

These instructions for use apply to the following reference / Ce mode d'emploi s'applique à la référence suivante:

PRODUCT / PRODUIT	REFERENCE / REFERENCE
VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit	444202 / VS-VAN124

Table A 1. Reference for product to be used with the BD MAX $^{\text{TM}}$ System. / Référence du produit à utiliser avec le système BD MAX $^{\text{TM}}$.

Content

1.	Intended use	5
2.	Summary and Explanation	5
3.	Principle of the procedure	6
4.	Reagents provided	6
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	6
6.	Transport and storage conditions	7
7.	Precautions for users	7
8.	Test procedure	8
8.1.	Sample collection, transport and storage	8
8.2.	Sample preparation and DNA extraction	9
8.3.	PCR protocol	9
9.	Result interpretation	12
10.	Limitations of the test	13
11.	Quality control	14
12.	Performance characteristics	15
12.1.	Clinical sensitivity and specificity	15
12.2.	Analytical sensitivity	16
12.3.	Analytical specificity	16
12.4.	Analytical reactivity	18
Cor	ntenu	
1.	Utilisation prévue	19
2.	Résumé et explication	19
3.	Procédé	20
4.	Réactifs fournis	20
5.	Réactifs et équipement à fournir par l'utilisateur	21
6.	Conditions de transport et de stockage	21
7.	Précautions pour les utilisateurs	21
8.	Protocole de test	22
8.1.	Prélèvement, stockage et transport des échantillons	22
8.2.	Préparation de l'échantillon et extraction de l'ADN	23
8.3.	Protocole PCR	23

9.	Interprétation des résultats	27
10.	Limitations du test	29
11.	Contrôle qualité	30
12.	Caractéristiques du test	30
12.1.	Sensibilité et spécificité cliniques	30
12.2.	Sensibilité analytique	31
12.3.	Spécificité analytique	32
12.4.	Reactividad Réactivité analytique	33
Bibliog	graphy/Bibliographie	34
Symbo	ols for IVD components and reagents/ Symboles pour les composants IVD et réactifs	34
Trade	marks	34

ENGLISH

1. Intended use

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

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

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

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

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

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

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

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

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

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

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

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

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

8. Test procedure

8.1. Sample collection, transport and storage

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

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

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

8.2. Sample preparation and DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations in the instructions for use of extraction kit used, BD MAXTM ExKTM 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 MAXTM 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 MAXTM System Operation.

8.3. PCR protocol

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

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

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

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

- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 3).
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAXTM test, "PCR Settings" and "Test Steps" should be completed for Snap-In 2 (green) and Snap-In 4 (blue) positions.

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

Table 3. PCR settings.

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

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

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

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 5. PCR protocol.

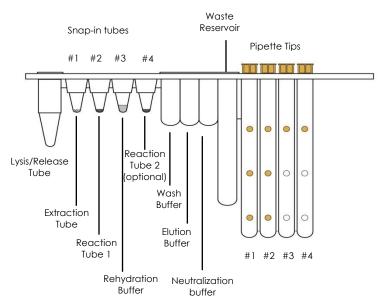
12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 1) For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAXTM 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 MAXTM System sample racks.
- 2) Remove the required number of BD MAXTM ExKTM TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip

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

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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAXTM 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 MAXTM Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAXTM System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAXTM System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAXTM PCR Cartridge(s) into the BD MAXTM 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 MAXTM System User's manual.

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

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

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

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

vanA gene (475/520)	vanB gene (585/630)	Internal control (530/565)	Interpretation
+	+	+/-1	vanA and vanB genes DNA Detected1
+	-	+/-1	vanA gene DNA Detected, vanB gene DNA Not Detected ¹
-	+	+/-1	vanB gene DNA Detected, vanA gene DNA Not Detected ¹
-	-	+2	vanA and vanB genes DNA Not Detected2
-	-	_2	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs. ²
IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX TM 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 TM System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 6. Sample interpretation.

- +: Amplification occurred
- -: No amplification occurred
 - 1 A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40. The Internal Control (IC) may or may not show an amplification signal. Sometimes, the IC detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.
 - 2 A sample is considered negative if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive (Ct less than 40). An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control. In case of unresolved results (UNR), absence of internal control signal in negative sample it is recommended to repeat the assay following the indications below.

REPEAT TEST PROCEDURE

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

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

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

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

10. Limitations of the test

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

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

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

vanA. A volume of 10 μ l of each colonie suspensions was added directly to the sample buffer tube. The flowchart used to carry out this evaluation was: BD MAXTM EXKTM TNA-2 + BD MAXTM System.

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

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

12.2. Analytical sensitivity

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

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

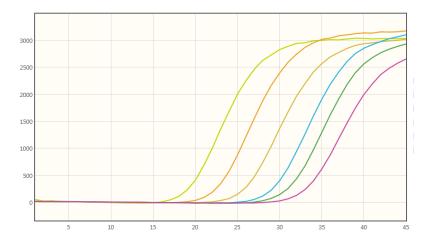
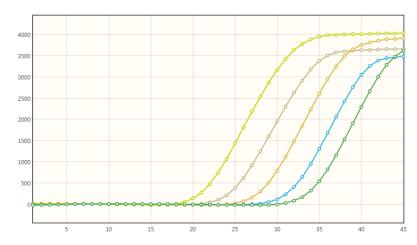


Figure 3. Dilution series of vanB gene (5.65*10⁴-9.98 CFU /rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



12.3. Analytical specificity

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

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

		Cross-reactivity testing			
Adenovirus serotypes 1/2/3/4/5/8/15/31/40/41	-	Enterococcus durans	-	TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non- ESBL), CTX-M-2 (ESBL), and KPC-2 producing Klebsiella pneumonia isolate	-
Aeromonas caviae	-	VanC- type Enterococcus casseliflavus	-	Listeria monocytogenes	-
Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila	-	VanC2- type Enterococcus casseliflavus	-	Norovirus GI and GII	-
Arcobacter butzleri	-	Enterococcus faecalis	-	Proteus vulgaris	-
Astrovirus Genotype I-VIII	-	VanA-type Enterococcus faecalis	-/+	Pseudomonas aeruginosa	-
Bacteroides fragilis	-	VanB-type Enterococcus faecalis	-/+	Rotavirus A	-
Blastocystis hominis	-	Enterococcus faecium	-	Salmonella bongori	-
Campylobacter coli	-	VanA- type Enterococcus faecium	+ / -	Salmonella enteritidis	-
Campylobacter fetus	-	VanB- type Enterococcus faecium	-/+	Salmonella gallinarum	-
Campylobacter hyointestinalis	-	VanB and VanC- types Enterococcus gallinarum	-/+	Salmonella paratyphi A	-
Campylobacter jejuni subsp. jejuni	-	VanC – type Enterococcus gallinarum	-	Salmonella paratyphi B	-
Campylobacter lari	-	VanC1- type Enterococcus gallinarum	-	Salmonella pullorum	-
Campylobacter upsaliensis	-	Enterococcus hirae	-	Salmonella typhi	-
Candida albicans	-	Enterohemorragic Escherichia coli	-	Salmonella typhimurium	-
VIM-1 producing Citrobacter braakii isolate	-	Enteroinvasive Escherichia coli	-	Sapovirus	-
Citrobacter freundii	-	Enteropathogenic Escherichia coli	-	Serratia liquefaciens	-
KPC-3 and VIM-4 producing Citrobacter freundii-complex isolate	-	Enterotoxigenic Escherichia coli	-	OXA-48 producing Serratia marcescens isolate	-
clostridium difficile		OXA-244 producing Escherichia coli isolate		Shigella dysenteriae	-
Clostridium difficile 027	-	TEM-1 (non-ESBL) and IMP-1 producing Escherichia coli isolate		Shigella flexneri	-
Clostridium perfringens	-	Giardia intestinalis		Staphylococcus aureus subsp. aureus	-
Cryptosporidium parvum/hominis	-	Helicobacter cinaedi	-	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (mecC)	-
Dientamoeba fragilis	-	Helicobacter heilmannii	-	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strain N315	-
Entamoeba dispar	-	Helicobacter hepaticus	-	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ST398	-
Entamoeba histolytica	-	Helicobacter pylori	-	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strain (oxa ^R , PVL-positive, spa type t310)	-
SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL)and OXA-48 producing Enterobacter cloacae isolate	-	Helicobacter pylori Clarithromycin resistant (23S rDNA A2146G)	-	Vibrio parahaemolyticus	-
TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) and NDM-1 producing Enterobacter cloacae isolate	-	Helicobacter pylori Clarithromycin resistant (23S rDNA A2147G)	-	Yersinia enterocolitica O:3	
NDM-7 producing Enterobacter cloacae- complex isolate	-	Klebsiella oxytoca	-	Yersinia enterocolitica 0:9	-
VanA-type Enterococcus avium	+ / -	SHV-1 (non-ESBL), KPC-3, and OXA-48 producing Klebsiella pneumonia isolate	-		

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

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

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

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'écouvillons 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 MAXTM 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 MAXTM. L'ADN d'écouvillons 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 MAXTM.

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 surveiller le processus d'extraction et/ou l'inhibition de l'activité polymérase.

Cible	Canal	Gène
Gènes de résistance à la vancomycine	475/520	vanA
Gènes de résistance à la vancomycine	585/630	vanB
Contrôle interne (CI)	530/565	-

Tableau 1. Cible, canal et gènes.

4. Réactifs fournis

Le VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit contient les matériaux et réactifs décrits dans le tableau 2 ci-après.

Réactif/Matériau	Description	Code-barres	Quantité
Vancomycin resistance reaction tube	Assortiment comprenant des enzymes, des amorces, des sondes, un tampon, des dNTPs, des stabilisateurs et un contrôle interne dans un format stabilisé	Opercule 1B	2 poches de 12 tubes transparents
Rehydration Buffer tube	Solution pour reconstituer le produit stabilisé	Opercule 11	1 poche de 24 tubes transparents

Tableau 2. Réactifs et matériaux fournis dans le VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, réf. N° VS-VAN124 (444202).

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 MAXTM ExKTM TNA-2 (Ref: 442825 ou 442826).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Réf: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (exactitude entre 2 et 1000 µl).
- Eau exempte de nucléase.
- Embouts à filtre.
- Gants jetables sans poudre.

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

- L'utilisation de ce produit est strictement réservée aux professionnels, tels que les professionnels et techniciens de laboratoire ou de santé, formés aux techniques de la biologie moléculaire.
- Pour les 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. 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 le VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit, BD MAXTM ExKTM TNA-2 extraction kit, tout réactif supplémentaire requis pour le test et le système BD MAXTM ne sont pas contaminés. Évitez à tout moment tout risque de contamination microbienne et par ribonucléase (RNase)/désoxyribonucléase (DNase) des réactifs. L'utilisation d'embouts de pipette stériles, exempts de RNase/DNase, à usage unique, résistant aux

- aérosols ou à déplacement positif est fortement recommandée. Utilisez un nouvel embout pour chaque échantillon. Changez de gants avant toute manipulation de réactifs et de cartouches.
- Pour éviter toute contamination de l'environnement par des amplicons, abstenez-vous de désassembler la BD MAXTM PCR Cartridge après utilisation. Les joints de la BD MAXTM PCR Cartridge sont conçus pour éviter une contamination.
- 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, fumer ou appliquer des produits cosmétiques 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 / ou bio-dangereux, et manipulez-les conformément aux réglementations nationales applicables en matière de sécurité. Prenez les précautions nécessaires pendant la collecte, le transport, le stockage, le traitement et l'élimination des échantillons.
- Les échantillons et les réactifs doivent être manipulés dans une enceinte de sécurité biologique. Utilisez un équipement de protection individuelle (EPI) conforme aux directives en vigueur pour la manipulation d'échantillons potentiellement infectieux. Éliminez les déchets conformément aux réglementations locales et nationales.
- Une décontamination régulière de l'équipement fréquemment utilisé est recommandée, en particulier des micropipettes et des surfaces de travail.
- Conformément au règlement (CE) n° 1907/2006 (REACH), les kits « VIASURE Real Time PCR Detection Kits » ne nécessitent pas de fiches de données de sécurité (Safety Data Sheets) en raison de leur classification comme non dangereux pour la santé et l'environnement, car ils ne contiennent aucune substance et/ou mélange qui répondent aux critères de classification des dangers disponibles dans le règlement (CE) n° 1272/2008 (CLP) ou qui se trouvent à des concentrations supérieures à la valeur établie dans le règlement mentionné pour leur déclaration.
- Consultez le manuel de l'utilisation du système BD MAX™ pour en savoir plus sur les avertissements, précautions et procédures à respecter.

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. Tout autre type d'échantillon doit être validé par l'utilisateur.

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 ESwabTM et traités le plus tôt possible afin de garantir la qualité du test. Les échantillons doivent être transportés à une température de 2 à 8 °C jusqu'à 24 heures maximum, 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 ou moins. Les échantillons peuvent être conservés à 25 °C jusqu'à 24 heures, de 2 à 8 °C jusqu'à 144 heures (6 jours), congelés à -20 °C jusqu'à 192 heures (8 jours) ou idéalement à -70 °C pour la conservation. Évitez les cycles de congélation-décongélation répétés afin de ne pas dégrader l'échantillon et les acides nucléiques.

Les échantillons de matières fécales doivent être prélevés, transportés et stockés conformément aux directives spécifiques du laboratoire. Pour en savoir plus, veuillez consulter la directive CDC (Centres pour le contrôle et la prévention des maladies) (Directives relatives au prélèvement d'échantillons, site web https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf) et la directive IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). Guide de l'utilisation du laboratoire de microbiologie pour le diagnostic des maladies infectieuses : mise à jour 2018 par la Société américaine des maladies infectieuses et la Société américaine de microbiologie. Clinical Infectious Diseases, 67(6), e1-e94).

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 MAXTM EXKTM 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 ESwabTM: pipettez 200 µl de l'échantillon ESwabTM dans un BD MAXTM EXKTM TNA-2 Sample Buffer Tube (tube de tampon d'échantillon) 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 BD MAXTM System Operation.
- 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 BD MAXTM ExKTM TNA-2 Sample Buffer Tube (tube de tampon d'échantillon) 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 BD MAXTM System Operation.

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 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 MAXTM, sélectionnez l'onglet « Test Editor » (Éditeur de test).
- 2) Cliquez sur la touche « Create » (Créer).
- 3) Sous l'onglet « Basic Information » (Informations de base), 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 MAXTM, 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) Si vous utilisez une version logicielle 5.00 ou supérieure, sélectionnez la configuration suivante sous « Custom Barcodes » (codes-barres personnalisés):
 - a. «Snap-In 2 Barcode» (Code-barres Snap-In 2): 1B (pour le tube réactionnel Vancomycin resistance reaction tube).
 - b. «Snap-In 3 Barcode» (Code-barres Snap-In 3): 11 (pour le Rehydration Buffer Tube).
 - c. «Snap-In 4 Barcode» (Code-barres Snap-In 4): autre tube réactionnel VIASURE (opercule différent) si vous choisissez le format «Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)» (Section 8.3.1) (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec tampon de réhydratation (section 8.3.1)).
- 9) Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez les paramètres suivants : « Channel Settings » (Réglages des canaux), « Gains » et « Threshold » (Seuil) (tableau 3).
 - a. Remarque: l'utilisation de ce produit est possible en association avec un autre test VIASURE pour BD MAXTM, 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

Tabelau 3. PCR settings (Réglages PCR).

Remarque: Il est recommandé de définir les valeurs seuils minimales indiquées ci-dessus comme point de départ pour chaque canal, mais les réglages finaux doivent être définis par l'utilisateur final lors de l'interprétation des résultats afin de garantir que les seuils se situent dans la phase exponentielle des courbes de fluorescence et au-dessus de tout signal de fond. La valeur seuil peut varier selon les instruments en raison des différentes intensités de signal.

10) Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez également les paramètres « Spectral Cross Talk » (tableau 4) suivants :

		False Rec	False Receiving Channel (Canal de fausse réception)						
	Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715			
	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0			
Excitation	530/565	0.0	-	0.0	0.0	0.0			
Channel (Canal	585/630	0.0	0.0	1		0.0			
d'excitation)	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0			
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-			

Tabelau 4. Paramètres "Spectral cross-talk" (crosstalk spectraux).

11) Sous l'onglet « Test Steps » (Étapes de test), saisir le protocole PCR (tableau 5).

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)	2-	45	10	95°C	-
(Dénaturation et appariement/extension [collecte de données])	Temperatues	43	58	60°C	√

Tableau 5. Protocole PCR.

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

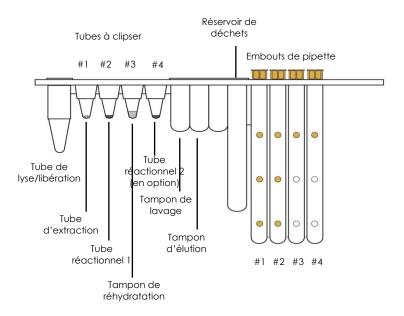
8.3.2. Préparation du portoir BD MAX™

- 1) Prenez une barrette unitaire de réactifs du BD MAXTM EXKTM 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 MAXTM.
- 2) Sortez le nombre nécessaire de tubes d'extraction BD MAXTM ExKTM 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.
- 3) Déterminez et séparez le nombre approprié de *Vancomycin resistance* reaction tubes (opercule 1B) et clipsez-les dans leur position sur la barrette (clip position 2, code couleur vert sur le portoir voir figure 1).
 - a. 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.
 Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve entièrement au fond du tube.
 - i. 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 11) 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. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve entièrement au fond du tube.

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



8.3.3. Préparation de l'instrument BD MAX™

- 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 » (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/code-barres du «Sample Buffer Tube» (tube de tampon d'échantillon) BD MAXTM ExKTM TNA-2 dans la fenêtre «Sample Tube» (Tube d'échantillon) de la «Work List» (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 » (accession) de la « Work List » (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 MAXTM.

- 7) Chargez le(s) portoir(s) dans le système BD MAXTM (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 MAXTM PCR Cartridge(s) dans le système BD MAXTM.
- 9) Fermez la porte du système BD MAXTM.
- 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 MAXTM.

L'analyse des données est effectuée par le logiciel BD MAXTM selon les instructions du fabricant. Le logiciel BD MAXTM 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 3). 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 6.

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 vanA (475/520)	Gène vanB (585/630)	Contrôle interne (530/565)	Interprétation
+	+	+/-1	ADN du vanA et vanB gènes détecté ¹
+	-	+/-1	ADN du vanA géne détecté, ADN du vanB gène non détecté ¹
-	+	+/-1	ADN du vanB géne détecté, ADN du vanA gène non détecté 1
-	-	+2	ADN du vanA et vanB gènes non détecté ²
-	-	-2	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 ² .
IND	IND	IND	Résultat de test indéterminé (IND, Indeterminate assay result) en raison d'une défaillance du système BD MAXIM. 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 6. Interprétation de l'échantillon.

- +: l'amplification a eu lieu
- -: l'amplification n'a pase u lieu

1 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 Cl n'est pas nécessaire.

2 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.

REPETIR PROCEDIMIENTO DEL TEST

Si le résultat reste ambigu, il est recommandé de revoir le mode d'emploi, le processus d'extraction mis en œuvre par l'utilisateur, de vérifier la bonne exécution de chaque étape du RT-qPCR et de revoir les paramètres, et enfin, de vérifier la forme sigmoïde de la courbe et l'intensité de la fluorescence.

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 MAXTM 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 périanaux et/ou rectaux, prélevés dans un milieu de transport ESwab™, et des colonies mises en suspension.
- Pour une bonne exécution du test, le produit lyophilisé doit se trouver au fond du tube et ne pas adhérer à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve entièrement au fond du tube.
- Une apparence du mélange réactionnel au format stabilisé, se trouvant normalement au fond du tube, différente de celle habituelle (sans forme conique, inhomogène, de taille plus petite/plus grande et/ou de couleur autre que blanchâtre) n'altère pas la fonctionnalité du test.
- La qualité du test dépend de la qualité des échantillons ; l'acide nucléique doit être extrait de manière correcte des écouvillons périanaux et/ou rectaux et des colonies.
- Ce test est un test qualitatif. En tant que tel, il ne fournit pas de valeurs quantitatives ni n'indique le nombre d'organismes présents.
- 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 faux négatifs peuvent être le fait de plusieurs facteurs et de leurs combinaisons, notamment :
 - Des méthodes de prélèvement, de transport, de stockage et/ou de manipulation des échantillons inappropriées.
 - o Des procédures de traitement inappropriées (y compris l'extraction d'ADN).
 - o La dégradation de l'ADN durant l'expédition, le stockage et/ou le traitement de l'échantillon.
 - o Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent affecter la détection de variants nouveaux ou inconnus du gène vanA et/ou du gène vanB.
 - Une charge d'organismes résistants à la vancomycine dans l'échantillon en dessous de la limite de détection pour le test.
 - o La présence d'inhibiteurs de RT-qPCR ou d'autres types de substances interférentes.
 - o Le non-respect des consignes d'utilisation et de la procédure de test.
- Un signal CI négatif n'exclut pas la présence de l'ADN du gène vanA et/ou vanB dans un échantillon clinique.
- Un résultat de test positif ne traduit pas nécessairement la présence d'organismes résistant à la vancomycine viables et n'implique pas que ceux-ci soient infectieux ou soient les agents responsables des symptômes cliniques. Toutefois, un résultat positif indique la présence de séquences cibles de résistance à la vancomycine.
- Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par un organisme résistant à la vancomycine et ne doivent pas être utilisés comme seule base pour le traitement ou d'autres décisions de prise en charge du patient.
- 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 d'échantillons cliniques (écouvillons rectaux) provenant de patients soupçonnés de présenter une infection VRE. Les résultats étaient les suivants :

	Site	Type d'échantillon	Flux de travail	Cible
	Clinical Microbiology, Centre for Infectious Diseases and			Gène vanA
1	Microbiology Laboratory services, NSW Health	Écouvillon rectal	BD MAX TM ExK TM TNA-2 + BD MAX TM System	Gène vanB
	Pathology, Westmead Hospital (Sydney, Australie)			Gènes vanA + vanB

Tableau 7. Site, type d'échantillon, flux de travail et cible.

Les valeurs positives et négatives vraies, valeurs positives et négatives fausses, valeurs de sensibilité et de spécificité pour VIASURE VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit ont été calculées par rapport à chaque test comparateur, comme indiqué dans le tableau suivant :

Site	Test comparateur	Cible	TP	TN	FP	FN	Sensibilité	Spécificité
		VanA	65	151	0	0	100 % (93 %– 100 %)	100 % (96 %– 100 %)
1	In-house PCR VRE (Westmead – WMD)	VanB	36	179	1	0	100 % (87 %- 100 %)	99 % (96 %– 100 %)
		VanA+VanB 17 199 0 0 100 % (97 100 %)		100 % (97 %- 100 %)	100 % (97 %– 100 %)			

Tableau 8. Valeurs positives (TP) et négatives (TN) vraies, valeurs positives (FP) et négatives (FN) fausses, valeurs de sensibilité et de spécificité pour VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

Les résultats montrent une concordance élevée pour la détection des gènes vanA et vanB avec le VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit.

Le taux d'échec de contrôle du traitement de l'échantillon a également été calculé. Le nombre initial de réactions non résolues (UNR, unresolved result) était de 3 (taux UNR initial : 1,39 %). Le nombre de UNR après répétition était de 0 (taux UNR final : 0,00 %).

Afin d'étudier la compatibilité de VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit adapté au BD MAXTM avec d'autres échantillons de matrices différentes, une évaluation a été réalisée visant à vérifier la détection de suspensions de colonies d'entérocoques résistants à la vancomycine.

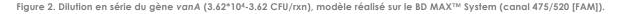
Différentes suspensions de colonies ont été préparées avec l'ajout de deux colonies d'une culture déterminée dans 500 µl d'eau exempte de nucléase. Les souches utilisées pour cette évaluation étaient les suivantes : CECT 5253 Enterococcus faecium vanA, CECT 8120 Enterococcus faecalis vanB, NCTC 12201 Enterococcus faecalis vanA et NCTC 13632 Enterococcus faecalis vanA. Un volume de 10 µl de chaque colonie mise en suspension a été ajouté directement au tube de tampon d'échantillon. Cette évaluation a été réalisée selon le schéma d'essai suivant : BD MAXTM EXKTM TNA-2 + BD MAXTM System.

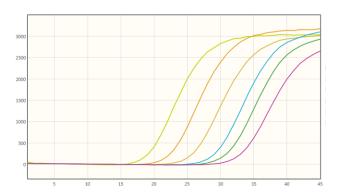
Les résultats obtenus ont montré que les suspensions de colonies de CECT 5253, NCTC 12220 et NCTC 13632 étaient positives pour le gène vanA et que la suspension de CECT 8120 était positive pour le gène vanB.

Ces résultats montrent que le VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit peut efficacement détecter les gènes vanA et vanB dans des suspensions de colonies.

12.2. Sensibilité analytique

Le VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection KIT a une limite de détection \geq 4 unités formant colonies par réaction (CFU/rxn) pour vanA et \geq 10 unités formant colonies par réaction (CFU/rxn) pour vanB (figures 2 et 3) avec un taux positif \geq 95 % sur des écouvillons périanaux et rectaux.





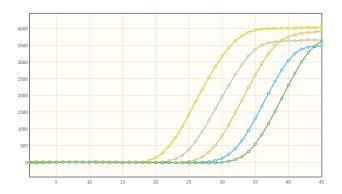


Figure 3. Dilution en série du gène vanB (5.65*10⁴-9.98 CFU/rxn), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 585/630 [ROX]).

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	-	Enterococcus durans	-	Isolat de Klebsiella pneumonia producteur de TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) et KPC-2	-			
Aeromonas caviae	-	Enterococcus casseliflavus génotype vanC	-	Listeria monocytogenes	-			
Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila	-	Enterococcus casseliflavus génotype vanC2	-	Norovirus GI et GII	-			
Arcobacter butzleri	-	Enterococcus faecalis	-	Proteus vulgaris	-			
Astrovirus génotypes I-VIII	-	Enterococcus faecalis génotype vanA	-/+	Pseudomonas aeruginosa	-			
Bacteroides fragilis	-	Enterococcus faecalis génotype vanB	-/+	Rotavirus A	-			
Blastocystis hominis	-	Enterococcus faecium	-	Salmonella bongori	-			
Campylobacter coli	-	Enterococcus faecium génotype vanA	+/-	Salmonella enteritidis	-			
Campylobacter fetus	-	Enterococcus faecium génotype vanB	-/+	Salmonella gallinarum	-			
Campylobacter hyointestinalis	-	Enterococcus gallinarum génotypes vanB et vanC	-/+	Salmonella paratyphi A	-			
Campylobacter jejuni subsp. jejuni	-	Enterococcus gallinarum génotype vanC	-	Salmonella paratyphi B	-			
Campylobacter lari	-	Enterococcus gallinarum génotype vanC1	-	Salmonella pullorum	-			
Campylobacter upsaliensis	-	Enterococcus hirae	-	Salmonella typhi	-			
Candida albicans	-	Escherichia coli entérohémorragique	-	Salmonella typhimurium	-			
Isolat de Citrobacter braakii producteur de VIM-1	-	Escherichia coli entéroinvasif	-	Sapovirus	-			
Citrobacter freundii	-	Escherichia coli entéropathogénique	-	Serratia liquefaciens	-			
Isolat de Citrobacter freundii- complex producteur de KPC-3 et VIM-4	-	Escherichia coli entérotoxigénique	-	Isolat de Serratia marcescens producteur de OXA-48	-			
Clostridium difficile	-	Isolat d'Escherichia coli producteur de OXA-244	-	Shigella dysenteriae	-			
Clostridium difficile 027	-	Isolat d'Escherichia coli producteur de TEM-1 (non-ESBL) et IMP-1	-	Shigella flexneri	-			
Clostridium perfringens		Giardia intestinalis	-	Staphylococcus aureus subsp.	-			

	1		1		1
				aureus	
Cryptosporidium parvum/hominis	-	Helicobacter cinaedi	1	Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (mecC)	ı
Dientamoeba fragilis	-	Helicobacter heilmannii	ı	Souche Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM) N315	ı
Entamoeba dispar	-	Helicobacter hepaticus	-	Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM) ST398	-
Entamoeba histolytica	-	Helicobacter pylori	-	Souche Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM) (oxa ^R , PVL-positive, spa type t310)	•
Isolant d' <i>Enterobacter cloacae</i> producteur de SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL)et OXA-48	-	Helicobacter pylori résistant à la clarithromycine (23\$ rDNA A2146G)	-	Vibrio parahaemolyticus	-
Isolat d' <i>Enterobacter cloacae</i> producteur de TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) et NDM-1	-	Helicobacter pylori résistant à la clarithromycine (23S rDNA A2147G)	1	Yersinia enterocolitica O:3	ı
Isolat d'Enterobacter cloacae complex producteur de NDM-7	-	Klebsiella oxytoca	1	Yersinia enterocolitica O:9	í
Enterococcus avium génotype vanA	+/-	Isolat de Klebsiella pneumonia producteur de SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 et OXA-48	-		

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

12.4. Reactividad Réactivité analytique

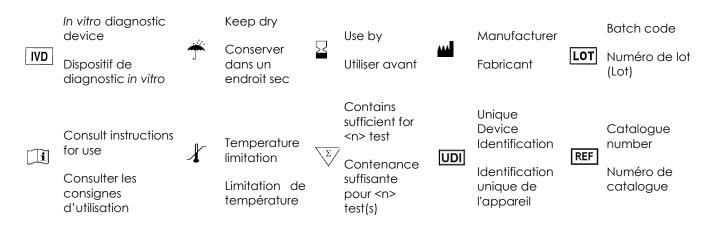
La réactivité de VIASURE Vancomycin resistance Real Time PCR Detection Kit pour le gène vanA a été évaluée par rapport à l'ADN extrait de souches d'Enterococcus avium génotype vanA, d'Enterococcus faecalis génotype vanA (NCTC 13632, NCTC 12201) et d'Enterococcus faecium génotype vanA (LMG16165, IOWA 1, VZA1, ATCC 700221, NCTC 12202), montrant des résultats positifs.

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

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 (CDC). Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) in Healthcare Settings. Available from: https://www.cdc.gov/hai/organisms/vre/vre.html#:~:text=CDC%20works%20with%20healthcare%20facilities,high%20numbers%20of%20VRE%20infections Accessed January 2021.
- 5. T.Nomura et al. New colony multiplex PCR assays for the detection and discrimination of vancomycin-resistant enterococcal species. *Journal of Microbiological Methods* 2018; 69-72.

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



Trademarks

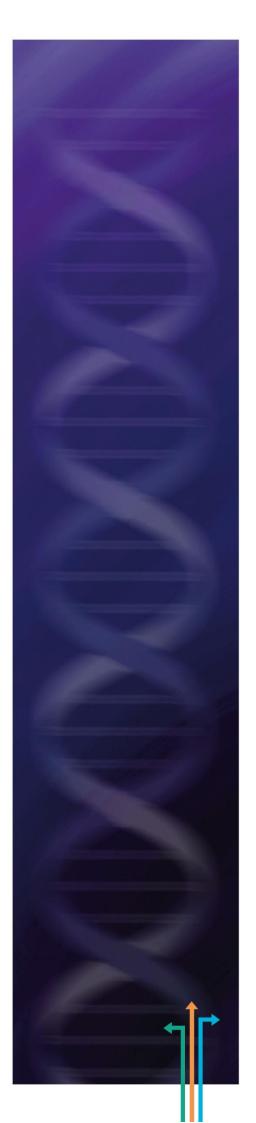
Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

All other trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Change Control / Contrôle des modifications						
Version No. / Version nº Version No. / Version nº						
00	Unification of all instructions for use associated with the different catalogue references in a single format / Unification de toutes les notices d'utilisation associées aux différentes références catalogue dans un format unique.	21/06/2021				

Table A 2. Control change table / Tableau de contrôle des modifications.

Revision: 21st June 2021.



VIASURE

CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, N°1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
Tel. (+34) 976 520 354
Fax (+34) 976 106 268
certest@certest.es | viasure@certest.es
www.certest.es

One step ahead

