

Vitassay qPCR

Vancomycin Resistance

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a vancomicina (ERV) en muestras clínicas

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of *vanA* and *vanB* genes associated with vancomycin-resistant enterococci (VRE) in clinical samples



Uso previsto

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance permite la detección y diferenciación de los genes *vanA* y *vanB* asociados con enterococos resistentes a vancomicina (ERV) mediante PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar la identificación organismos resistentes a la vancomicina.

Referencias

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance 4x8 -well strip, low profile 7041043

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance 4x8 -well strip, high profile 7042043

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S043/ 7042S043	Vancomycin Resistance strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C043	Vancomycin Resistance Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Los enterococos como microbiota oportunista son uno de los microorganismos más importantes que se encuentran en el medio ambiente. En algunas condiciones, pueden convertirse en patógenos, causando infección del tracto urinario (ITU), infecciones de la piel, infecciones respiratorias, endocarditis y sepsis. Este género de bacterias debido a varios genes diferentes de resistencia a antibióticos intrínsecamente ha mostrado resistencia contra algunos antibióticos, incluidos aminoglucósidos, macrólidos, lactamas y penicilinas semisintéticas. La resistencia a la vancomicina es un proceso complejo y necesita la presencia de múltiples genes. Se investigaron siete grupos de genes en enterococos resistentes a la vancomicina, que incluyen: (*vanA*, *vanB*, *vanc1*, *vanc2*, *vanD*, *vanE* y *vanG*). Mecanismo de resistencia común a glicopéptidos tales como vancomicina relacionada con extremos dipeptídicos (D-Ala-D-Lac) codificados por los grupos *vanA* y *vanB*, que provocan una baja afinidad por la vancomicina. Los elementos genéticos móviles (transposones y plásmidos), anteriormente se han notado como genes principales de resistencia que se transfieren entre *Enterococci* spp. Los genes (*vanA* y *vanB*) que codifican dipeptide like termini son responsables de la resistencia a vancomicina de alto o moderado nivel.

La vancomicina actúa uniéndose al resto terminal D-Ala-D-Ala del peptidoglicano bacteriano interfiriendo así con el crecimiento normal de la pared celular. Como consecuencia de la incorporación de D-Ala-D-Lac por enterococos resistentes a vancomicina (VRE) en la capa de peptidoglicano en lugar de D-Ala-D-Ala, la afinidad de la vancomicina por el peptidoglicano disminuye más de 1.000 veces, lo que resulta en resistencia clínica a antibióticos.

El método de detección aplicado al principio se basó en el cultivo, lo que lleva mucho tiempo y generalmente toma de uno a cinco días para completarse. Para acortar el tiempo de detección y mejorar la sensibilidad, los ensayos de PCR en tiempo real han demostrado ser una herramienta para la detección de la resistencia a la vancomicina

Principio del test

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de los genes *vanA* y *vanB*. Tras la extracción de DNA, la presencia los genes *vanA* y *vanB* se detectan mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance se trata de un test *listo para usar* que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana es detectada en el canal FAM (gen *vanA*), ROX (gen *vanB*) y en el canal HEX, VIC o JOE (control interno (CI)).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de DNA

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando Maxwell® 16 instrument (Promega).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Vancomycin Resistance Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (gen *vanA*), ROX (gen *vanB*) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast y Stratagene Mx3029P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales del gen *vanA* (FAM), gen *vanB* (ROX) y Control Interno (HEX, JOE o VIC).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM y ROX.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

Con la ayuda de la siguiente tabla, analizar los resultados:

Gen <i>vanA</i> (FAM)	Gen <i>vanB</i> (ROX)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	gen <i>vanA</i> y gen <i>vanB</i> Positivos
-	-	+	-	+	gen <i>vanA</i> y gen <i>vanB</i> Negativos
+	-	+/-	-	+	gen <i>vanA</i> Positivo y gen <i>vanB</i> Negativo
-	+	+/-	-	+	gen <i>vanA</i> Negativo y gen <i>vanB</i> Positivo
-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas para todos los virus no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

Se analizaron un total de 23 aislados de enterococos de pacientes sintomáticos mediante PCR en tiempo real usando Vitassay qPCR Vancomycin Resistance. 21 de ellos fueron positivos para el gen *vanA* y 1 positivo para el gen *vanB*. Los resultados se confirmaron con los obtenidos con la técnica de diagnóstico de rutina.

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance se evaluó también con 3 paneles EQA. Estos paneles constan de 20 muestras disueltas en medio de transporte. Estas muestras incluyen 6 aislados positivos para el gen *vanA* los cuales contienen *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. avium* y 7 muestras positivas para el gen *vanB* las cuales contienen aislados de *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. gallinarum*. Además, las especies *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, las cuales no albergan los genes *vanA* y *vanB*, se confirmaron como negativos. Los resultados obtenidos se compararon con los informes finales de los programas

Estos resultados indican la alta sensibilidad y especificidad para detectar los genes *vanA* y *vanB* utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Vancomycin Resistance.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de los diferentes genes (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA viral por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de resistencia a vancomicina fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada

<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315 resistente a la meticilina	Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) y KPC-2	<i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7
<i>Staphylococcus aureus</i> ST398 resistente a la meticilina	<i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244	<i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1
<i>Staphylococcus aureus</i> mecC resistente a la meticilina	<i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1	Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4
Aislado cMRSA (oxa ^R , PVL-positive, spa:t 310)	<i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rDNA A2146G)
Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48	<i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rDNA A2147G)
Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48	<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC	

Reactividad analítica

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance ha sido evaluado para el gen *vanA* con las siguientes cepas: *Enterococcus faecium* LMG16165, *Enterococcus faecium* IOWA 1, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus avium*, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance ha sido evaluado para el gen *vanB* con las siguientes cepas: *Enterococcus faecalis* (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz, *Enterococcus faecium* IOWA 2 y *Enterococcus gallinarum* ENT20120142, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance es compatible con los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de resistencia a la vancomicina. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras fecales humanas y especímenes aislados de enterococos de origen humano. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas humanas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con los diferentes virus, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil	Termocicladores con bloque de alto perfil
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System*
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
	Eppendorf
	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Intended use

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance allows the detection and differentiation of vanA and vanB genes associated with vancomycin-resistant enterococci (VRE) by real-time PCR in clinical samples. The product is intended for use in the identification of vancomycin-resistant organisms alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance 4x8 -well strip, low profile	7041043
Vitassay qPCR Vancomycin Resistance 4x8-well strip, high profile	7042043

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S043/ 7042S043	Vancomycin Resistance strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C043	Vancomycin Resistance Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4x8 cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 ml tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µl, 20-200 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Enterococci as an opportunistic microbiota are one of the most important microorganisms found in the environment. In some condition they can become pathogen, causing urinary tract infection (UTI), skin infections, respiratory infections, endocarditis and sepsis. This genus of bacteria due to various different of antibiotic resistance genes, intrinsically has shown resistance against some antibiotics including aminoglycosides, macrolids, lactams and semisynthetic penicillin's. The resistance to vancomycin is complex process and needs to presence of multiple genes. Seven genes clusters were investigated in vancomycin resistance *enterococci* including: (*vanA*, *vanB*, *vanc1*, *vanc2*, *vanD*, *vanE*, and *vanG*). Common resistance mechanism to glycopeptides such as vancomycin concerned with, dipeptide like termini (D-Ala- D-Lac) encoded by *vanA* and *vanB* clusters which, prompt to low affinity for vancomycin. Mobile genetic elements (transposons and plasmids), previously have been noticed as main resistance genes transferring among *Enterococci* spp. Genes (*vanA* and *vanB*) encoding dipeptide like termini are responsible for high or moderate level vancomycin resistance.

Vancomycin acts by binding to the terminal D-Ala-D-Ala moiety of the bacterial peptidoglycan thus interfering with normal cell wall growth. As a consequence of the incorporation of D-Ala- D-Lac by vancomycin-resistant enterococci (VRE) into the peptidoglycan layer in place of D-Ala-D-Ala, the affinity of vancomycin for the peptidoglycan diminishes over 1,000-fold, resulting in clinical antibiotic resistance.

The screening method applied at the beginning was culture-based, which is time-consuming and takes generally from one to five days to complete. To shorten the detection time and improve the sensitivity, Real Time PCR assays have been shown to be a tool for the detection of Vancomycin resistance.

Principle of the test

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance test is based on the real-time amplification of conserved fragments of the *vanA* and *vanB* genes. After DNA isolation, the presence of of the *vanA* and *vanB* genes is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance test is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of *vanA* gene is detected through the FAM channel, *vanB* gene in ROX channel and internal control is detected through the HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used).

Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, processing and DNA extraction

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando Maxwell® 16 instrument (Promega).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Vancomycin Resistance Positive Control (red tube) in the 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (*vanA* gene), ROX (*vanB* gene) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3029P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached II)

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for *vanA* gene (FAM), *vanB* gene (ROX) and Internal Control (HEX, JOE o VIC), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM, and ROX which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The result interpretation is summarized in the following table:

<i>vanA</i> gene (FAM)	<i>vanB</i> gene (ROX)	Internal Control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	<i>vanA</i> gene and <i>vanB</i> gene Positives
-	-	+	-	+	<i>vanA</i> gene and <i>vanB</i> gene Negatives
+	-	+/-	-	+	<i>vanA</i> gene Positive and <i>vanB</i> gene Negative
-	+	+/-	-	+	<i>vanA</i> gene Negative and <i>vanB</i> gene Positive
-	-	-	-	-	Experiment fail
+	+	+	+	+	Experiment fail

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

If the negative samples do not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

A total of 23 enterococcal isolates from symptomatic patients were analyzed by Real Time PCR using Vitassay qPCR Vancomycin Resistance. 21 of them were positive for *vanA* gene and 1 positive for *vanB* gene. The results were confirmed with those obtained with the routine diagnostic technique.

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance was also evaluated with 3 EQA panels. These panels consist of 20 samples dissolved in transport medium. These samples include 6 positive isolates for *vanA* gene which contain *E. faecium*, *E. faecalis* and *E. avium* and 7 positive samples for the *vanB* gene which contain isolates of *E. faecium*, *E. faecalis* and *E. gallinarum*. In addition, the *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* species, that not harboured *vanA* and *vanB* genes, were confirmed as negative. The results obtained were compared with the final reports of the programs.

These results indicate the high sensitivity and specificity to detect *vanA* gene and *vanB* gene using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR Vancomycin Resistance.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of *vanA* gene and *vanB* gene templates ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 viral DNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for vancomycin resistance was tested within the panel of different antimicrobial resistant organism, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Cross-reactivity testing		
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) N315	<i>Klebsiella pneumoniae</i> isolate with TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL), and KPC-2 genes	Enterobacter cloacae-complex with a NDM-7 gene
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ST398	<i>Escherichia coli</i> with OXA-244 gene	<i>Citrobacter braakii</i> with VIM-1 gene
mecC Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> with TEM-1 (non-ESBL) and IMP-1 genes	<i>Citrobacter freundii</i> -complex isolate with KPC-3 and VIM-4 genes
cMRSA isolate (oxa ^R , PVL-positive, spa:t 310)	<i>Enterobacter cloacae</i> with SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) and OXA-48 genes	<i>H. pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rDNA A2146G)
<i>Serratia marcescens</i> isolate with OXA-48 gene	<i>Enterobacter cloacae</i> with TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) and NDM-1 genes	<i>H. pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rDNA A2147G)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> isolate with SHV-1 (non-ESBL), KPC-3, and OXA-48 genes	<i>VanC type- Enterococcus gallinarum</i> (Bridge and Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz and Schleifer 1984 VP	

Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Vancomycin Resistance for *vanA* was evaluated against strains: *Enterococcus faecium* LMG16165, *Enterococcus faecium* IOWA 1, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus avium*, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Vancomycin Resistance for *vanB* was evaluated against strains: *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz, *Enterococcus faecium* IOWA 2 and *Enterococcus gallinarum* ENT20120142, showing positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Vancomycin Resistance has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology)

- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)¹
- SmartCycler® (Cepheid)¹

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of Vancomycin Resistance. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with human faecal samples and specimens enterococcal isolates from human source. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical specimens must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different virus, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* See Attached III to configure exposure settings.

Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Bibliography/Bibliografía

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. 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.

Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.










Mx3000P™ and Mx3029™ are registered trademarks of Agilent Technologies.

Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.

Rotor-Gene® Q is a registered trademark of Qiagen.

SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
DIL	Diluyente de muestra Buffer (sample diluent)		Número de referencia Catalogue number



VA Vitassay

Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com