodurch der Quencher-Farbstoff vom Reporter getrennt wird. Diese Reaktion erzeugt eine zur Quantität des Ziel-Templates proportionale Steigerung des Fluoreszenzsignals. Diese Fluoreszenz wird vom BD MAX™ System gemessen.

Das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit enthält in jedem Gefäß bereits die für den Echtzeit-PCR-Test erforderlichen Komponenten (spezifische Primer/Sonden, dNTP, Puffer, Polymerase) in stabilisierter Form sowie eine interne Kontrolle zur Überwachung des Extraktionsprozesses und/oder einer eventuellen Inhibition der Polymeraseaktivität.

Ziel	Kanal	Gen
Vancomycin-Resistenz-Gene	475/520	<i>vanA</i>
Vancomycin-Resistenz-Gene	585/630	<i>vanB</i>
Intern Kontrolle (IK)	530/565	-

Tabelle 1. Ziel, kanal und genes.

4. Bereitgestellte Reagenzien

Im VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit sind die in Tabelle 2 aufgeführten Materialien und Reagenzien enthalten:

Reagenz/Material	Beschreibung	Barcode	Menge
<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube	Eine Mischung aus Enzymen, Primern, Sonden, Puffer, dNTP, Stabilisatoren und einer internen Kontrolle in stabilisierter Form	1B-folie	2 Beutel mit je 12 transparent Röhrrchen
Rehydration Buffer tube	Lösung zur Rekonstitution des stabilisierten Produkts	11-folie	1 Beutel mit 24 transparent Röhrrchen

Tabelle 2. Im VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit mit der Kat.-Nr. VS-VAN124 (444202) enthaltene Reagenzien und Materialien.

5. Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung

Nachfolgend sind die erforderlichen, jedoch nicht im Lieferumfang des VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kits enthaltenen Materialien aufgeführt.

- Echtzeit-PCR-Gerät: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref:442825 oder 442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortexmischer
- Mikropipetten (präzise zwischen 2 und 1000 µl)
- Nuklease-freies Wasser
- Filterspitzen
- Puderfreie Einweghandschuhe

6. Transport- und Lagerbedingungen

- Die Kits können bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei 2 °C bis 40 °C transportiert und gelagert werden.
- Nach dem Öffnen der Aluminiumbeutel können die darin enthaltenen Reaktionsgefäße bis zu 28 Tage verwendet werden.

7. Sicherheitshinweise für den Benutzer

- Dieses Produkt ist ausschließlich für die Verwendung durch Fachpersonal, wie Labor- oder Gesundheitsfachkräfte und -techniker vorgesehen, die für molekularbiologische Verfahren geschult sind.
- Für den Einsatz in der *In-vitro*-Diagnostik.
- Keine abgelaufenen Reagenzien und/oder Materialien verwenden.
- Das Kit nicht verwenden, wenn das Etikett, das die Außenverpackung versiegelt, aufgerissen ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbehälter bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt sind.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn sich in den Reagenzbeuteln kein Trockenmittel befindet oder dieses beschädigt ist.
- Trockenmittel nicht aus Reagenzbeuteln entfernen.
- Schutzbeutel von Reagenzien nach jedem Gebrauch sofort mit dem Zippverschluss schließen. Vor dem Verschließen überschüssige Luft aus den Beuteln entfernen.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Folie gerissen oder beschädigt ist.
- Reagenzien unterschiedlicher Beutel und/oder Kits und/oder Chargen nicht vermischen.
- Die Reagenzien vor Feuchtigkeit schützen. Sollten diese für längere Zeit Feuchtigkeit ausgesetzt sein, wirkt sich dies nachteilig auf die Produktleistung aus.
- Die Komponenten vor Licht schützen.
- In Fällen, in denen andere PCR-Tests im selben allgemeinen Laborbereich durchgeführt werden, ist Sorge dafür zu tragen, dass das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, das BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit, sonstige zusätzlich für den Test erforderlichen Reagenzien und das BD MAX™ System nicht kontaminiert werden. Vermeiden Sie unter allen Umständen Kontamination durch Mikroorganismen

sowie Ribonuklease (RNase)/Desoxyribonuklease (DNase). Es wird die Verwendung von RNase-/DNase-freien, aerosolresistenten Einweg-Pipettenspitzen oder Direktverdrängungspipettenspitzen empfohlen. Verwenden Sie für jede Probe eine neue Spitze. Vor dem Umgang mit Reagenzien und Kartuschen Handschuhe wechseln.

- Um die Kontamination der Umgebung durch Amplikons zu vermeiden, zerbrechen Sie die „BD MAX™ PCR Cartridge“ (BD MAX™ PCR-Kartusche) nicht nach Gebrauch. Die Versiegelung der „BD MAX™ PCR Cartridge“ (BD MAX™ PCR-Kartusche) ist darauf ausgelegt, Kontaminationen zu verhindern.
- Einen Arbeitsfluss in eine Richtung implementieren. Der Arbeitsfluss sollte im Extraktionsbereich beginnen und zum Amplifikations- und Detektionsbereich übergehen. Keine Proben, Ausrüstungsgegenstände oder Reagenzien in einen Bereich zurückholen, in dem ein vorheriger Schritt durchgeführt wurde.
- Die Grundsätze der guten Laborpraxis befolgen. Schutzkleidung, Einweghandschuhe, Schutzbrillen und Schutzmasken verwenden. Im Arbeitsbereich nicht essen, trinken rauchen oder kosmetische Produkte auftragen. Nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- Proben sowie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit den Proben in Berührung gekommen sind, immer als potenziell infektiös und / oder biologisch gefährlich betrachten und entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien behandeln. Während der Entnahme, Transport, Lagerung, Verarbeitung und Entsorgung von Proben die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Proben und Reagenzien müssen in einer biologischen Sicherheitswerkbank gehandhabt werden. Persönliche Schutzausrüstung (PSA) verwenden, die den aktuellen Richtlinien für den Umgang mit potenziell infektiösen Proben entspricht. Abfall in Übereinstimmung mit den örtlichen und Landesvorschriften entsorgen.
- Eine regelmäßige Dekontaminierung von häufig genutzten Ausrüstungsgegenständen und Flächen, insbesondere Mikropipetten und Arbeitsoberflächen, wird empfohlen.
- Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH) sind für „VIASURE Real Time PCR Detection Kits“ aufgrund ihrer Einstufung als nicht gesundheits- und umweltgefährdend keine Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheet) erforderlich, da Stoffe und/oder Gemische, die die in der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (CLP) festgelegten Kriterien für die Gefahreneinstufung erfüllen, nicht darin enthalten sind bzw. in Konzentrationen vorliegen, die über dem in der genannten Verordnung festgelegten Wert für ihre Deklaration liegen.
- Weitere Warn-, Sicherheits- und Verfahrenshinweise finden Sie im Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.

8. Testverfahren

8.1. Probenentnahme, -lagerung und -transport

Das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit wurde für direkt in ein Eswab™-Transportmedium (auf flüssigem Amies basierendes Entnahme- und Transportsystem) (Copan, Italien) aufgenommene perianale und/oder rektale Abstriche validiert. Das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit wurde ebenso für Kolonie-Suspensionen validiert. Andere Arten von Proben müssen vom Benutzer validiert werden.

Die Entnahme, die Lagerung und der Transport von Proben sollte unter den vom Benutzer validierten Bedingungen erfolgen. Im Allgemeinen sind perianale und/oder rektale Abstriche in einem sauberen und ordnungsgemäß gekennzeichneten ESwab™-Transportmedium zu entnehmen und zur Gewährleistung der Testqualität so schnell wie möglich zu verarbeiten. Die Proben sollten gemäß den lokalen und nationalen Bestimmungen für den Transport von pathogenem Material und nicht länger als 24 Stunden bei 2 bis 8 °C

transportiert werden. Für den Langzeittransport (über 24 Stunden) empfehlen wir eine Beförderung bei $\leq -20\text{ °C}$ oder niedriger. Es wird empfohlen, frische Proben für den Test zu verwenden. Die Proben können bis zu 24 Stunden bei 25 °C , bis zu 144 Stunden (6 Tage), 2 bis 8 °C oder bis zu 196 Stunden (8 Tage) bei -70 °C eingefroren gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden, um eine Schädigung der Proben und Nukleinsäuren zu vermeiden.

Fäkalproben müssen gemäß den entsprechenden Laborrichtlinien entnommen, transportiert und gelagert werden. Einzelheiten finden sich in den CDC-Leitlinien (Specimen Collection Guidelines, Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) und der IDSA-Leitlinie (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. Probenvorbereitung und DNA-extraktion

Die Probenvorbereitung gemäß den in der Gebrauchsanweisung des verwendeten Extraktionskits BD MAX™ ExK™ TNA-2 aufgeführten Empfehlungen durchführen. Bitte beachten Sie, dass andere Proben möglicherweise eine Vorbehandlung erfordern. Applikationsspezifische Vorbereitungsmaßnahmen für die Extraktion sind vom Benutzer zu bestimmen und zu validieren.

1. Copan ESwab™: Pipettieren Sie $200\ \mu\text{l}$ der ESwab™-Probe in ein BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube (Probenpufferröhrchen) und verschließen Sie das Röhrchen mit einem Septumverschluss. Stellen Sie eine vollständige Vermischung sicher, indem Sie die Probe bei hoher Geschwindigkeit 1 Minute vortexen. Führen Sie die Bearbeitung am BD MAX™ System Operation.
2. Kolonien: Entnehmen Sie dem Kulturmedium zwei Kolonien und suspendieren Sie diese in $500\ \mu\text{l}$ Nuklease-freiem Wasser. Stellen Sie die vollständige Vermischung durch Vortexen sicher. Pipettieren Sie $10\ \mu\text{l}$ der Suspension in ein BD MAX™ ExK™ TNA-2 Sample Buffer Tube (Probenpufferröhrchen) und verschließen Sie das Röhrchen mit einem Septumverschluss. Stellen Sie eine vollständige Vermischung sicher, indem Sie die Probe bei hoher Geschwindigkeit 1 Minute vortexen. Führen Sie die Bearbeitung am BD MAX™ System Operation.

8.3. PCR-protokoll

Hinweis: Ausführliche Anweisungen entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.

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

Hinweis: Wenn Sie den test für VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit bereits erstellt haben, können Sie Schritt 8.3.1 auslassen und direkt zu Schritt 8.3.2 übergehen.

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems die Registerkarte „Test Editor“ (Test-Assistent).
- 2) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Create“ (Erstellen).

- 3) Benennen Sie in der Registerkarte mit den grundlegenden Informationen im Fenster „Test Name“ Ihren Test, d. h.: VIASURE *Vancomycin resistance*.
- 4) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Extraction Type“ (Extraktionstyp) die Option „ExK TNA-2“.
- 5) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Master Mix Format“ die Option „Type 5“ (Typ 5).
 - b. Hinweis: Das Produkt kann in Kombination mit einem zusätzlichen „VIASURE für BD MAX Test“ verwendet werden. Wählen Sie in einem solchen Fall die Option „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix Konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)).
- 6) Wählen Sie unter „Sample extraction parameters“ (Probenextraktionsparameter) die Option „User defined“ (Benutzerdefiniert) und stellen Sie das Probenvolumen auf 500 µl ein.
- 7) Wählen Sie unter „Ct Calculation“ (Ct-Berechnung) die Option „Call Ct at Threshold Crossing“ (Ct bei Grenzwertüberschreitung abrufen) aus.
- 8) Wenn Sie die Software-Version 5.00 oder eine höhere verwenden, wählen Sie unter „Custom Barcodes“ (Kundendefinierte Barcodes) die folgende Konfiguration:
 - a. Snap-In 2 Barcode (Barcode für Snap-In 2): 1B (betreffend das *Vancomycin resistance* reaction tube)
 - b. Snap-In 3 Barcode (Barcode für Snap-In 3): 11 (betreffend das Rehydration Buffer Tube)
 - c. Snap-In 4 Barcode (Barcode für Snap-In 4): ein weiteres VIASURE Reaktionsgefäß (andere Folie), wenn Sie das Format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix Konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)) wählen (Abschnitt 8.3.1).
- 9) Geben Sie in der Registerkarte „PCR settings“ (PCR-Einstellungen) folgende Parameter ein: „Channel Settings“ (Kanaleinstellungen), „Gains“ (Verstärkung) und „Threshold“ (Grenzwert) (Tabelle 3).
 - a. Hinweis: Das Produkt kann in Kombination mit einem zusätzlichen „VIASURE für BD MAX Test“ verwendet werden. In einem solchen Fall sind die PCR-Einstellungen und Testschritte für die Einrastposition 2 (grün) und Einrastposition 4 (blau) einzugeben.

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

Tabelle 3. PCR settings (PCR-Einstellungen.).

Hinweis: Es wird empfohlen, die oben für die einzelnen Kanäle aufgelisteten Mindest-Schwellenwerte als Ausgangspunkt einzustellen. Die endgültigen Einstellungen müssen jedoch vom Endanwender bei der Ergebnisinterpretation festgelegt werden, um sicherzustellen, dass die Schwellenwerte in der exponentiellen Phase der Fluoreszenzkurven und über einem etwaigen Hintergrundsignal liegen. Der Schwellenwert für verschiedene Geräte kann aufgrund verschiedener Signalintensitäten variieren.

- 10) Geben Sie in der Registerkarte „PCR settings“ (PCR-Einstellungen) auch die folgenden Parameter für „Spectral Cross Talk“ (Spektrale Übersprechung) (Tabelle 4) ein.

		False Receiving Channel (Falsch-empfangender Kanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Exzitationskanal)	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-	0.0

Tabelle 4. Parameter „Spectral cross-talk“ (Parameter für das spektrale Übersprechen).

- 11) Geben Sie in der Registerkarte „Test Steps“ (Testschritte) das PCR-Protokoll (Tabelle 5) ein.

Step Name (Schrittbezeichnung)	Profile Type (Profiltyp)	Cycles (Zyklen)	Time (s) (Zeit (s))	Temperature (Temperatur)	Detect (Detektion)
Initial denaturation (Initiale Denaturierung)	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturierung und Hybridisierung/Extension (Datenerfassung))	2-Temperatur	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabelle 5. PCR-Protokoll.

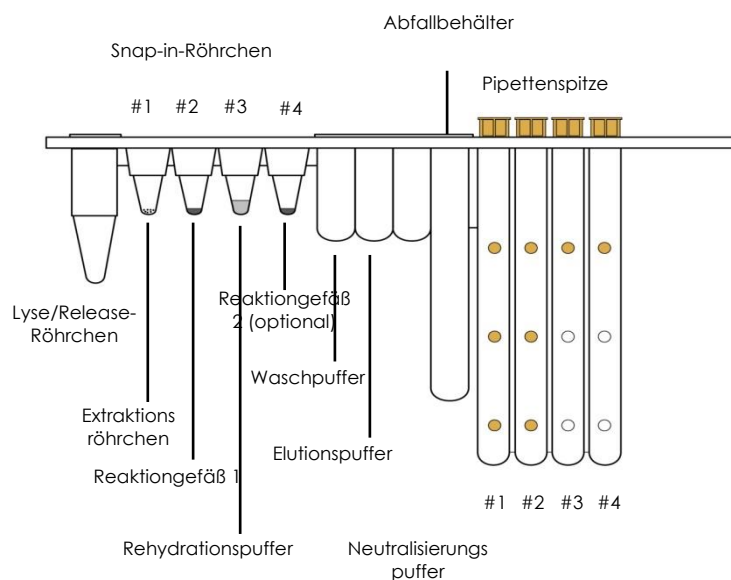
- 12) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Save Test“ (Test speichern).

8.3.2. Einrichten der BD MAX™ Racks

- Nehmen Sie für jede zu testende Probe einen Einzel-Reagenzstreifen aus dem BD MAX™ ExK TNA-2 Kit. Klopfen Sie jeden Streifen leicht auf eine harte Oberfläche, um sicherzustellen, dass sich alle Flüssigkeiten am Boden der Röhrchen befinden, und laden Sie sie in die Probenracks des BD MAX™ Systems.
- Nehmen Sie die benötigte Anzahl an BD MAX™ ExK™ TNA Extraktionsröhrchen (B4) (weiße Folie) aus den Schutzbeuteln heraus. Lassen Sie das/die Extraktionsröhrchen (weiße Folie) in ihre entsprechenden Positionen im TNA-Streifen einrasten (Einrastposition 1, weiße Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
- Bestimmen und separieren Sie die geeignete Anzahl an *Vancomycin resistance reaction tubes* (1B Folie) und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 2, grüne Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1).
 - Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.
 - Stellen Sie zur Durchführung einer korrekten Rehydratation bitte sicher, dass sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.

- i. Hinweis: Wenn Sie das Format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix Konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)) (Abschnitt 8.3.1) wählen, bestimmen und separieren Sie die benötigte Anzahl an zusätzlichen VIASURE Reaktionsgefäßen (andersfarbige Folie) und lassen Sie sie in die entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 4, blaue Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.
- 4) Entnehmen Sie die benötigte Anzahl an Rehydrations Buffer tubes (11 Folie) und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 3, ohne Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
- a. Stellen Sie für eine korrekte Überführung bitte sicher, dass sich die Flüssigkeit am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.

Abbildung 1. BD MAX™ TNA Reagenzstreifen (TNA) aus dem BD MAX™ ExK™ TNA-2 Kit.



8.3.3. Einrichten des BD MAX™

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems (Software v4.50A oder höher) die Registerkarte „Work List“ (Arbeitsliste).
- 2) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Test“ die Option VIASURE *Vancomycin resistance* (falls nicht bereits erstellt, siehe 8.3.1).
- 3) Wählen Sie die entsprechende Chargennummer des Kits (an der Außenverpackung des verwendeten Extraktionskits zu finden) aus dem Auswahlmenü aus (optional).
- 4) Geben Sie die Identifikationsnummer des Probenpuffer Röhrchens im Probenröhrchen-Fenster der Arbeitsliste durch Scannen des Barcodes mit dem Scanner oder durch manuelle Eingabe ein.
- 5) Füllen Sie die Felder im Fenster „Specimen“ (Probe)/„Patient ID“ (Patienten-ID) und/oder „Accession“ (Eingang) der Arbeitsliste aus und klicken Sie auf die Schaltfläche „Save“ (Speichern). Führen Sie diese

Schritte für sämtliche Probenpufferröhrchen aus. Stellen Sie sicher, dass die Proben/Patienten-ID und die Probenpufferröhrchen genau zugehörig sind.

- 6) Setzen Sie das/die vorbereitete(n) Probenpufferröhrchen in das/die BD MAX™ Rack(s).
- 7) Laden Sie das/die Rack(s) in das BD MAX™ System (Rack A befindet sich auf der linken Seite des BD MAX™ Systems und Rack B auf der rechten Seite).
- 8) Setzen Sie die erforderliche Anzahl an BD MAX™ PCR Cartridge (s) in das BD MAX™ System ein.
- 9) Schließen Sie die Tür des BD MAX™ Systems.
- 10) Klicken Sie auf „Start Run“ (Durchlauf starten), um den Vorgang zu starten.

8.3.4. BD MAX™ Bericht

- 1) Klicken Sie im Hauptmenü auf die Schaltfläche „Results“ (Ergebnisse).
- 2) Doppelklicken Sie auf Ihren Durchlauf in der Liste oder drücken Sie auf die Schaltfläche „View“ (Ansicht).
- 3) Klicken Sie auf „Print“ (Drucken) und wählen Sie folgende Optionen aus: „Run Details, Test Details and Plot...“ (Durchlaufdetails, Testdetails und Plot...).
- 4) Klicken Sie am Bildschirm „Run Reports“ (Durchlaufberichte) auf die Schaltfläche „Print“ (Drucken) oder „Export“.

9. Ergebnisinterpretation

Nähere Angaben zur Auswertung von Daten erhalten Sie im Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.

Die Datenanalyse durch die BD MAX™ Software erfolgt entsprechend den Herstelleranweisungen. Die BD MAX™ Software gibt die Ct-Werte und Amplifikationskurven für jeden Detektionskanal aller getesteten Proben auf folgende Weise an:

- Ein Ct-Wert von 0 gibt an, dass kein Ct-Wert mit dem spezifizierten Schwellenwert von der Software berechnet wurde (siehe Tabelle 3). Eine Amplifikationskurve einer Probe mit einem Ct-Wert von „0“ muss manuell geprüft werden.
- Ein Ct-Wert von -1 gibt an, dass kein Amplifikationsprozess stattgefunden hat.
- Jeder andere Ct-Wert ist in Übereinstimmung mit der Amplifikationskurve und entsprechend den Leitlinien für die Probenauswertung in Tabelle 6 auszuwerten.

Überprüfen Sie das Signal der internen Kontrolle, um die korrekte Funktionsweise der Amplifikationsmischung sicherzustellen. Überprüfen Sie zusätzlich, dass keine Störung des BD MAX™ Systems gemeldet wurde.

-Die Ergebnisse sind anhand folgender Tabelle zu lesen und auszuwerten:

vanA-Gen (475/520)	vanB-Gen (585/630)	Interne Kontrolle (530/565)	Interpretation
+	+	+/- ¹	vanA und vanB Gene-DNA nachgewiesen¹
+	-	+/- ¹	vanA Gen-DNA nachgewiesen, vanB Gen-DNA nicht nachgewiesen¹
-	+	+/- ¹	vanB Gen-DNA nachgewiesen, vanA Gen-DNA nicht nachgewiesen¹
-	-	+ ²	vanA und vanB Gene-DNA nicht nachgewiesen²
-	-	- ²	Unresolved (UNR) Unklares Testergebnis aufgrund des Vorliegens von Hemmsubstanzen in der PCR-Reaktion oder eines allgemeinen (nicht durch einen Fehlercode angezeigten) Problems bei der Probenverarbeitung und/oder den Amplifikationsschritten².
IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Nicht bestimmtes Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines mit einem Fehlercode verbundenen Gerätefehlers angezeigt.
INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Unvollständiges Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines nicht vollständig durchgeführten Durchlaufs angezeigt.

Tabelle 6. Probenauswertung

+: Stattgefundene Amplifikation

-: Keine Amplifikation

1 Eine Probe gilt als positiv, wenn der erhaltene Ct-Wert unter 40 liegt. Die Anzeige oder Nicht-Anzeige eines Amplifikationssignals durch die interne Kontrolle ist darauf zurückzuführen, dass eine hohe Kopienzahl der Zielform eine präferenzielle Amplifikation der zielspezifischen Nukleinsäuren anstelle der internen Kontrolle hervorruft. In diesen Fällen ist der Nachweis durch die IK nicht erforderlich.

2 Eine Probe gilt als negativ, wenn vom Nachweissystem kein Amplifikationssignal in der Probe erfasst wird, die interne Kontrolle jedoch positiv ist. Eine Hemmung der PCR-Reaktion kann durch Amplifikation der internen Kontrolle ausgeschlossen werden. Im Falle von ungelösten Ergebnissen (UNR) wird bei einem fehlendem Signal durch die interne Kontrolle einer negativen Probe empfohlen, den Assay entsprechend der folgenden Angaben zu wiederholen.

WIEDERHOLUNG DES TESTVEFAHRENS

Im Fall eines weiterhin zweifelhaften Ergebnisses wird empfohlen, die Gebrauchsanweisung und das vom Benutzer verwendete Extraktionsverfahren zu prüfen, die ordnungsgemäße Ausführung aller RT-qPCR-Schritte sowie die Korrektheit der Parameter sicherzustellen und zu kontrollieren, ob die Kurvenform sigmoid und die Intensität der Fluoreszenz angemessen ist.

HINWEIS: Das Probenpufferröhrchen enthält eine ausreichende Menge für einen Wiederholungstest. Für vorbereitete BD MAX™ Probenpufferröhrchen, die bei 2–8 °C oder 25 °C gelagert wurden, muss die Testwiederholung innerhalb von 24 Stunden erfolgen.

HINWEIS: Neue Proben können im selben Durchlauf wie die Wiederholungsproben getestet werden.

Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Krankengeschichte, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einer Gesundheitsfachkraft bewertet werden.

10. Grenzen des Tests

- Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Krankengeschichte, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einer Gesundheitsfachkraft bewertet werden.
- Auch wenn dieser Assay für andere Probenotypen verwendet werden kann, wurde er für perianale und/oder rektale Abstriche, die mit dem ESwab™ Transportmedium gewonnen wurden, und Kolonie-Suspensionen validiert.
- Um einen optimalen Ablauf des Tests zu gewährleisten, sollte sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Röhrchens befinden und nicht im oberen Bereich des Röhrchens oder an der Verschlussfolie haften. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.
- Zeigt das Reaktionsgemisch in stabilisierter Form, das sich in der Regel am Boden des Röhrchens befindet, ein anderes Erscheinungsbild als üblich (keine konische Form, Inhomogenität, kleineres/größeres Volumen und/oder eine andere Farbe als weißlich), hat dies keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Tests.
- Die Testqualität hängt von der Qualität der Probe ab; die Nukleinsäure muss ordnungsgemäß aus perianalen und/oder rektalen Abstrichen und Kolonien extrahiert werden.
- Bei diesem Test handelt es sich um einen qualitativen Test, der weder quantitative Werte liefert noch die Anzahl vorliegender Keime angibt.
- Es kann eine extrem niedrige Kopienzahl der Zielform unterhalb des Nachweisgrenzwerts nachgewiesen werden, wobei sich die Ergebnisse unter Umständen nicht wiederholen lassen.
- Es besteht die Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund einer Kreuzkontamination mit verdächtigen Vancomycin-Resistenz-Proben, die hohe Konzentrationen der Ziel-DNA enthalten, oder aufgrund einer Kontaminierung durch PCR-Produkte früherer Reaktionen.
- Falsch negative Resultate können sich durch mehrere Faktoren und deren Kombinationen ergeben, darunter:
 - unsachgemäße Methoden der Entnahme, des Transports, der Lagerung und/oder der Handhabung von Proben;
 - unsachgemäße Verfahren der Verarbeitung (einschließlich DNA-Extraktion);
 - Abbau der DNA während des Transports/der Lagerung und/oder der Verarbeitung von Proben;
 - Mutationen oder Polymorphismen in Primer- oder Sondenbindungsregionen, die den Nachweis neuer oder unbekannter vanA-Gen und/oder vanB-Gen-Varianten beeinträchtigen können;
 - Eine Belastung mit Vancomycin-resistenten Organismen in der Probe, die unter der Nachweisgrenze des Tests liegt;
 - das Vorliegen von RT-qPCR-Inhibitoren oder anderer Arten von Störsubstanzen.
 - Nichtbefolgen der Gebrauchsanweisung und des Assay-Protokolls.
- Ein negatives IC-Signal schließt das Vorhandensein von vanA- und/oder vanB-Gen-DNA in einer klinischen Probe nicht aus.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht unbedingt an, dass lebensfähige Vancomycin-resistente Organismen vorliegen oder dass diese Organismen infektiös oder der Auslöser klinischer Symptome sind. Ein positives Ergebnis weist jedoch auf die Anwesenheit von Zielsequenzen Vancomycin-resistenter Organismen hin.
- Negative Ergebnisse schließen eine Infektion durch Vancomycin-resistente Organismen nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Behandlung oder andere Entscheidungen hinsichtlich der Patientenversorgung herangezogen werden.

- Bei Vorliegen ungelöster (UNR), nicht bestimmbarer (IND) oder unvollständiger (INC) Ergebnisse bei Verwendung des VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kits ist eine Testwiederholung erforderlich. Ungelöste Ergebnisse können aufgrund von Hemmsubstanzen in der Probe oder einer inkorrekten Rehydratation des lyophilisierten Reaktionsmix-Gefäßes entstehen. Nicht bestimmbare oder unvollständige Ergebnisse sind auf eine Gerätestörung zurückzuführen.

11. Qualitätskontrolle

In jedem Reaktionsgefäß des VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kits ist eine interne Kontrolle (IK) enthalten, mit der die korrekte Funktionsweise des Tests bestätigt wird.

12. Testeigenschaften

12.1. Klinische Empfindlichkeit und Spezifität

Die klinische Leistungsfähigkeit des VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kits wurde anhand von klinischen Proben (Rektalabstrichen) von Patienten mit vermuteter VRE-Infektion untersucht. Die Ergebnisse waren wie folgt:

	Untersuchungsstelle	Probentyp	Arbeitsablauf	Zielsequenz
1	Clinical Microbiology, Centre for Infectious Diseases and Microbiology Laboratory services, NSW Health Pathology, Westmead Hospital (Sydney, Australien)	Rektalabstrich	BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System	VanA-Gen
				VanB-Gen
				VanA- und vanB-Gen

Tabelle 7. Ort, Probentyp, Arbeitsablauf und Zielsequenzen.

Richtig-positive und -negative Werte, falsch-positive und -negative Werte sowie Sensitivität und Spezifität für das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit wurden in Relation zu den verschiedenen Vergleichstests bestimmt wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Untersuchungsstelle	Vergleichstest	Zielsequenz	TP	TN	FP	FN	Sensitivität	Spezifität
1	Institutsinterne PCR VRE (Westmead – WMD)	VanA	65	151	0	0	100 % (93 % – 100 %)	100 % (96 % – 100 %)
		VanB	36	179	1	0	100 % (87 % – 100 %)	100 % (96 % – 100 %)
		VanA + VanB	17	199	0	0	100 % (97 % – 100 %)	100 % (97 % – 100 %)

Tabelle 8. Richtig-positive (TP) und -negative (TN) Werte, falsch-positive (FP) und -negative (FN) Werte sowie Sensitivität und Spezifität für das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Die Ergebnisse zeigen eine hohe Übereinstimmung beim Nachweis des *vanA*- und des *vanB*-Gens mit dem VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

Außerdem wurde die Fehlerrate der Probenverarbeitungskontrolle berechnet. Zu Beginn betrug die Anzahl unklarer Reaktionen (UNR) 3 (anfängliche UNR-Rate: 1,39 %). Nach Wiederholung betrug die UNR-Anzahl 0 (endgültige UNR-Rate: 0,00 %).

Um die Kompatibilität des VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, das für BD MAX™ entwickelt wurde, mit Proben mit verschiedenen anderen Matrices zu beurteilen, wurde die Erkennung von Vancomycin-resistenten Enterokokken-Koloniesuspensionen verifiziert.

Es wurden verschiedene Koloniesuspensionen hergestellt, indem zwei Kolonien einer bekannten Kultur zu 500 µl nukleasefreiem Wasser hinzugegeben wurden. Die für diese Beurteilung waren CECT 5253 *Enterococcus faecium vanA*, CECT 8120 *Enterococcus faecalis vanB*, NCTC 12201 *Enterococcus faecalis vanA* und NCTC 13632 *Enterococcus faecalis vanA*. Ein Volumen von 10 µl jeder Koloniesuspension wurde direkt in das Sample Buffer Tube gegeben. Bei der Durchführung dieser Beurteilung verwendeten Flussdiagramm handelte es sich um: BD MAX™ ExK™ TNA-2 + BD MAX™ System.

Den erhaltenen Ergebnissen zufolge waren Koloniesuspensionen von CECT 5253, NCTC 12220 und NCTC 13632 positiv für das *vanA*-Gen und Koloniesuspensionen von CECT 8120 positiv für das *vanB*-Gen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit *vanA*- und *vanB*-Gene in Koloniesuspensionen korrekt erkennt.

12.2. Analytische Empfindlichkeit

Das VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit hat eine Nachweisgrenze von ≥ 4 koloniebildenden Einheiten pro Reaktion (CFU/rxn) für *vanA* und ≥ 10 CFU/rxn für *vanB* (Abbildungen 2 und 3) mit einer Positivrate von ≥ 95 % bei perianalen und rektalen Abstrichen.

Abbildung 2. Verdünnungsreihe eines *vanA*-Gen-Musters ($3,62 \cdot 10^4$ – $3,62$ CFU/rxn), durchgeführt mit dem BD MAX™ System (Kanal 475/520 (FAM)).

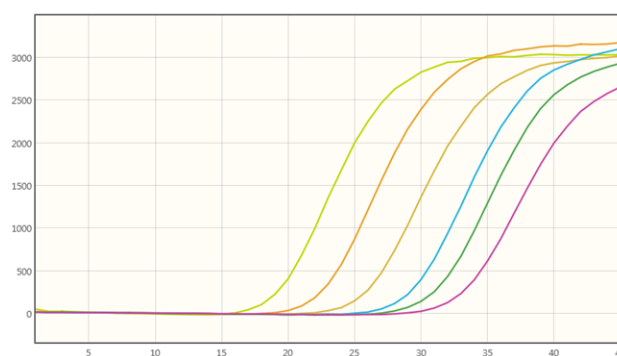
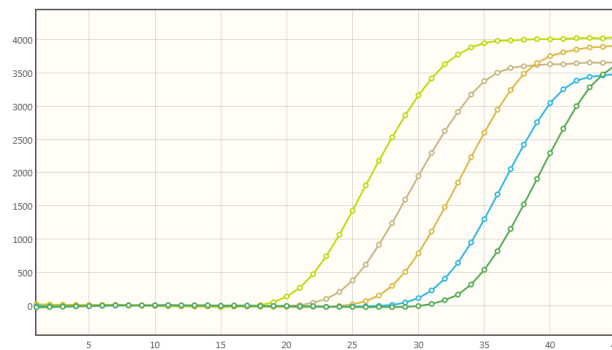


Abbildung 3. Verdünnungsreihe eines *vanB*-Gen-Musters ($5,65 \cdot 10^4$ – $9,98$ CFU /rxn), durchgeführt mit dem BD MAX™ System (Kanal 585/630 (ROX)).



12.3. Analytische Spezifität

Die Spezifität des Vancomycin-Resistenz-Assays wurde durch Testen eines Panels mit unterschiedlichen antibiotikaresistenten Keimen und unterschiedlichen Mikroorganismen, welche die häufigsten enterischen Krankheitserreger bzw. Flora im Darm darstellen, bestätigt. Mit Ausnahme der anvisierten Erreger des jeweiligen Tests wurde zwischen keinem der nachfolgenden untersuchten Mikroorganismen eine Kreuzreaktivität festgestellt.

Test auf Kreuzreaktionen					
Adenovirus Serotypen 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	TEM-1 (nicht-ESBL), SHV-1 (nicht-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) und KPC-2 produzierendes <i>Klebsiella pneumoniae</i> -Isolat	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> vom VanC-Typ	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> vom VanC-Typ	-	Norovirus GI und GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrovirus Genotyp I-VIII	-	<i>Enterococcus faecalis</i> vom VanA-Typ	- / +	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> vom VanB-Typ	- / +	Rotavirus A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> vom VanA-Typ	+ / -	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> vom VanB-Typ	- / +	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> vom VanB- und VanC-Typ	- / +	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> vom VanC-Typ	-	<i>Salmonella paratyphi B</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> vom VanC1-Typ	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
VIM-1 produzierendes <i>Citrobacter braakii</i> -Isolat	-	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	-	Sapovirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
KPC-3 und VIM-4 produzierendes <i>Citrobacter freundii</i> -Komplex-Isolat	-	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>	-	OXA-48 produzierendes <i>Serratia marcescens</i> -Isolat	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	OXA-244 produzierendes <i>Escherichia coli</i> -Isolat	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	TEM-1 (nicht-ESBL) und IMP-1 produzierendes <i>Escherichia coli</i> -Isolat	-	<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-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>mecC</i>)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) Stamm N315	-

<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) Stamm (<i>oxa^R</i> , PVL-positiv, <i>spa</i> -Typ t310)	-
SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) und OXA-48 produzierendes <i>Enterobacter cloacae</i> -Isolat	-	<i>Helicobacter pylori</i> Clarithromycin-resistent (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
TEM-1 (nicht-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) und NDM-1 produzierendes <i>Enterobacter cloacae</i> -Isolat	-	<i>Helicobacter pylori</i> Clarithromycin-resistent (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
NDM-7 produzierendes <i>Enterobacter cloacae</i> -Komplex-Isolat	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Enterococcus avium</i> vom <i>VanA</i> -Typ	+ / -	SHV-1 (nicht-ESBL), KPC-3 und OXA-48 produzierendes <i>Klebsiella pneumoniae</i> -Isolat	-		

Tabelle 9. Bei dieser Untersuchung verwendete pathogene Referenz-Mikroorganismen.

12.4. Analytische Reaktivität











Die Reaktivität des VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kits gegenüber dem *vanA*-Gen wurde anhand von DNA untersucht, die aus folgenden Erregern extrahiert wurde: *Enterococcus avium* vom *vanA*-Typ, *Enterococcus faecalis* vom *vanA*-Typ (Stämme NCTC 13632, NCTC 12201) und *Enterococcus faecium* vom *vanA*-Typ (Stämme LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202), wobei die Ergebnisse positiv ausfielen.

Die Reaktivität des VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kits gegenüber dem *vanB*-Gen anhand von DNA untersucht, die aus folgenden Erregern extrahiert wurde: *Enterococcus faecalis* vom *vanB*-Typ (Stämme ATCC 51299, CECT 8120), *Enterococcus faecium* vom *vanB*-Typ (Stamm IOWA 2) und *Enterococcus gallinarum* vom *vanB*- und *vanC*-Typ (Stamm ENT20120142), wobei die Ergebnisse positiv ausfielen.

Bibliography/ Literaturverzeichnis

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

Symbols for IVD components and reagents/ Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien

 In vitro diagnostic device In-vitro-Diagnostikum	 Keep dry Trocken aufbewahren	 Use by Verfallsdatum	 Manufacturer Hersteller	 Batch code Chargennummer (Lot)
 Consult instructions for use Siehe Gebrauchsanweisung	 Temperature limitation Temperaturbegrenzung	 Contains sufficient for <n> test Ausreichend für <n> Test(s)	 Unique Device Identification Eindeutige Geräteidentifikation	 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 / Änderungshistorie		
Version No. / Version Nr.	Changes / Änderungen	Date / Datum
00	Unification of all instructions for use associated with the different catalogue references in a single format / Vereinheitlichung aller Gebrauchsanweisungen zu den verschiedenen Katalogreferenzen in einem einzigen Format.	21/06/2021

Table A 2. Control change table / Tabelle Änderungshistorie.

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

