

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 444203

to be used with BD MAX™

à utiliser avec BD MAX™

For Research Use Only (RUO)

This product has no declared clinical intended purpose and is not for clinical diagnostic use. No claim or representation is intended to provide information for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

Ce produit n'a pas de finalité clinique déclarée et n'est pas destiné à des fins de diagnostic clinique. Aucune revendication ou déclaration n'a pour objet de fournir des informations pour le diagnostic, la prévention ou le traitement d'une maladie.



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit is a research use only (RUO) assay designed for the specific identification and differentiation of *vanA* and *vanB* genes that can be associated with vancomycin-resistant enterococci (VRE) and other organisms.

The assay is performed on the BD MAX™ System from individuals at risk for VRE. The VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit can be used as an aid to identify, prevent and control VRE.

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 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 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. Whereas, the second type is acquired resistance (i.e. *vanA* or *vanB* genes) when enterococci can become resistant by acquisition of mobile genetic elements (transposons and plasmids) from another *Enterococcus* species or organisms. 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 level 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, sputum and other) or through indirect contact via the hands of health-care workers, or via contaminated patient care equipment or environmental surfaces.

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 clinically relevant genes associated with vancomycin-resistance.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit is a RUO assay designed for the identification and differentiation of DNA from vancomycin-resistant *Enterococcus* 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* gene is amplified and detected in channel 475/520, *vanB* gene 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-VAN112RUO	<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-RB08RUO	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-VAN124RUO.



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 can be used up to 28 days.

7. Precautions for users

- This VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit is for Research Use Only. It is not for use in diagnostic procedures. The performance characteristics of this product have not been established.
- For professional 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 against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-2 extraction kit, any additional reagents required for testing, and the BD MAX™ System are not contaminated. 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.
- Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- 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 using colony suspensions and spiked on Eswab (liquid Amies based collection and transport system), immediately placed in Eswab transport medium (Copan, Italy).

Collection, storage and transport samples should be maintained per the conditions validated by the user. Processing should be done as soon as possible to guarantee the quality of the test. Transportation should follow the local and national regulations for the transport. 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 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 media 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

- 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.
- Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.
- 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.
 - Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - In order to carry on 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.
 - 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.
- 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.
 - In order to carry out 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.



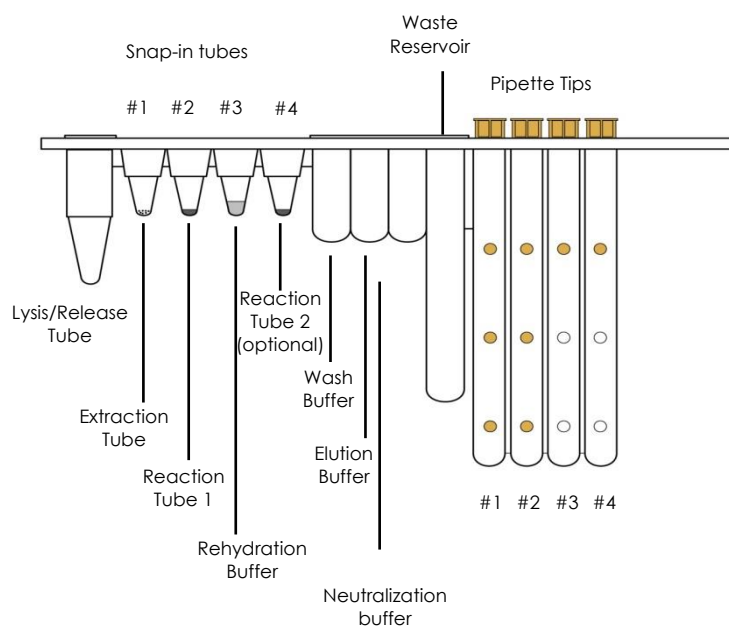


Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK TNA-2 kit.

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 into Accession window of the Worklist (if applicable) 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

Based on the validation using a colony suspension, 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 $\geq 95\%$

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

The analysis of the data is done by the BD MAX™ software according to 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 4). 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.

Using the following table read and analyze the results:

VanA (475/520)	VanB (585/630)	Internal control (530/565)	Interpretation
-	-	+	VanA and VanB Negative
+	+	+/-	VanA and VanB Positive
+	-	+/-	VanA Positive, VanB Negative
-	+	+/-	VanB Positive, VanA Negative
UNR	UNR	UNR	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, absence of internal control signal in negative sample we recommend 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 25°C, retesting must be performed within 24 hours. Alternatively, for Sample Buffer Tubes stored at 2–8 °C, retesting may be performed within 24 hours.

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

10. Limitations of the test

- The test must be used for RUO purposes, without any medical objective.
- This assay has been validated with colony suspensions.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from sample of 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.
- The results obtained with VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection Kit may be Unresolved due to the sample contains inhibitors or incorrect rehydration of the lyophilized reaction mix tube or be Indeterminate or Incomplete due to instrument failure, and require retesting.

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.



FRANÇAIS

1. Application prévue

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit est un test réservé à la recherche, conçu spécifiquement pour l'identification et la différenciation des gènes *vanA* et *vanB* pouvant être associés aux entérocoques résistant à la vancomycine (VRE, vancomycin-resistant enterococci) et autres organismes résistant à la vancomycine. Le test est réalisé sur le système BD MAX™ à partir de prélèvements de personnes présentant un risque de VRE. VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit facilite l'identification, la prévention et le contrôle des VRE. 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 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.

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* démontrent une résistance inhérente faible à la vancomycine. Quant au deuxième type, il s'agit d'une résistance acquise (c.-à-d. gènes *vanA* ou *vanB*) lorsque les entérocoques deviennent résistants par acquisition d'éléments génétiques mobiles (transposons et plasmides) d'autres espèces d'*Enterococcus* ou d'organismes. 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. Afin de réduire le temps de détection et d'améliorer la sensibilité, 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

VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit est un test réservé à la recherche, conçu pour l'identification et la différenciation de l'ADN des *Enterococcus* résistant à la vancomycine et d'autres organismes porteurs des gènes *vanA* et *vanB* résistant à la vancomycine. 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.

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™.

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

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-VAN112RUO	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-RB08RUO	Tube de solution tampon de réhydratation	Solution pour reconstituer le produit stabilisé	Opercule rouille transparent	1 poche de 24 tubes

Tableau 1. Réactifs et matériaux fournis avec VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit réf. VS-VAN124RUO.



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 VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit.

- Instrument PCR en temps réel : système BD MAX™.
- BD MAX™ ExK™ TNA-2 (réf. :442826)
- Cartouches BD MAX™ PCR (réf. : 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.
- La durée d'utilisation des poches en aluminium contenant les tubes réactionnels est de 28 jours maximum après ouverture.

7. Précautions pour les utilisateurs

- VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit est strictement réservé à la recherche. Il n'est pas destiné à un usage dans des procédures diagnostiques. Les caractéristiques de performance de ce produit n'ont pas été établies.
- Réservé à l'usage professionnel.
- 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. Toute exposition prolongée à l'humidité risque d'altérer l'efficacité du produit.
- 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 VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit, le kit d'extraction BD MAX™ ExK™ TNA-2, 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.
- 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. Une fois le test terminé, lavez-vous les mains.
- 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

VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit a été validé avec des colonies en suspension, mises sur écouvillons Eswab (système de prélèvement et de transport en milieu liquide Amies), immédiatement placés dans le milieu de transport Eswab (Copan, Italie).

Les échantillons prélevés, stockés et transportés doivent être conservés selon les conditions validées par l'utilisateur. Le traitement doit avoir lieu le plus tôt possible afin de garantir la qualité du test. Les conditions de transport doivent respecter les réglementations locales et nationales en vigueur. 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 µl du milieu 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 µl d'eau exempte de nucléase. Mélangez soigneusement avant d'agiter au vortex. Ajoutez 10 µl 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 kit VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection

Remarque : si vous avez déjà créé le test VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection kit, 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, 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).

Canal	Pseudo	Gain	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 :



		Canal de fausse réception				
	Canal	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Canal d'excitation	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	-

Tableau 3. Paramètres crosstalk spectraux.

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

Nom de l'étape	Type de profil	Cycles	Temps (s)	Température	Détection
Dénaturation initiale	Maintien	1	120	98 °C	-
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 kit BD MAX™ ExK TNA-2 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 tubes réactionnels VIASURE *Vancomycin resistance* (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 tampon de réhydratation (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.

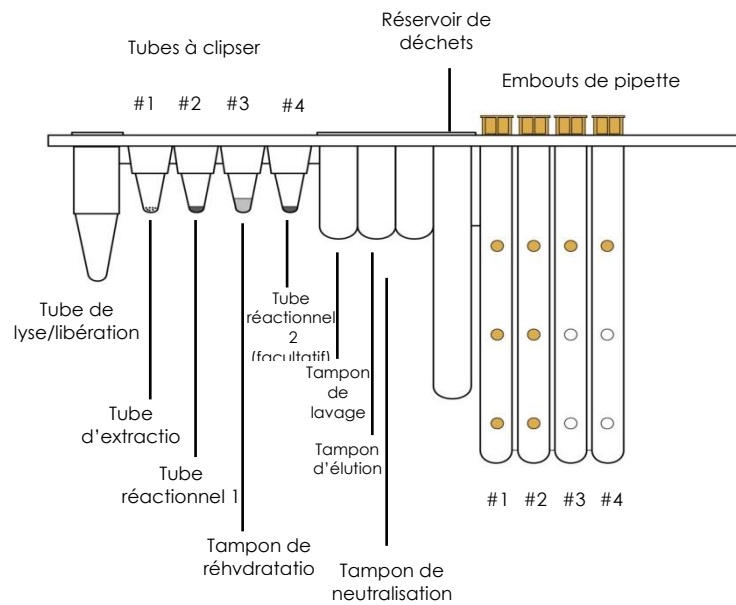


Figure 1. BD MAX™ TNA barrette réactive (TNA) du kit BD MAX™ ExK TNA-2.

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) Saisissez l'identifiant de l'échantillon/du patient dans la fenêtre Accession de la Liste de travail (le cas échéant) 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 cartouches(s) PCR BD MAX™ 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.

8.3.5 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

Sur la base de la validation au moyen de colonies mises en suspension, 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 %

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 4). 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™.

Lisez et analysez les résultats à l'aide du tableau suivant :



VanA (475/520)	VanB (585/630)	Contrôle interne (530/565)	Interprétation
-	-	+	VanA et VanB négatifs
+	+	+/-	VanA et VanB positifs
+	-	+/-	VanA positif, VanB négatif
-	+	+/-	VanB positif, VanA négatif
UNR	UNR	UNR	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, d'absence de signal du contrôle interne dans un échantillon négatif, nous recommandons 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 25 °C, le nouveau test doit avoir lieu dans les 24 heures. Quant aux tubes de tampon d'échantillon conservés à 2-8 °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.



10. Limitations du test

- Le test doit être utilisé à des fins de recherche uniquement, sans quelconque objectif médical.
- Ce test a été validé avec des colonies mises en suspension.
- La qualité du test dépend de la qualité des échantillons ; l'acide nucléique doit être extrait de manière correcte sur un échantillon d'écouvillons et de 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.
- Les résultats obtenus avec VIASURE *Vancomycin resistance* Real Time PCR Detection kit peuvent s'avérer non résolus parce que l'échantillon contient des inhibiteurs ou à cause d'une réhydratation incorrecte du tube de mélange réactionnel lyophilisé, ou qu'ils soient non déterminés ou incomplets en raison d'une défaillance de l'instrument, et exigent de procéder à un nouveau test.

11. Contrôle qualité

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

12. 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.



13. Symbols for components and reagents/ Symboles pour les réactifs et les produits.

	Research Use Only device Utiliser uniquement un appareil de recherche		Keep dry À stocker dans un endroit sec		Use by Date de péremption		Manufacturer Fabricant		Batch code Numéro de lot
	Consult instructions for use Consulter le mode d'emploi		Temperature limitation Limitation de la température		Contains sufficient for <n> test Contient <n> test		Sample diluent Diluant d'échantillon		Catalogue number Numéro de référence

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









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-349 rev00

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC