

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

Vancomycin resistance

Handbook for the following references/
Manuel pour les références suivantes:

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

BD REF 444202

to be used with the BD MAX™ System
à utiliser avec le système BD MAX™



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 PCR inhibition. *vanA* genes are amplified and detected in channel 475/520, *vanB* genes in channel 585/630 and the internal control (IC) in channel 530/565.

4. Reagents provided

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1:

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-VAN112	<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	Transparent Blue foil	2 pouches of 12 tubes
VS-RB08	Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	Transparent Rust foil	1 pouch of 24 tubes

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit with Ref. VS-VAN124.

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: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, they can be used for up to 28 days.

7. Precautions for users

- For professional *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.
- 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. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges.
- 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 or smoke in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious 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, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

The VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit has been validated 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 validated on colony suspension.

Collection, storage and transport 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 must be transported following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 24 hours), we recommend shipping at $\leq -20^{\circ}\text{C}$. The samples can be stored at 25°C for up to 24 hours, 2 to 8°C for up to 144 hours (6 days) or frozen at -20°C for up to 196 hours (8 days). Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

8.2. SAMPLE PREPARATION AND DNA EXTRACTION

Perform the sample preparation according to the recommendations in the instructions for use of the 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 VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection test, 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 "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) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 2).
 - 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 2 (green) and snap 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 2. PCR settings.

- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 3), as well

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

Table 3. Spectral cross-talk parameters.

- 10) In "Test Steps" tab, enter the PCR protocol (Table 4).

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 4. PCR protocol.

- 11) Click the "Save Test" button.

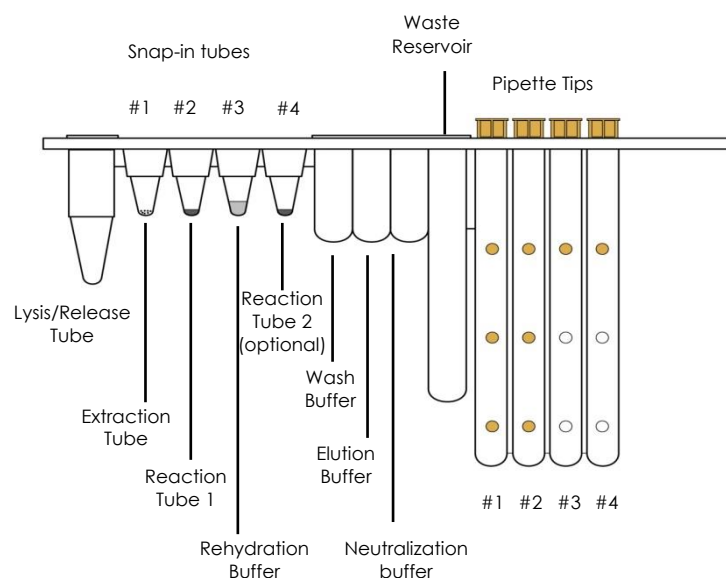
8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 1) For each specimen to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK TNA-2 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.



- 2) Remove the required number of BD MAX™ ExK TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close the pouch with the zip seal.
- 3) Determine and separate the appropriate number of VIASURE *Vancomycin resistance* reaction tubes (blue 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.
 - 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 (rust 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.

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 2). 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 5.

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
-	-	+	vanA and vanB Negative
+	+	+/-	vanA and vanB Positive
+	-	+/-	vanA Positive, vanB Negative
-	+	+/-	vanB Positive, vanA Negative
-	-	-	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.
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 5. Sample interpretation

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40. The internal control may or may not show an amplification signal because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids instead of the internal control. In these cases, the detection of the IC is not necessary.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. 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

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.
- 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. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- 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.
- 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 216 samples (fresh rectal samples collected using ESwab™) from patients (infants and adults) with suspected VRE infection. These results were compared with those obtained with in-house real-time PCR assay and enrichment culture. The in-house real-time PCR adapted to the BD MAX™ System detects *E. faecalis*, *E. faecium* and *vanA* and *vanB* genes.

		In-house real-time PCR assay		
		+	-	Total
VIASURE <i>Vancomycin resistance</i> Real Time PCR Detection kit	+	82*	0	82
	-	0	134	134
	Total	82	134	216

Table 6: Comparative results for *vanA* gene.

*17/82 patients coinfecting with *vanA*- and *vanB*- types *Enterococcus faecium*. VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit is capable of correctly simultaneously detecting *vanA* and *vanB* genes in clinical samples.



VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit	In-house real-time PCR assay		
		+	-
+	53*	1#	54
-	0	162	162
Total	53	163	216

Table 7: Comparative results for vanB gene.

* 17/53 patients coinfecting with vanA- and vanB- types *Enterococcus faecium*. VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit is capable of correctly simultaneously detecting vanA and vanB genes in clinical samples.

This sample was negative for vancomycin resistance using Whole Genome Sequencing (WGS) analysis.

Sensitivity (SE) and specificity (SP) for VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR detection kit compared with In-house Real Time PCR assay are shown in next table:

Vancomycin resistance gene	SE (%)	SP (%)
vanA	>99.9	>99.9
vanB	>99.9	99.4

Table 8. Sensitivity (SE) and specificity (SP) values for VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR detection kit.

The results show a high sensitivity and specificity to detect vanA and vanB genes using VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit.

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 CFU/rxn for vanB with a positive rate of $\geq 95\%$.



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).

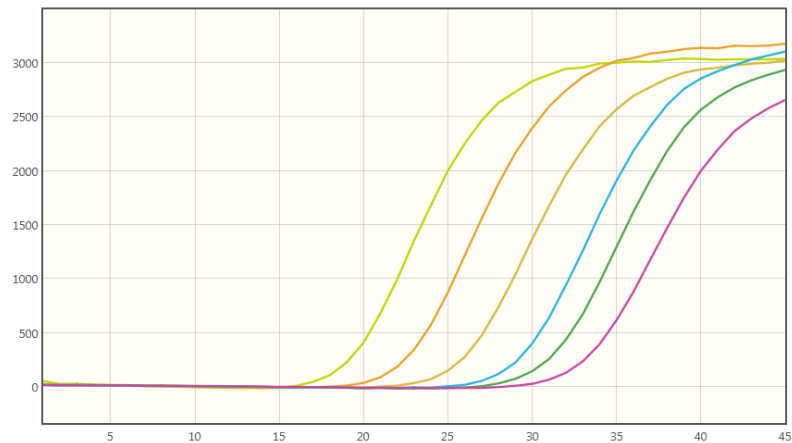
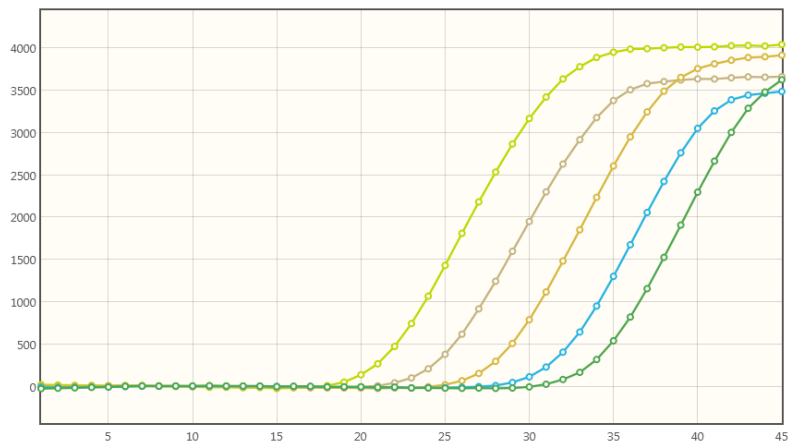


Figure 3. Dilution series of *vanB* gene (5.65×10^4 - 9.98 CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



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 pneumoniae</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 pneumoniae</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 *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 *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.



FRANÇAIS

1. Utilisation prévue

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit est conçu spécifiquement pour l'identification et la différenciation des gènes *vanA* et *vanB* pouvant être associés aux entérocoques résistant à la vancomycine (VRE) directement d'écouillons périanaux et/ou rectaux et de colonies. Ce test est destiné à faciliter l'identification des organismes résistant à la vancomycine en combinaison avec les signes et symptômes cliniques du patient et les facteurs de risque épidémiologiques. Le test utilise le système BD MAX™ pour l'extraction automatisée de l'ADN, puis la méthode PCR en temps réel employant les réactifs fournis combinés avec des réactifs universels et consommables pour le système BD MAX™. L'ADN d'écouillons périanaux et/ou rectaux et de colonies est détecté au moyen de sondes avec colorants/marqueurs fluorescents spécifiques pour les gènes *vanA* et *vanB*.

2. Résumé et explication

Les entérocoques sont des organismes commensaux communs que l'on retrouve dans le tractus gastro-intestinal et les organes génitaux féminins. Récemment, ils ont été reconnus comme pathogènes opportunistes entraînant des infections nosocomiales telles que infections des voies urinaires, infections cutanées, infections respiratoires, endocardites et septicémies chez les hôtes dont les défenses sont compromises.

La vancomycine est un antibiotique glycopeptide qui inhibe la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries. Elle est utilisée pour traiter les infections bactériennes à Gram positif graves. Les entérocoques résistant à la vancomycine (VRE), décrits pour la première fois en 1986 en Angleterre et en France, sont maintenant isolés dans les hôpitaux du monde entier.

La résistance à la vancomycine est un processus complexe et nécessite la présence de différents groupes de gènes. Ils peuvent être divisés en deux types principaux selon les précurseurs pentapeptidiques produits par les gènes de résistance à la vancomycine : le précurseur avec une terminaison en D-Alanine-D-Sérine (types VanC, VanE, VanG, VanL et VanN) ou en D-Alanine-D-Lactate (types VanA, VanB, VanD et VanM). Ces précurseurs pentapeptidiques ont montré de faibles affinités pour les glycopeptides, conférant ainsi des résistances à la vancomycine chez les entérocoques.

Le premier type de résistance à la vancomycine chez les entérocoques est une résistance intrinsèque (c.-à-d. associée au gène *vanC*). Les isolats d'*Enterococcus gallinarum* et d'*E. casseliflavus*/*E. flavescens* présentent une résistance inhérente faible à la vancomycine. Le deuxième type est une résistance acquise (à savoir gène *vanA* ou *vanB*). Dans ce cas, les entérocoques peuvent devenir résistants par acquisition d'éléments génétiques mobiles (transposons et plasmides) d'une autre espèce d'*Enterococcus* ou organisme. Cette résistance est généralement observée chez les espèces *E. faecium* et *E. faecalis*, mais elle est également identifiée chez *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* et plusieurs autres espèces d'entérocoques. Les gènes *vanA* et *vanB* sont responsables de la résistance de niveau élevé ou modéré à la vancomycine.

La transmission d'entérocoques résistant à la vancomycine (VRE) se fait par contact direct avec les fluides corporels de patients colonisés ou infectés (sang, drainage de plaies, urine, selles, expectorations et autres) ou par contact



indirect via les mains du personnel soignant ou l'équipement de soin d'un patient contaminé ou des surfaces environnementales contaminées.

La méthode de dépistage initialement appliquée était basée sur une mise en culture, un procédé long requérant généralement un à cinq jours. Les tests PCR en temps réel se sont avérés un outil de détection de gènes cliniquement pertinents en association avec la résistance à la vancomycine.

3. Procédé

Le VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit est conçu pour l'identification et la différenciation de l'ADN des entérocoques résistant à la vancomycine et d'autres organismes porteurs des gènes de résistance à la vancomycine codés *vanA* et *vanB*. Après l'isolement de l'ADN, l'identification de la résistance à la vancomycine se fait par l'amplification d'une région conservée des gènes *vanA* et *vanB*, au moyen d'amorces spécifiques et d'une sonde marquée d'une molécule fluorescente.

Le VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit est basé sur l'activité d'exonucléase de 5' de l'ADN polymérase. Pendant l'amplification de l'ADN, cette enzyme clive la sonde reliée à la séquence de l'ADN complémentaire, séparant le quencher (colorant désactivateur) du rapporteur. Cette réaction entraîne une augmentation du signal de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité de la matrice cible. Cette fluorescence est mesurée sur le système BD MAX™.

Le VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contient dans chaque tube tous les composants nécessaires pour effectuer le test PCR en temps réel (amorces/sondes spécifiques, dNTPS, tampon, polymérase) sous un format stabilisé, ainsi qu'un contrôle interne pour écarter l'inhibition de l'activité polymérase. Le gène *vanA* est amplifié et détecté dans le canal 475/520, le gène *vanB* dans le canal 585/630 et le contrôle interne (CI) dans le canal 530/565.

4. Réactifs fournis

Le VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contient les matériaux et réactifs décrits dans le tableau 1 ci-après.

Référence	Réactif/Matériau	Description	Couleur	Quantité
VS-VAN112	<i>Vancomycin resistance</i> reaction tube (Tube réactionnel <i>Vancomycin resistance</i>)	Assortiment comprenant des enzymes, des amorces, des sondes, un tampon, des dNTPs, des stabilisateurs et un contrôle interne dans un format stabilisé	Opercule bleu transparent	2 poches de 12 tubes
VS-RB08	Rehydration Buffer tube (Tube de solution tampon de réhydratation)	Solution pour reconstituer le produit stabilisé	Opercule bleu transparent	1 poche de 24 tubes

Tableau 1. Réactifs et matériaux fournis dans le VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, réf. VS-VAN124.

5. Réactifs et équipement à fournir par l'utilisateur



La liste suivante présente les matériaux et l'équipement qui sont nécessaires, mais qui ne sont pas inclus dans le VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit.

- Instrument PCR en temps réel : système BD MAX™.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (Ref :442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (exactitude entre 2 et 1000 µl).
- Eau exempte de nucléase.
- Embouts à filtre.
- Gants jetables sans poudre.

6. Conditions de transport et de stockage

- Les kits peuvent être expédiés et stockés à une température de 2 à 40 °C jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette.
- Après ouverture, la durée d'utilisation des poches en aluminium contenant les tubes réactionnels est de 28 jours maximum.

7. Précautions pour les utilisateurs

- Destiné à un usage professionnel dans des procédures diagnostiques *in vitro*.
- N'utilisez pas les réactifs et/ou matériaux après la date de péremption.
- N'utilisez pas le kit si l'étiquette qui scelle la boîte extérieure est déchirée.
- N'utilisez pas les réactifs dont la poche de protection est ouverte ou endommagée à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs dont les poches de protection sont ouvertes ou fissurées à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs sans absorbeur d'humidité ou si celui-ci est cassé à l'intérieur des poches de réactifs.
- Ne retirez pas l'absorbeur d'humidité des poches de réactifs.
- Refermez rapidement les poches de réactifs avec la fermeture à glissière étanche après chaque utilisation. Expulsez tout excès d'air des poches avant de les sceller.
- N'utilisez pas les réactifs dont l'opercule en aluminium est cassé ou endommagé.
- Ne mélangez pas des réactifs provenant de poches, de kits et/ou de lots différents.
- Protégez les réactifs contre l'humidité.
- Conservez les composants à l'abri de la lumière.
- Si d'autres tests PCR sont menés dans la même zone commune du laboratoire, assurez-vous que le VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit, tout réactif supplémentaire requis pour le test et le système BD MAX™ ne sont pas contaminés. Changez de gants avant toute manipulation de réactifs et de cartouches.
- Élaborez un flux de travail unidirectionnel. Il doit commencer dans la zone d'extraction, puis se déplacer vers la zone d'amplification et de détection. Ne ramenez pas les échantillons, l'équipement et les réactifs dans la zone où s'est déroulée l'étape précédente.



- Suivez les bonnes pratiques de laboratoire. Portez des vêtements de protection, utilisez des gants, lunettes de protection et masque jetables. Abstenez-vous de manger, boire ou fumer dans la zone de travail. Lavez-vous les mains une fois que vous avez terminé le test.
- Traitez les échantillons, ainsi que tout réactif et matériau ayant été exposé à ces derniers, comme des agents potentiellement infectieux, et manipulez-les conformément aux réglementations nationales applicables en matière de sécurité. Prenez les précautions nécessaires pendant la collecte, le stockage, le traitement et l'élimination des échantillons.
- Une décontamination régulière de l'équipement fréquemment utilisé est recommandée, en particulier des micropipettes et des surfaces de travail.
- Consultez le manuel de l'utilisation du système BD MAX™ pour en savoir plus sur les avertissements, précautions et procédures à respecter.

8. Protocole de test

8.1. PRÉLÈVEMENT, STOCKAGE ET TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

Le VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit a été validé sur des écouvillons périanaux et/ou rectaux immédiatement placés dans le milieu de transport ESwab™ (système de prélèvement et de transport en milieu liquide Amies) (Copan, Italie). Le VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit a également été validé sur des colonies mises en suspension.

Les échantillons prélevés, stockés et transportés doivent être conservés selon les conditions validées par l'utilisateur. D'une manière générale, les écouvillons périanaux et/ou rectaux doivent être prélevés et étiquetés de manière appropriée dans un milieu de transport propre ESwab™ et traités le plus tôt possible afin de garantir la qualité du test. Les échantillons doivent être transportés conformément aux réglementations locales et nationales relatives au transport de matières porteuses d'agents pathogènes. Pour un transport de longue durée (plus de 24 heures), nous recommandons une expédition à ≤ -20 °C. Les échantillons peuvent être conservés à 25 °C jusqu'à 24 heures, de 2 à 8 °C jusqu'à 144 heures (6 jours) ou congelés à -20 °C jusqu'à 196 heures (8 jours). Évitez les cycles de congélation-décongélation répétés afin de ne pas dégrader l'échantillon et les acides nucléiques.

8.2. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON ET EXTRACTION DE L'ADN

Préparez l'échantillon selon les recommandations figurant dans le mode d'emploi du kit d'extraction utilisé, BD MAX™ ExK™ TNA-2. Veuillez noter qu'un prétraitement peut s'avérer nécessaire pour certains échantillons. L'utilisateur devra élaborer et valider des procédures de préparation de l'extraction spécifiques à l'application.

1. Copan ESwab™ : pipettez 200 μ l de l'échantillon ESwab™ dans un tube de tampon d'échantillon BD MAX™ TNA-2 et fermez le tube avec un bouchon à septum. Mélangez l'échantillon soigneusement avant de l'agiter à haute vitesse au vortex pendant 1 minute. Poursuivez avec le système BD MAX™.
2. Colonies : prenez deux colonies du milieu de culture et mettez-les en suspension dans 500 μ l d'eau exempte de nucléase. Mélangez soigneusement avant d'agiter au vortex. Ajoutez 10 μ l de la suspension dans un tube de



tampon d'échantillon BD MAX™ TNA-2 et fermez le tube avec un bouchon à septum. Mélangez l'échantillon soigneusement avant de l'agiter à haute vitesse au vortex pendant 1 minute. Poursuivez avec le système BD MAX™.

8.3. PROTOCOLE PCR

Remarque : veuillez consulter le mode d'emploi du système BD MAX™ pour obtenir des instructions détaillées.

8.3.1. Création d'un programme de test PCR pour le VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit

Remarque : si vous avez déjà créé le test VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection, vous pouvez ignorer l'étape 8.3.1 et passer directement à l'étape 8.3.2.

- 1) Sur l'écran « Run » (Exécuter) du système BD MAX™, sélectionnez l'onglet « Test Editor » (Éditeur de test).
- 2) Cliquez sur la touche « Create » (Créer).
- 3) Dans la fenêtre « Test Name » (Nom du test), attribuez un nom à votre test : notamment, VIASURE Vancomycin resistance.
- 4) Dans le menu déroulant « Extraction Type » (Type d'extraction), sélectionnez « ExK TNA-2 ».
- 5) Dans le menu déroulant « Master Mix Format » (Format Master Mix), sélectionnez « Type 5 »
 - b. Remarque : l'utilisation de ce produit est possible en association avec un autre test VIASURE pour BD MAX, dans ce cas sélectionnez « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec tampon de réhydratation).
- 6) Dans les « Sample extraction parameters » (Paramètres d'extraction de l'échantillon), sélectionnez « User defined » (Défini par l'utilisateur) et ajustez le volume de l'échantillon à 500 µl.
- 7) Dans le « Ct Calculation » (Calcul Ct), sélectionnez « Call Ct at Threshold Crossing » (Résultats Ct au point d'inflexion).
- 8) Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez les paramètres suivants : « Channel Settings » (Réglages des canaux), « Gains » et « Threshold » (Seuil) (tableau 2).
 - a. Remarque : l'utilisation de ce produit est possible en association avec un autre test VIASURE pour BD MAX, les Réglages PCR et les Étapes du test doivent être effectués pour les clips positions 2 (vert) et 4 (bleu).

Channel (Canal)	Alias	Gain (Gain)	Threshold (Seuil)	Ct min.	Ct max.
475/520 (FAM)	vanA	50	200	0	40
530/565 (HEX)	CI	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

Tableau 2. Réglages PCR.



- 9) Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez également les paramètres « Spectral Cross Talk » (tableau 3) suivants :

		False Receiving Channel (Canal de fausse réception)					
		Canal	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal d'excitation)	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

Tableau 3. Paramètres crosstalk spectraux.

- 10) Sous l'onglet « Test Steps » (Étapes de test), saisir le protocole PCR (tableau 4).

Step Name (Nom de l'étape)	Profile Type (Type de profil)	Cycles (Cycles)	Time (s) (Temps [s])	Temperature (Température)	Detect (Détection)
Initial denaturation (Dénaturation initiale)	Maintien	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Dénaturation et appariement/extension [collecte de données])	2- température	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tableau 4. Protocole PCR.

- 11) Cliquez sur la touche « Save Test » (Enregistrer le test).

8.3.2. Préparation du portoir BD MAX™

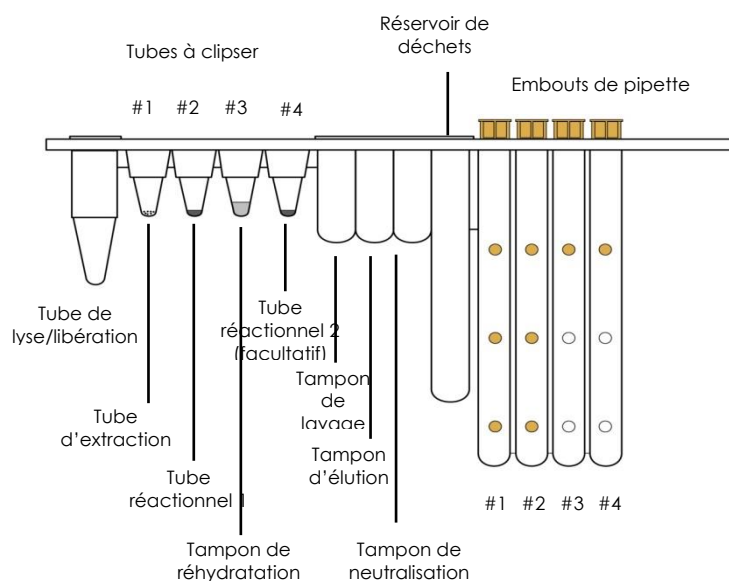
- Prenez une barrette unitaire de réactifs du BD MAX™ ExK™ TNA-2 kit pour chaque échantillon à tester. Tapotez doucement chaque barrette sur une surface dure afin de vous assurer que les liquides se trouvent au fond du tube et chargez les barrettes sur les portoirs d'échantillons du système BD MAX™.
- Sortez le nombre nécessaire de tubes d'extraction BD MAX™ ExK™ TNA (B4) (opercule blanc) de leur poche de protection. Clipsez le(s) tube(s) d'extraction (opercule blanc) dans la position correspondante sur la barrette TNA (clip position 1, code couleur blanc sur le portoir - voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez la poche avec la fermeture à glissière.
- Déterminez et séparez le nombre approprié de VIASURE *Vancomycin resistance* reaction tubes (opercule bleu) et clipsez-les dans leur position sur la barrette (clip position 2, code couleur vert sur le portoir - voir figure 1).
 - Expulsez l'excès d'air et scellez les poches en aluminium avec la fermeture à glissière.
 - Afin d'obtenir une réhydratation optimale, veuillez vous assurer que le produit lyophilisé se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage.
 - Remarque : si vous choisissez le format « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec tampon de réhydratation)(section 8.3.1), déterminez et séparez le nombre nécessaire de tubes réactionnels VIASURE supplémentaires (opercule différent) et clipsez-les dans les



positions correspondantes sur la barrette (clip position 4, code couleur bleu sur le portoir - voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez les poches en aluminium avec la fermeture à glissière.

- 4) Sortez le nombre nécessaire de tubes de Rehydration Buffer tubes (opercule rouille) et clipsez-les dans leur position sur la barrette (clip position 3, sans code couleur sur le portoir - voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez la poche avec la fermeture à glissière.
 - a. Afin de réaliser un transfert optimal, veuillez vous assurer que le liquide se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage.

Figure 1. BD MAX™ TNA barrette réactive (TNA) du BD MAX™ ExK™ TNA-2 kit.



8.3.3. Préparation de l'instrument BD MAX™

- 1) Sélectionnez l'onglet « Work List » (Liste de travail) sur l'écran « Run » (Exécuter) du système BD MAX™ (logiciel v4.50A ou supérieur).
- 2) Dans le menu déroulant « Test », sélectionnez VIASURE *Vancomycin resistance* (s'il n'est pas créé, voir la section 8.3.1).
- 3) Sélectionnez le numéro de lot correspondant au kit (visible à l'extérieur de la boîte du kit d'extraction utilisé) dans le menu déroulant (facultatif).
- 4) Saisissez le numéro d'identification du tube de tampon d'échantillon dans la fenêtre Tube d'échantillon de la Liste de travail, soit en scannant le code-barres, soit par saisie manuelle.
- 5) Renseignez l'identifiant de l'échantillon/du patient et/ou la fenêtre Accession de la Liste de travail et cliquez sur la touche « Save » (Enregistrer). Poursuivez ainsi jusqu'à ce que tous les tubes de tampon d'échantillon soient saisis. Assurez-vous que l'identifiant de l'échantillon/du patient et les tubes de tampon d'échantillon sont correctement appariés.
- 6) Placez le tube de tampon d'échantillon préparé dans le portoir du système BD MAX™.
- 7) Chargez le(s) portoir(s) dans le système BD MAX™ (le portoir A est positionné du côté gauche de l'instrument et le portoir B du côté droit).
- 8) Chargez le nombre nécessaire de BD MAX™ PCR Cartridge(s) dans le système BD MAX™.



- 9) Fermez la porte du système BD MAX™.
- 10) Cliquez sur « Start Run » (Lancer l'exécution) pour démarrer la procédure.

8.3.4 Rapport BD MAX™

- 1) Dans le menu principal, cliquez sur la touche « Results » (Résultats).
- 2) Faites un double-clic sur votre programme dans la liste ou appuyez sur la touche « View » (Aperçu).
- 3) Cliquez sur « Print » (Imprimer), sélectionnez : « Run Details, Test Details and Plot... » (Détails du programme, détails du test et trame...)
- 4) Cliquez sur la touche « Print or Export » (Imprimer ou Exporter) sur l'écran « Run Reports » (Produire des rapports)

9. Interprétation des résultats

Pour plus de détails sur la manière d'analyser les données, veuillez consulter le mode d'emploi du système BD MAX™.

L'analyse des données est effectuée par le logiciel BD MAX™ selon les instructions du fabricant. Le logiciel BD MAX™ rapporte les valeurs Ct et les courbes d'amplification pour chaque canal détecteur de chaque échantillon testé de la manière suivante :

- Une valeur Ct de « 0 » indique qu'il n'y a pas de valeur Ct calculée par le logiciel avec le seuil spécifié (voir tableau 2). Une courbe d'amplification de l'échantillon affichant une valeur Ct de « 0 » doit faire l'objet d'un examen manuel.
- Une valeur Ct de « -1 » indique qu'aucun processus d'amplification n'a eu lieu.
- Toute autre valeur Ct doit être interprétée en corrélation avec la courbe d'amplification et selon les directives d'interprétation des échantillons énoncées dans le tableau 5.

Vérifiez le signal du contrôle interne pour vous assurer du fonctionnement correct du mélange d'amplification. Vérifiez en outre qu'il n'y a pas de rapport de défaillance du système BD MAX™.



-Il convient de lire et d'analyser les résultats à l'aide du tableau suivant :

Gène <i>vanA</i> (475/520)	Gène <i>vanB</i> (585/630)	Contrôle interne (530/565)	Interprétation
-	-	+	<i>vanA</i> et <i>vanB</i> négatifs
+	+	+/-	<i>vanA</i> et <i>vanB</i> positifs
+	-	+/-	<i>vanA</i> positif, <i>vanB</i> négatif
-	+	+/-	<i>vanB</i> positif, <i>vanA</i> négatif
-	-	-	Résultat non résolu (UNR, Unresolve result) obtenu en présence d'inhibiteurs de la réaction polymérase ou en cas de problème d'ordre général (non signalé par un code d'erreur) survenu avec le traitement de l'échantillon et/ou les étapes d'amplification.
IND	IND	IND	Résultat de test indéterminé (IND, Indeterminate assay result) en raison d'une défaillance du système BD MAX™. Résultat du test affiché lorsqu'une défaillance de l'instrument est liée à un code d'erreur.
INC	INC	INC	Résultat de test incomplet (INC, Incomplete assay result) en raison d'une défaillance du système BD MAX™. Résultat du test affiché en cas de défaillance de l'exécution complète.

Tableau 5. Interprétation de l'échantillon

+ : l'amplification a eu lieu

- : l'amplification n'a pas eu lieu

Un échantillon est considéré positif si la valeur Ct obtenue est inférieure à 40. Le contrôle interne peut afficher ou non un signal d'amplification parce qu'un nombre élevé de copies de la cible peut entraîner une amplification préférentielle des acides nucléiques spécifiques à la cible au lieu du contrôle interne. Dans ce cas, la détection du CI n'est pas nécessaire.

Un échantillon est considéré négatif s'il ne montre aucun signal d'amplification dans le système de détection et si le contrôle interne est positif. L'inhibition de la réaction polymérase peut être exclue par l'amplification du contrôle interne.

En cas de résultats non résolus (UNR), d'absence de signal du contrôle interne dans un échantillon négatif, il est recommandé de recommencer le test en suivant les indications ci-dessous :

RECOMMENCER LA PROCÉDURE DE TEST

REMARQUE : on dispose de suffisamment de volume du tube de tampon d'échantillon pour recommencer un test. Pour les tubes de tampon d'échantillon BD MAX préparés et conservés à 2–8 °C ou 25 °C, le nouveau test doit avoir lieu dans les 24 heures.

REMARQUE : Les nouveaux échantillons peuvent être testés en même temps que les échantillons retestés.

Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé en tenant compte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests diagnostiques.



10. Limitations du test

- Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé en tenant compte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests diagnostiques.
- Bien que ce test soit compatible avec d'autres types d'échantillons, il a été validé avec des écouvillons périaux et/ou rectaux, prélevés dans un milieu de transport ESwab™, et des colonies mises en suspension.
- La qualité du test dépend de la qualité des échantillons ; l'acide nucléique doit être extrait de manière correcte des écouvillons périaux et/ou rectaux et des colonies. Le prélèvement, la conservation et/ou le transport incorrects des échantillons peuvent entraîner de faux négatifs.
- Il est possible que soient détectés des niveaux très faibles de cibles, inférieurs à la limite de détection, mais que les résultats ne soient pas reproductibles.
- Possibilité de faux positifs dus à une contamination croisée par des échantillons suspects présentant une résistance à la vancomycine contenant de fortes concentrations de l'ADN cible ou à cause d'une contamination par transmission à partir de produits PCR de réactions antérieures.
- En cas de résultats non résolus, indéterminés ou incomplets avec le VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit, l'exécution d'un nouveau test est exigée. Les résultats non résolus peuvent découler de la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon ou d'une réhydratation incorrecte du tube de mélange réactionnel lyophilisé. En cas de défaillance de l'instrument, les résultats obtenus seront indéterminés ou incomplets.

11. Contrôle qualité

Le VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit contient, dans chaque tube réactionnel, un contrôle interne (CI) qui confirme la bonne performance de la technique.

12. Caractéristiques du test

12.1. Sensibilité et spécificité cliniques

La performance clinique du VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit a été testée au moyen de 216 échantillons (échantillons rectaux frais prélevés dans un milieu ESwab™) chez des patients (nourrissons et adultes) soupçonnés de présenter une infection VRE. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec un test PCR en temps réel réalisé en interne et une mise en culture dans un milieu d'enrichissement. Le test PCR en temps réel en interne adapté au système BD MAX™ détecte *E. faecalis*, *E. faecium* et les gènes *vanA* et *vanB*.

	Test PCR en temps réel en interne			
	+	-	Total	
VIASURE <i>Vancomycin resistance</i> Real Time PCR Detection Kit	+	82*	0	82
	-	0	134	134
	Total	82	134	216

Tableau 6 : Résultats comparatifs pour le gène *vanA*.



*17/82 patients présentant une coinfection par *Enterococcus faecium* génotypes *vanA* et *vanB*. Le VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit est capable de détecter correctement et simultanément les gènes *vanA* et *vanB* dans des échantillons cliniques.

		Test PCR en temps réel en interne		
		+	-	Total
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit	+	53*	1 [#]	54
	-	0	162	162
	Total	53	163	216

Tableau 7 : Résultats comparatifs pour le gène *vanB*.

* 17/53 patients présentant une coinfection par *Enterococcus faecium* génotypes *vanA* et *vanB*. Le VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit est capable de détecter correctement et simultanément les gènes *vanA* et *vanB* dans des échantillons cliniques.

[#] Cet échantillon était négatif pour la résistance à la vancomycine lors de l'analyse du séquençage du génome entier (Whole Genome Sequencing, WGS).

La sensibilité (SE) et la spécificité (SP) pour le VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit en comparaison avec le test PCR en temps réel réalisé en interne sont présentées dans le tableau ci-après :

Gène de résistance à la vancomycine	SE (%)	SP (%)
<i>vanA</i>	>99,9	>99,9
<i>vanB</i>	>99,9	99,4

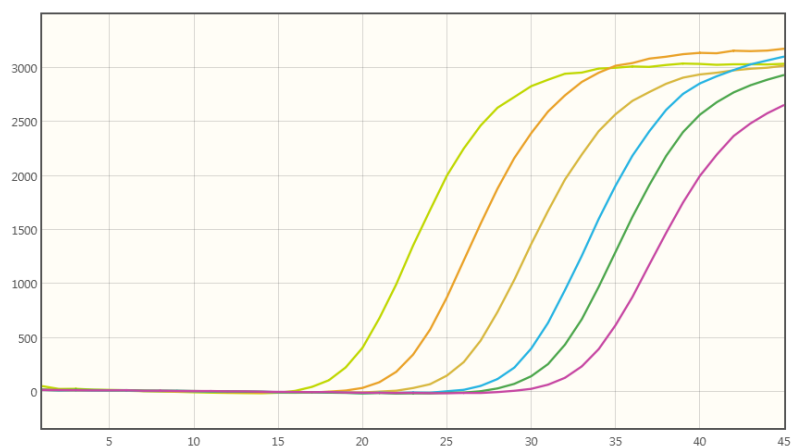
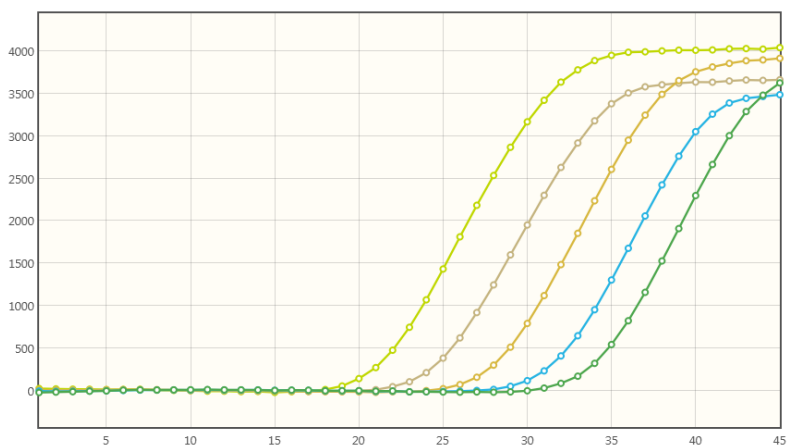
Tableau 8. Valeurs de sensibilité (SE) et de spécificité (SP) pour le VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

Les résultats montrent une sensibilité et une spécificité élevées pour la détection des gènes *vanA* et *vanB* avec le VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilité analytique

Le VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection KIT a une limite de détection ≥ 4 unités formant colonies par réaction (CFU/rxn) pour *vanA* et ≥ 10 CFU/rxn pour *vanB* avec un taux positif ≥ 95 %.



Figure 2. Dilution en série du gène *vanA* ($3.62 \cdot 10^4$ - 3.62 CFU/rxn), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 475/520 [FAM]).Figure 3. Dilution en série du gène *vanB* ($5.65 \cdot 10^4$ - 9.98 CFU/rxn), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 585/630 [ROX]).

12.3. Spécificité analytique

La spécificité du test de résistance à la vancomycine a été confirmée par l'analyse d'un panel composé de différents organismes résistants aux antimicrobiens et de différents microorganismes représentant les agents pathogènes entériques les plus courants ou la flore présente dans l'intestin. Aucune réactivité croisée n'a été détectée entre l'un quelconque des microorganismes testés suivants, à l'exception des agents pathogènes propres à chaque test :



Test de réactivité croisée					
Adénovirus de sérotypes 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	Isolat de <i>Klebsiella pneumonia</i> producteur de TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) et KPC-2	-
<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> génotype vanC	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i> génotype vanC2	-	Norovirus GI et GII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Astrovirus génotypes I-VIII	-	<i>Enterococcus faecalis</i> génotype vanA	-/+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> génotype vanB	-/+	Rotavirus A	-
<i>Blastocystis hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> génotype vanA	+/-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> génotype vanB	-/+	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> génotypes vanB et vanC	-/+	<i>Salmonella paratyphi</i> A	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> génotype vanC	-	<i>Salmonella paratyphi</i> B	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> génotype vanC1	-	<i>Salmonella pullorum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus hirae</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Isolat de <i>Citrobacter braakii</i> producteur de VIM-1	-	<i>Escherichia coli</i> entéroinvasif	-	Sapovirus	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Escherichia coli</i> entéropathogénique	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Isolat de <i>Citrobacter freundii</i> -complex producteur de KPC-3 et VIM-4	-	<i>Escherichia coli</i> entérotoxigénique	-	Isolat de <i>Serratia marcescens</i> producteur de OXA-48	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	Isolat d' <i>Escherichia coli</i> producteur de OXA-244	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Clostridium difficile</i> 027	-	Isolat d' <i>Escherichia coli</i> producteur de TEM-1 (non-ESBL) et IMP-1	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	-	<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (mecC)	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	-	<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	Souche <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM) N315	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM) ST398	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	Souche <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM) (oxa ^R , PVL-positive, spa type t310)	-
Isolat d' <i>Enterobacter cloacae</i> producteur de SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) et OXA-48	-	<i>Helicobacter pylori</i> résistant à la clarithromycine (23S rDNA A2146G)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
Isolat d' <i>Enterobacter cloacae</i> producteur de TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) et NDM-1	-	<i>Helicobacter pylori</i> résistant à la clarithromycine (23S rDNA A2147G)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Isolat d' <i>Enterobacter cloacae</i> complex producteur de NDM-7	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Enterococcus avium</i> génotype vanA	+/-	Isolat de <i>Klebsiella pneumonia</i> producteur de SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 et OXA-48	-		

Tableau 9. Microorganismes pathogènes de référence utilisés dans cette étude.



12.4. Réactivité analytique

La réactivité de VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit pour le gène *vanA* a été évaluée par rapport aux souches *Enterococcus avium* génotype *vanA*, *Enterococcus faecalis* génotype *vanA* (NCTC 13632, NCTC 12201) et *Enterococcus faecium* génotype *vanA* (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202), montrant un résultat positif.







La réactivité de VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit pour le gène *vanB* a été évaluée par rapport aux souches *Enterococcus faecalis* génotype *vanB* (ATCC 51299, CECT 8120), *Enterococcus faecium* génotype *vanB* (IOWA 2) et *Enterococcus gallinarum* génotypes *vanB* et *vanC* (ENT20120142), montrant un résultat positif.

13. Bibliography/Bibliographie

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. VRE in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/HAI/organisms/vre/vre.html>
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.



14. Symbols for IVD components and reagents/Symboles pour les composants IVD et réactifs

IVD	<p><i>In vitro</i> diagnostic device Dispositif de diagnostic <i>in vitro</i></p>		<p>Keep dry Conserver dans un endroit sec</p>		<p>Use by Utiliser avant</p>		<p>Manufacturer Fabricant</p>	LOT	<p>Batch code (Lot) Numéro de lot (Lot)</p>
	<p>Consult Instructions for Use Consulter les consignes d'utilisation</p>		<p>Temperature limitation Limitation de température</p>		<p>Contains sufficient for <n> test Contenance suffisante pour <n> test(s)</p>	DIL	<p>Sample diluent Diluant d'échantillon</p>	REF	<p>Catalognumber Numéro de catalogue</p>

BD MAX™ is a registered trademark of Becton, Dickinson and Company.

ESwab™ is a registered trademark of COPAN Diagnostics Inc.









CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC