



**BD GeneOhm™ Lysis Kit**  
**Trousse de lyse BD GeneOhm™**  
**BD GeneOhm™-Lyseatz**  
**Equipo BD GeneOhm™ *Lysis***  
**Kit di lisi BD GeneOhm™**



**REF 441243**

**IVD**

## Table of Contents / Table des matières / Inhaltstabelle / Índice / Indice

<b>English</b> .....	<b>3-6</b>
Intended use .....	3
Reagents.....	3
Precautions .....	3
Materials provided.....	3
Storage, handling and stability .....	3
Materials required but not provided.....	4
Instructions for use.....	4
A- Specimen preparation for lysis .....	4
B- Concentration Method .....	5
C- Dilution Method .....	5
D- Washing Method.....	5
E- Lysis Method .....	5
Results.....	6
<b>Français</b> .....	<b>7-10</b>
Indication.....	7
Réactifs.....	7
Précautions.....	7
Matériel Fourni.....	7
Entreposage, manutention et stabilité.....	7
Matériel requis mais non fourni.....	8
Mode d'emploi.....	8
A- Préparation des échantillons pour la lyse .....	8
B- Méthode de concentration .....	9
C- Méthode de dilution .....	9
D- Méthode de lavage.....	9
E- Méthode de lyse .....	9
Résultats.....	10
<b>Deutsch</b> .....	<b>11-14</b>
Vorgesehene Anwendung.....	11
Reagenzien.....	11
Vorsichtsmassnahmen.....	11
Gelieferte Materialien.....	11
Lagerung, Handhabung und Stabilität.....	12
Materialien, welche benötigt, jedoch nicht mitgeliefert werden .....	12
Gebrauchsanweisungen.....	12
A- Probevorbereitung für Lyse .....	12
B- Konzentrierungs-Methode .....	13
C- Verdünnungsmethode .....	13
D- Waschmethode .....	13
E- Lysemethode .....	14
Ergebnisse .....	14
<b>Español</b> .....	<b>15-18</b>
Indicaciones de uso .....	15
Reactivos .....	15
Precauciones .....	15
Material provisto.....	15
Conservación, manipulación y estabilidad .....	15
Material necesario pero no suministrado .....	16
Modo de empleo .....	16
A- Preparación de muestras para lisis.....	16
B- Método de concentración .....	17
C- Método de dilución .....	17
D- Método de lavado.....	17
E- Método de lisis.....	17
Resultados .....	18
<b>Italiano</b> .....	<b>19-22</b>
Uso previsto .....	19
Reagenti.....	19
Precauzioni .....	19
Materiali forniti.....	19
Conservazione, trattamento e stabilità .....	19
Materiali necessari, ma non forniti .....	20
Istruzioni per l'uso .....	20
A- Preparazione del campione per la lisi.....	20
B- Metodo di concentrazione.....	21
C- Metodo di diluizione.....	21
D- Metodo di lavaggio .....	21
E- Metodo di lisi.....	21
Risultati .....	22
<b>References / Références / Referenzen / Referencias / Riferimenti</b> .....	<b>23</b>
<b>Index of symbols / Table des symboles / Symbolindex / Índice de símbolos / Indice dei simboli</b> .....	<b>24</b>

## English

### Intended use

BD GeneOhm™ Lysis kit is for the rapid lysis of cells and spores from different sample types.

### Reagents

#### BD GeneOhm™ Lysis Kit

**100 reactions**

#### *Sample Buffer*

**120 X 1 mL**

Tris-EDTA buffer

#### *Lysis tube*

**100 tubes**

Glass beads

### Precautions

- Do not use the kit if the outer carton safety seal is broken.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or torn upon arrival.
- Close protective pouches with the zip seal after each use.
- Do not use the reagents after their expiration date.
- Do not interchange caps among reagents as contamination may occur and compromise test results.
- The use of sterile disposable filter-blocked or positive displacement pipettor tips is recommended.
- Use a new tip for each sample or reagent.
- Always handle specimens as if infectious in accordance with safe laboratory procedures such as those described in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>1</sup> and in the CLSI Document M29<sup>2</sup>.
- Wear protective clothing and disposable gloves while handling kit reagents. Wash hands thoroughly after use.
- Do not pipet by mouth.
- Do not smoke, drink, or eat in areas where specimens are being handled.
- Dispose of unused reagents and waste in accordance with country, federal, provincial, state and local regulations.

### Materials provided

- Sample Buffer
- Lysis tube

### Storage, handling and stability

Kit Component		Sample Buffer (blue cap)	Lysis Tube (yellow cap)
Sealed pouch	Temperature	2-25 °C	2-25 °C
	Stability	Expiration date	Expiration date
Opened pouch	Temperature	2-25 °C	2-25 °C
	Stability	2 months <sup>1</sup>	Expiration date

<sup>1</sup> Provided that the pouch is properly closed with the zip seal after each use.

## Materials required but not provided

- **Vortex** Genie 2 (Fisher) with 1.5 mL microtube holder or equivalent; for processing multiple samples, adapter with multiple holding sites can be used
- **Micropipettors** (accurate range between 10-100 µL and 100-1000 µL)
- **Sterile** filter-blocked or positive displacement **micropipettor tips**
- **Sterile transfer pipets** (optional)
- **Sterile tubes** (optional)
- **Sterile Saline (0.85% NaCl)** (optional)
- **Scissors** (optional)
- **Gauzes** (optional)
- Disposable **gloves**
- **Microcentrifuge** for high (must reach 14 000 x g) (optional) and low speed centrifugation
- **Dry heating block** for 1.5 mL tubes or water bath
- Ice or **cooling block** for 1.5 mL tubes
- Stopwatch or **timer**

## Instructions for use

**Note:** One Lysis tube (**yellow cap**) and at least one Sample Buffer tube (**blue cap**) are required for each sample to be prepared depending on the procedure. Remove the required number of tubes from their protective pouch, and close the pouches with the zip seal.

(Preparation time approx. 15 min)

### A- Specimen preparation for lysis

#### 1) The following procedure is suggested for isolated colonies:

- i. Resuspend isolated colonies in sterile saline (0.85% NaCl) to a turbidity of 0.5 McFarland.
- ii. Proceed with point C if specimen dilution is needed. If not, proceed with point D.

#### 2) The following procedure is suggested for sample collected on a swab:

- i. Place the collection device (swab) in a Sample Buffer tube (blue cap).

Identify the Sample Buffer tube on the cap and/or the tube label.

- ii. Break the swab stem and close the tube tightly.

Hold the swab by the stem near the rim of the tube (use gauze to minimize risks of contamination). Lift the swab a few millimeters from the bottom and push it against the edge of the tube to break it. Alternative method: use clean scissors to cut the stem. Make sure the cap will close tightly.

- iii. Vortex at high speed for one minute.

Time may vary with the type of sample. For processing multiple samples, an adapter with multiple holding sites can be used.

- iv. Proceed with point B to concentrate the specimen. Proceed with point C to dilute the specimen.
- v. Proceed with point E (Lysis Method) if step iv is not required.

#### 3) The following procedure is suggested for other types of sample:

- i. Proceed with point B for specimen concentration, if needed.
- ii. Proceed with point C for specimen dilution, if needed.
- iii. Proceed with point D for specimen washing, if needed.
- iv. Proceed directly with point E (Lysis Method) if the type of sample requires no treatment prior to lysis.

**B- Concentration Method**

- 1) **Transfer** a maximum of 1000 µL of sample to the Lysis tube, **close tightly** and **centrifuge**, at high speed (**between 14 000 x g and 21 000 x g**) for **5 minutes** at room temperature.
- 2) **Remove the supernatant and discard it.**  
Use a sterile transfer pipet; take care not to touch the pellet. Use a new transfer pipet for each sample.
- 3) **If necessary, repeat steps 1 and 2 as many times as needed. If not, proceed with step 4.**
- 4) **Add 50 µL to 100 µL of sample buffer to the Lysis tube; close tightly. If a washing step is necessary, proceed with point D.**
- 5) **Continue with step 2 of the Lysis Method (E).**

**C- Dilution Method**

- 1) **Use the sample buffer to dilute a concentrated sample.**
- 2) **Continue with Step 1 of the Lysis Method (E).**

**D- Washing Method**

- 1) **Centrifuge** the Lysis tube containing a maximum of 1000 µL of sample, at high speed (**between 14 000 x g and 21 000 x g**) for **5 minutes** at room temperature.
- 2) **Remove the supernatant and discard it.**  
Use a sterile transfer pipet; take care not to touch the pellet. Use a new transfer pipet for each sample.
- 3) **Add 50 µL to 100 µL of sample buffer to the lysis tube; close tightly.**  
Use a new pipettor tip for each sample.
- 4) **Repeat steps 1 to 3 as many times as needed.**
- 5) **Continue with step 2 of the Lysis Method (E).**

**E- Lysis Method**

- 1) **Add 50 µL to 100 µL of sample to the Lysis tube (yellow cap); close tightly.**  
Use appropriate micropipettor and a new pipettor tip for each sample. Identify the Lysis tube on the cap and/or the tube label. Do not add more than 100 µL to the Lysis tube.
- 2) **Vortex at high speed for 5 minutes.**  
Time may vary with the type of sample to be lysed. For processing multiple samples, an adapter with multiple holding sites can be used.
- 3) **Centrifuge the Lysis tube at low speed for 2 to 5 seconds, to bring the content at the bottom of the tube.**
- 4) **Heat at 95 ± 2 °C for two (2) minutes.**  
Use a dry heating block or a water bath.
- 5) **Keep the Lysis tube on ice or on a cooling block.**

**Notes:**

- 1- **Dilution of lysate:** To dilute a lysate, add the appropriate volume of sample buffer to the Lysis tube and store on ice or on a cooling block.
- 2- **Storage of lysate:** The lysate could be frozen at -20 ± 5 °C for later use, if necessary. Freeze-thaw cycle may also eliminate PCR inhibitory substances.

## Results

Table 1. Expected yields

Species	Type of Sample	Amount (CFU <sup>1</sup> /mL)	Lysis efficiency (%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Vaginal/anal swab	Between 10 <sup>5</sup> and 10 <sup>6</sup>	98.8
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacterial suspension		>99
<i>Bacillus anthracis</i> (vegetative cells)	Nasal swab		>99
<i>Bacillus anthracis</i> (Spores)	Silica powder (0.24 mg)		>99
<i>Bacillus subtilis</i> (Spores)	Spore suspension		98.8

<sup>1</sup> CFU : Colony Forming Unit

Lysis achieved with the BD GeneOhm™ Lysis kit results in the release of intracellular components as demonstrated by the amplification of genomic nucleic acids present in resulting lysates<sup>3, 4, 5, 6, 7, 8, 9</sup>.

Table 2. CFU detected by PCR reaction

Species	Type of sample	Calculation				
		Initial Concentration	Volume added to the Lysis tube (µL)	Dilution of lysate	Volume added to reaction tube (µL)	Final concentration
<i>S. saprophyticus</i> <sup>3</sup>	<i>Urine</i>	1.4x10 <sup>3</sup> CFU/mL	50	N/Ap	1	≤ 1.4 CFU/rx
<i>C. difficile</i> <sup>4</sup>	<i>Feces</i>	10 <sup>7</sup> CFU/g of feces	75 (liquid stool)	N/Ap	1.5	10 <sup>4</sup> CFU/g of feces
<i>M. smegmatis</i>	<i>Suspension</i>	2.4 x10 <sup>5</sup> CFU/mL	100	1/2500	1	9.6 CFU/rx
<i>S. epidermidis</i>	<i>Suspension</i>	2.4 x10 <sup>8</sup> CFU/mL	100	1/10000	1	24 CFU/rx
<i>E. coli</i> <sup>8</sup>	<i>Feces</i>	10 <sup>8</sup> CFU/g of feces	100 (liquid stool)	N/Ap	1.5	10 <sup>5</sup> CFU/g of feces
<i>E. coli</i>	<i>Suspension</i>	10 <sup>8</sup> CFU/mL	100	1/100000	1	1 CFU/rx
<i>E. faecium</i>	<i>Suspension</i>	8 x10 <sup>8</sup> CFU/mL	100	1/100000	1	≤ 8 CFU/rx
<i>C. albicans</i>	<i>Suspension</i>	10 <sup>8</sup> CFU/mL	10	1/10000	1	≤ 10 CFU/rx

## Français

### Indication

La trousse « BD GeneOhm<sup>TM</sup> Lysis kit » est conçue pour la lyse rapide de cellules et de spores provenant de différents types d'échantillons.

### Réactifs

<b>Trousse « BD GeneOhm<sup>TM</sup> Lysis Kit »</b>	<b>100 réactions</b>
<b>Tampon d'échantillon (Sample Buffer)</b>	<b>120 X 1 mL</b>
Tampon Tris-EDTA	
<b>Tube de lyse (Lysis tube)</b>	<b>100 tubes</b>
Billes de verre	

### Précautions

- Ne pas utiliser la trousse si le sceau de sécurité sur la boîte extérieure a été brisé.
- Ne pas utiliser les réactifs si la pochette de protection est ouverte ou endommagée lors de sa réception.
- Refermer les pochettes protectrices au moyen de la fermeture à glissière après chaque emploi.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ne pas échanger les capuchons des réactifs entre eux puisqu'ils peuvent être contaminés et fausser les résultats du test.
- Il est recommandé d'utiliser des micropipettes munies d'embouts à filtre à déplacement direct, stériles, jetables.
- Utiliser un nouvel embout pour chaque échantillon ou réactif.
- Toujours manipuler les échantillons comme s'ils étaient infectieux et appliquer les précautions d'usage telles que décrites dans *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>1</sup> et dans le document M29 du CLSI<sup>2</sup>.
- Porter des vêtements de protection et des gants jetables pour la manipulation des réactifs. Se laver soigneusement les mains après utilisation.
- Ne pas pipeter avec la bouche.
- Ne pas fumer, boire ou manger dans les zones de manipulation des échantillons et des réactifs.
- Jeter les réactifs non utilisés et les déchets conformément à la réglementation nationale, fédérale, provinciale ou locale.

### Matériel Fourni

- Tampon d'échantillon (*Sample Buffer*)
- Tube de lyse (*Lysis tube*)

### Entreposage, manutention et stabilité

Composante de la trousse		<i>Sample buffer</i> (capuchon <b>bleu</b> )	<i>Lysis tube</i> (capuchon <b>jaune</b> )
<b>Pochette scellée</b>	<b>Température</b>	2-25 °C	2-25 °C
	<b>Stabilité</b>	Date de péremption	Date de péremption
<b>Pochette ouverte</b>	<b>Température</b>	2-25 °C	2-25 °C
	<b>Stabilité</b>	2 mois <sup>1</sup>	Date de péremption

<sup>1</sup> À condition que la pochette soit bien fermée avec la fermeture à glissière après chaque utilisation.

## Matériel requis mais non fourni

- **Vortex** Genie 2 (Fisher) muni d'un portoir pour microtubes de 1,5 mL ou matériel équivalent; pour le traitement de plusieurs échantillons, un adaptateur à positions multiples peut être utilisé
- **Micropipettes** (plage de précision, 10-100 µL et 100-1000 µL)
- **Embouts** à filtre ou à déplacement direct, **stériles**
- **Pipettes de transfert stériles** (facultatif)
- **Tubes stériles** (facultatif)
- **Solution saline stérile (NaCl 0,85%)** (facultatif)
- **Ciseaux** (facultatif)
- **Gazes** (facultatif)
- **Gants jetables**
- **Microcentrifugeuse** à haute (doit atteindre 14 000 x g) (facultatif) et faible vitesse
- **Bloc chauffant à sec** pour tubes de 1,5 mL ou bain-marie
- **Glace ou bloc réfrigérant** pour tubes de 1,5 mL
- **Chronomètre** ou minuterie

## Mode d'emploi

**Note:** Un *Lysis tube* (tube de lyse, **capuchon jaune**) et **au moins un** tube de *Sample Buffer* (tampon d'échantillon, **capuchon bleu**) **sont requis pour chaque échantillon** à préparer, selon la procédure. Retirer le nombre nécessaire de tubes de leurs pochettes de protection et refermer avec la fermeture éclair.

(Temps de préparation approximatif = 15 min.)

### A- Préparation des échantillons pour la lyse

#### 1) Cette procédure est suggérée pour des colonies isolées:

- i. **Resuspendre les colonies isolées dans une solution saline stérile (NaCl 0,85%) jusqu'à une turbidité de 0,5 McFarland.**
- ii. **Passer au point C si une dilution de l'échantillon est nécessaire. Dans le cas contraire, passer au point D.**

#### 2) Cette procédure est suggérée pour les échantillons prélevés à l'aide d'un écouvillon:

- i. **Placer l'écouvillon dans un tube de tampon d'échantillon (capuchon bleu).**

Identifier le tube sur le capuchon et/ou sur l'étiquette du tube.

- ii. **Casser la tige de l'écouvillon et bien refermer le tube.**

Tenir la tige de l'écouvillon près du bord du tube (utiliser une gaze pour minimiser les risques potentiels de contamination). Soulever l'écouvillon de quelques millimètres (mm) du fond du tube et casser la tige contre la paroi du tube. Méthode alternative : utiliser des ciseaux propres pour couper la tige. S'assurer que le capuchon se refermera complètement.

- iii. **Vortexer à haute vitesse pendant 1 minute.**

La durée peut varier selon le type d'échantillon. Pour le traitement de plusieurs échantillons, un adaptateur à positions multiples peut être utilisé.

- iv. **Passer au point B pour la concentration de l'échantillon. Passer au point C pour la dilution de l'échantillon.**
- v. **Passer au point E (Méthode de lyse) si l'étape iv n'est pas nécessaire.**

#### 3) Cette procédure est suggérée pour les autres types d'échantillons:

- i. **Passer au point B pour la concentration de l'échantillon, si nécessaire.**
- ii. **Passer au point C pour la dilution de l'échantillon, si nécessaire.**
- iii. **Passer au point D pour le lavage de l'échantillon, si nécessaire.**
- iv. **Passer directement au point E (Méthode de lyse) si le type d'échantillon ne requiert aucun traitement avant la lyse.**

**B- Méthode de concentration**

- 1) **Transférer** au maximum 1000 µL d'échantillon dans le tube de lyse (**capuchon jaune**) **bien refermer** et **centrifuger** à haute vitesse (**entre 14 000 x g et 21 000 x g**) pendant **5 minutes** à température ambiante.
- 2) **Retirer le surnageant et le jeter.**  
Utiliser une pipette de transfert stérile pour retirer le surnageant du tube de lyse, en prenant soin de ne pas toucher au culot. Utiliser une nouvelle pipette de transfert pour chaque échantillon.
- 3) **Si nécessaire, répéter les étapes 1 et 2 autant de fois que requis. Sinon, passer à l'étape 4.**
- 4) **Ajouter 50 µL-100 µL de tampon d'échantillon au tube de lyse; bien refermer. Passer au point D pour laver l'échantillon si nécessaire.**
- 5) **Poursuivre avec l'étape 2 de la méthode de lyse (E).**

**C- Méthode de dilution**

- 1) **Utiliser le tampon d'échantillon pour diluer un échantillon concentré.**
- 2) **Poursuivre avec l'étape 1 de la méthode de lyse (E).**

**D- Méthode de lavage**

- 1) **Centrifuger** le tube de lyse contenant au maximum 1000 µL d'échantillon, à haute vitesse (**entre 14 000 x g et 21 000 x g**) pendant **5 minutes** à température ambiante.
- 2) **Retirer le surnageant et le jeter.**  
Utiliser une pipette de transfert stérile pour retirer le surnageant du *Lysis tube*, en prenant soin de ne pas toucher au culot. Utiliser une nouvelle pipette de transfert pour chaque échantillon.
- 3) **Ajouter 50 µL-100 µL de tampon d'échantillon au tube de lyse; bien refermer.**  
Utiliser un nouvel embout pour chaque échantillon.
- 4) **Répéter les étapes 1 à 3 autant de fois que nécessaire.**
- 5) **Poursuivre avec l'étape 2 de la méthode de lyse (E).**

**E- Méthode de lyse**

- 1) **Ajouter 50 µL-100 µL d'échantillon au tube de lyse; bien refermer.**  
Utiliser la micropipette appropriée et un nouvel embout pour chaque échantillon. Identifier le tube de lyse sur le capuchon et/ou sur l'étiquette du tube. Ne pas ajouter plus de 100 µL au tube de lyse.
- 2) **Vortexer à haute vitesse pendant 5 minutes.**  
La durée peut varier selon le type d'échantillon. Pour le traitement de plusieurs échantillons, un adaptateur à positions multiples peut être utilisé.
- 3) **Centrifuger le tube de lyse à faible vitesse pendant 2 à 5 secondes, pour faire descendre le contenu au fond du tube.**
- 4) **Chauffer à 95 ± 2°C pendant deux (2) minutes.**  
Utiliser un bloc chauffant à sec ou un bain-marie.
- 5) **Placer le tube de lyse sur la glace ou sur un bloc réfrigérant.**

- Notes:**
- 1- **Dilution du lysat:** Pour diluer un lysat, ajouter le volume approprié de tampon d'échantillon au tube de lyse et placer sur la glace ou sur un bloc réfrigérant.
  - 2- **Entreposage du lysat :** Le lysat peut être congelé à -20 ± 5 °C pour usage ultérieur, si nécessaire. Un cycle de congélation/décongélation peut éliminer l'effet inhibiteur de certaines substances sur la PCR.

## Résultats

Tableau 1. Rendements attendus

Espèce	Type d'échantillon	Quantité (UFC <sup>1</sup> /mL)	Efficacité de la lyse (%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Écouvillon vaginal/anal	Entre 10 <sup>5</sup> et 10 <sup>6</sup>	98,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	Suspension bactérienne		>99
<i>Bacillus anthracis</i> (cellules végétatives)	Écouvillon nasal		>99
<i>Bacillus anthracis</i> (spores)	Poudre de silice (0,24mg)		>99
<i>Bacillus subtilis</i> (spores)	Suspension de spores		98,8

<sup>1</sup> UFC = unités formatrices de colonies

La lyse réalisée avec la trousse « BD GeneOhm™ Lysis kit » entraîne la libération des composantes intracellulaires tel que démontré par l'amplification des acides nucléiques présents dans les lysats<sup>3, 4, 5, 6, 7, 8, 9</sup>.

Tableau 2. UFC détectées par réaction PCR

Espèce	Type d'échantillon	Calcul				
		Concentration initiale	Volume ajouté au tube de lyse (µL)	Dilution du lysat	Volume ajouté au tube de réaction (µL)	Concentration finale
<i>S. saprophyticus</i> <sup>3</sup>	Urine	1,4x10 <sup>3</sup> UFC/mL	50	N/Ap	1	≤ 1,4 UFC/rx
<i>C. difficile</i> <sup>4</sup>	Fèces	10 <sup>7</sup> UFC/g de fèces	75 (fèces liquides)	N/Ap	1,5	10 <sup>4</sup> UFC/g de fèces
<i>M. smegmatis</i>	Suspension	2,4 x10 <sup>5</sup> UFC/mL	100	1/2500	1	9,6 UFC/rx
<i>S. epidermidis</i>	Suspension	2,4 x10 <sup>8</sup> UFC/mL	100	1/10000	1	24 UFC/rx
<i>E. coli</i> <sup>8</sup>	Fèces	10 <sup>8</sup> UFC/g de fèces	100 (fèces liquides)	N/Ap	1,5	10 <sup>5</sup> UFC/g de fèces
<i>E. coli</i>	Suspension	10 <sup>8</sup> UFC/mL	100	1/100000	1	1 UFC/rx
<i>E. faecium</i>	Suspension	8 x10 <sup>8</sup> UFC/mL	100	1/100000	1	≤ 8 UFC/rx
<i>C. albicans</i>	Suspension	10 <sup>8</sup> UFC/mL	10	1/10000	1	≤ 10 UFC/rx

## Deutsch

### Vorgesehene Anwendung

BD GeneOhm™-Lysesatz zur raschen Lyse von Zellen und Sporen aus verschiedenen Probetypen.

### Reagenzien

<b>BD GeneOhm™-Lysesatz</b>	<b>100 Reaktionen</b>
<b>Probenpuffer (Sample Buffer)</b>	<b>120 X 1 mL</b>
Tris-EDTA-Puffer	
<b>Lyseröhrchen (Lysis tube)</b>	<b>100 Röhrchen</b>
Glasperlen	

### Vorsichtsmassnahmen

- Das Kit nicht verwenden, wenn das Sicherheitssiegel an der äußeren Verpackung gebrochen ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbeutel bei Ankunft geöffnet oder beschädigt ist.
- Schutzbeutel nach jedem Gebrauch mit dem Reissverschlussiegel verschliessen.
- Die Reagenzien nicht nach dem Verfallsdatum anwenden.
- Verschlusskappen nicht unter Reagenzien auswechseln, weil Verunreinigung stattfinden und Testergebnisse gefährden können.
- Der Gebrauch von sterilen Einweg-Pipettenspitzen mit Filterblockierung oder positiver Verdrängung wird empfohlen.
- Für jede Probe oder Reagenz eine neue Spitze anwenden.
- Proben immer als infektiös behandeln, im Einklang mit sicheren Labor-Arbeitsverfahren, wie z.B. in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>1</sup> und im CLSI-Dokument M29<sup>2</sup> beschrieben.
- Bei der Handhabung von Satzreagenzien Schutzkleidung und Einweghandschuhe tragen. Nach dem Gebrauch gründlich die Hände waschen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht an Orten, wo Proben bearbeitet werden, rauchen, trinken oder essen.
- Unverwendete Reagenzien und Abfälle laut Landes-, Bundes-, Provinz-, Staats- und örtlichen Bestimmungen entsorgen.

### Gelieferte Materialien

- Probenpuffer (*Sample Buffer*)
- Lyseröhrchen (*Lysis tube*)

## Lagerung, Handhabung und Stabilität

Satz-Komponent		Sample Buffer (blauer Deckel)	Lysis tube (gelber Deckel)
Versiegelter Beutel	Temperatur	2-25 °C	2-25 °C
	Stabilität	Verfallsdatum	Verfallsdatum
Geöffneter Beutel	Temperatur	2-25 °C	2-25 °C
	Stabilität	2 Monate <sup>1</sup>	Verfallsdatum

<sup>1</sup> Falls der Beutel nach jedem Gebrauch richtig mit dem Reissverschluss verschlossen wird.

## Materialien, welche benötigt, jedoch nicht mitgeliefert werden

- **Vortex** Genie 2 (Fisher) mit 1.5 mL Mikroröhrchen-Halter oder vergleichbarem; Adapter mit mehrfachen Haltestellen kann zur Bearbeitung von mehrfachen Proben angewandt werden
- **Mikropipetten** (Genauigkeitsbereich zwischen 10-100 µL und 100-1000 µL)
- **Sterile Mikropipettenspitzen** mit Filterblockierung oder positiver Verdrängung
- **Sterile Überführungspipetten** (optional)
- **Sterile Röhrchen** (optional)
- **Sterile Salzlösung (0.85% NaCl)** (optional)
- **Scheren** (optional)
- **Gaze** (optional)
- **Einweg-Handschuhe**
- **Mikrozentrifuge** für Zentrifugierung bei hoher (muss 14 000 x g erreichen) (optional) und niedriger Geschwindigkeit
- **Trockener Erhitzungsblock** für 1.5 mL-Röhrchen oder Wasserbad
- Eis oder **Kühlblock** für 1.5 mL-Röhrchen
- Stoppuhr oder **Timer**

## Gebrauchsanweisungen

**Hinweis:** Ein *Lysis tube* (Lyseröhrchen, **gelber Verschluss**) und mindestens ein *Sample Buffer*-Röhrchen (Probenpuffer, **blauer Verschluss**) werden für jede zu bereitende **Probe** benötigt, je nach dem Vorgang. Die benötigte Anzahl von Röhrchen aus ihrem Schutzbeutel herausnehmen und die Beutel mit dem Reissverschluss verschliessen. (Vorbereitungszeit etwa 15 Minuten).

### A- Probepreparierung für Lyse

#### 1) Der folgende Vorgang wird für isolierte Kolonien vorgeschlagen:

- Isolierte Kolonien in steriler Salzlösung (0.85% NaCl) erneut suspendieren, bis zu einer Trübung von 0.5 McFarland.
- Zu Punkt C weitergehen, falls die Probe verdünnt werden muss. Falls nicht, zu Punkt D weitergehen.

#### 2) Der folgende Vorgang wird für eine Probe vorgeschlagen, welche auf einem Tupfer genommen wurde:

- Das Sammelgerät (den Tupfer) in ein Probenpuffer-Röhrchen (blauer Verschluss) geben. Das Probenpuffer-Röhrchen auf dem Verschluss oder dem Röhrchen-Etikett identifizieren.

ii. **Das Tupferstäbchen brechen und das Röhrchen fest verschliessen.**

Den Tupfer am Stab nahe am Röhrchenrand halten (Gaze anwenden, um das Risiko der Verunreinigung auf ein Mindestmass zu halten). Den Tupfer ein paar Millimeter vom Boden abheben und gegen den Rand des Röhrchens biegen, um ihn zu brechen. Alternative Methode: Den Stab mit einer sauberen Schere durchschneiden. Sicherstellen, dass der Verschluss fest zugeht.

iii. **Vortex bei hoher Geschwindigkeit für eine Minute.**

Die Zeit kann je nach der Probe variieren. **Zum Bearbeiten von mehreren Proben** kann man einen Adapter mit mehrfachen Haltestellen anwenden.

iv. **Zu Punkt B gehen, um die Probe zu konzentrieren. Zu Punkt C gehen, um die Probe zu verdünnen.**

v. **Zu Punkt E (Lysemethode) gehen, falls Schritt iv nicht benötigt wird.**

3) **Der folgende Vorgang wird für andere Probearten vorgeschlagen:**

i. **Zu Punkt B gehen, um die Probe zu konzentrieren, falls nötig.**

ii. **Zu Punkt C gehen, um die Probe zu verdünnen, falls nötig.**

iii. **Zu Punkt D gehen, um die Probe zu waschen, falls nötig.**

iv. **Direkt mit Punkt E (Lysemethode) weitermachen, falls die Probeart vor der Lyse keine Behandlung braucht.**

**B- Konzentrierungs-Methode**

1) Maximal 1000 µL von der Probe in das Lyseröhrchen **transferieren, fest zumachen** und bei hoher Geschwindigkeit (**between 14 000 x g und 21 000 x g**) für **5 Minuten** bei Zimmertemperatur **zentrifugieren**.

2) **Den Überstand entfernen und verwerfen.**

Eine sterile Transferpipette anwenden; Sorge tragen, den Niederschlag nicht zu berühren. Für jede Probe eine neue Transferpipette anwenden.

3) **Falls nötig, Schritte 1 und 2 so oft wie nötig wiederholen. Falls nicht, mit Schritt 4 weitermachen.**

4) **50 µL bis 100 µL des Probenpuffers zu dem Lyseröhrchen hinzugeben; fest verschliessen. Falls eine Waschmethode notwendig ist, mit Punkt D weitermachen.**

5) **Mit Schritt 2 der Lysemethode (E) weitermachen.**

**C- Verdünnungsmethode**

1) **Den Probenpuffer anwenden, um eine konzentrierte Probe zu verdünnen.**

2) **Mit Schritt 1 der Lysemethode (E) weitermachen.**

**D- Waschmethode**

1) Das Lyseröhrchen, welches maximal 1000 µL der Probe enthält, bei hoher Geschwindigkeit (**zwischen 14 000 x g und 21 000 x g**) für **5 Minuten** bei Zimmertemperatur **zentrifugieren**.

2) **Den Überstand entfernen und verwerfen.**

Eine sterile Transferpipette anwenden; Sorge tragen, den Niederschlag nicht zu berühren. Für jede Probe eine neue Transferpipette anwenden.

3) **50 µL bis 100 µL des Probenpuffers zu dem Lyseröhrchen hinzugeben; fest verschliessen.**

Für jede Probe eine neue Pipettenspitze anwenden.

4) **Schritte 1 bis 3 so oft, wie benötigt, wiederholen.**

5) **Mit Schritt 2 der Lysemethode (E) weitermachen.**

## E- Lysemethode

### 1) 50 µL bis 100 µL der Probe zu dem Lyseröhrchen (gelber Verschluss) hinzugeben; fest verschliessen.

Für jede Probe die richtige Mikropipette und eine neue Pipettenspitze anwenden. Das Lyseröhrchen auf dem Verschluss und/oder dem Röhrchenetikett identifizieren. Nicht mehr als 100 µL zum Lyseröhrchen hinzugeben.

### 2) Vortex bei hoher Geschwindigkeit für 5 Minuten.

Die Zeit kann mit der lysierten Probe variieren. Um mehrere Proben zu bearbeiten, kann man einen Adapter mit mehrfachen Haltestellen anwenden.

### 3) Das Lyseröhrchen bei niedriger Geschwindigkeit für 2 bis 5 Sekunden zentrifugieren, um den Inhalt zum Boden des Röhrchens zu bringen.

### 4) Bei 95 ± 2 °C für zwei (2) Minuten erhitzen.

Einen trockenen Erhitzungsblock oder ein Wasserbad verwenden.

### 5) Das Lyseröhrchen auf Eis oder auf einem Kühlblock halten.

**Hinweise:** 1- **Verdünnung des Lysats:** Um ein Lysat zu verdünnen, das entsprechende Volumen des Probenpuffers zum Lyseröhrchen hinzugeben und auf Eis oder auf einem Kühlblock aufbewahren.

2- **Aufbewahrung des Lysats:** Das Lysat kann bei -20 ± 5 °C zum späteren Gebrauch gefroren werden, falls nötig. Der Gefrier- und Tauzyklus eliminiert auch eventuell PCR-hemmende Substanzen.

## Ergebnisse

Tabelle 1. Erwarteter Ertrag

Spezies	Probetyp	Menge (KFE <sup>1</sup> /mL)	Lyse-Effizienz (%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Vaginaler/analer Tupfer	Zwischen 10 <sup>5</sup> und 10 <sup>6</sup>	98.8
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bakterielle Suspendierung		>99
<i>Bacillus anthracis</i> (vegetative Zellen)	Nasentupfer		>99
<i>Bacillus anthracis</i> (Sporen)	Silikapulver (0.24mg)		>99
<i>Bacillus subtilis</i> (Sporen)	Sporen-suspendierung		98.8

<sup>1</sup> KFE: Kolonie-formende Einheit

Lyse mit dem BD GeneOhm™-Lysesatz führt zur Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen, wie durch die Verstärkung der genomischen Nukleinsäuren in den resultierenden Lysaten<sup>3,4,5,6,7,8,9</sup> demonstriert wird.

Tabelle 2. CFU, durch PCR-Reaktion festgestellt.

Spezies	Probetyp	Berechnung				
		Anfangs-Konzentration	Zum Lyseröhrchen hinzugegebenes Volumen (µL)	Verdünnung des Lysats	Zum Reaktionsröhrchen hinzugegebenes Volumen (µL)	Endkonzentration
<i>S. saprophyticus</i> <sup>3</sup>	Urin	1.4x10 <sup>3</sup> KFE/mL	50	N/Ap	1	≤ 1.4 KFE/rx
<i>C. difficile</i> <sup>4</sup>	Faeces	10 <sup>7</sup> KFE/g Faeces	75 (flüssiger Stuhl)	N/Ap	1.5	10 <sup>4</sup> KFE/g Faeces
<i>M. smegmatis</i>	Suspendierung	2.4 x10 <sup>5</sup> KFE/mL	100	1/2500	1	9.6 KFE/rx
<i>S. epidermidis</i>	Suspendierung	2.4 x10 <sup>8</sup> KFE/mL	100	1/10000	1	24 KFE/rx
<i>E. coli</i> <sup>8</sup>	Faeces	10 <sup>8</sup> KFE/g Faeces	100 (flüssiger Stuhl)	N/Ap	1.5	10 <sup>5</sup> KFE/g Faeces
<i>E. coli</i>	Suspendierung	10 <sup>8</sup> KFE/mL	100	1/100000	1	1 KFE/rx
<i>E. faecium</i>	Suspendierung	8 x10 <sup>8</sup> KFE/mL	100	1/100000	1	≤ 8 KFE/rx
<i>C. albicans</i>	Suspendierung	10 <sup>8</sup> KFE/mL	10	1/10000	1	≤ 10 KFE/rx

## Español

### Indicaciones de uso

El equipo BD GeneOhm™ Lysis se utiliza para la lisis rápida de células y esporas de distintos tipos de muestras.

### Reactivos

#### Equipo BD GeneOhm™ Lysis

**100 reacciones**

#### *Tampón de muestras (Sample Buffer)*

**120 x 1 mL**

Solución tampón Tris-EDTA

#### *Tubo de lisis (Lysis tube)*

**100 tubos**

Perlas de vidrio

### Precauciones

- No utilizar el kit si el precinto de seguridad de la caja exterior está roto.
- No utilizar los reactivos si las bolsas protectoras están abiertas o desgarradas a su llegada.
- Cierre las bolsas protectoras con el cierre deslizante después de cada uso.
- No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.
- No intercambie tapas entre los reactivos, ya que puede producirse contaminación que altere los resultados de la prueba.
- Se recomienda el uso de puntas de pipeta desechables y estériles de desplazamiento positivo o con filtro.
- Utilice una nueva punta para cada muestra o reactivo.
- Manipule siempre las muestras como si fueran infecciosas, de acuerdo con los procedimientos de seguridad de laboratorio como los descritos en *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>1</sup> y el Documento M29 de CLSI<sup>2</sup>.
- Lleve ropa protectora y guantes desechables cuando manipule los reactivos del equipo. Lávese las manos bien después de su utilización.
- No utilice las pipetas con la boca.
- No fume, beba, o coma en áreas donde se manipulen muestras.
- Deshágase de los reactivos no utilizados y de los desechos de acuerdo con el reglamento del país, federal, provincial, estatal y local.

### Material provisto

- Tampón de muestras (*Sample Buffer*)
- Tubo de lisis (*Lysis tube*)

### Conservación, manipulación y estabilidad

Componente del equipo		<i>Sample Buffer</i> (tapa azul)	<i>Lysis tube</i> (tapa amarilla)
Bolsa cerrada	Temperatura	2-25 °C	2-25 °C
	Estabilidad	Fecha de caducidad	Fecha de caducidad
Bolsa abierta	Temperatura	2-25 °C	2-25 °C
	Estabilidad	2 meses <sup>1</sup>	Fecha de caducidad

<sup>1</sup> Siempre que la bolsa esté bien cerrada con el cierre deslizante después de cada uso.

## Material necesario pero no suministrado

- **Vortex** Genie 2 (Fisher) con portamicrotubo de 1,5 mL o equivalente; para procesar múltiples muestras puede usarse un adaptador con varios lugares de sujeción.
- **Micropipetas** (margen preciso entre 10-100 µL y 100-1000 µL)
- **Puntas de pipeta estériles** de desplazamiento positivo o con filtro.
- **Pipetas de transferencia estériles** (opcional)
- **Tubos estériles** (opcional)
- **Solución salina estéril (0,85% NaCl)** (opcional)
- **Tijeras** (opcional)
- **Gasas** (opcional)
- **Guantes** desechables
- **Microcentrífuga** para centrifugación de alta (debe alcanzar 14 000 x g) (opcional) y baja velocidad
- **Bloque de calor seco** para tubos de 1,5 mL o baño maría
- Hielo o **bloque de enfriamiento** para tubos de 1,5 mL
- **Cronómetro** o minuterero

## Modo de empleo

- **Nota:** Dependiendo del procedimiento se necesitan **un Lysis tube** (tubo de lisis, **tapa amarilla**) y al menos un tubo de *Sample Buffer* (tampón de muestras, **tapa azul**) para preparar **cada muestra**. Saque el número necesario de tubos de su bolsa protectora y cierre las bolsas con el cierre deslizante  
(Tiempo de preparación aproximado: 15 minutos.)

### A- Preparación de muestras para lisis

#### 1) Se sugiere el siguiente procedimiento para colonias aisladas:

- i. **Suspender las colonias aisladas en solución salina estéril (0,85% NaCl) a una turbidez de 0,5 McFarland.**
- ii. **Pase al punto C si se necesita la dilución de la muestra. De lo contrario, pase al punto D.**

#### 2) Se sugiere el siguiente procedimiento para muestras obtenidas con una torunda:

- i. **Coloque el dispositivo de obtención de muestras (torunda) en un tubo de tampón de muestras (tapa azul).**  
Identifique el tubo de tampón de muestras en la tapa y/o la etiqueta del tubo.
- ii. **Rompa el palo de la torunda y cierre el tubo herméticamente.**  
Sujete la torunda por el palo cerca del borde del tubo (utilice gasa para minimizar los riesgos de contaminación). Levante la torunda unos milímetros del fondo del tubo y empújela contra el borde del tubo para romperla. Método alternativo: use tijeras limpias para cortar el palo. Asegúrese de cerrar la tapa herméticamente.
- iii. **Agite con vortex a alta velocidad durante un minuto.**  
El tiempo puede variar dependiendo del tipo de muestra. Para procesar múltiples muestras puede usarse un adaptador con varios lugares de sujeción.
- iv. **Pase al punto B para concentrar la muestra. Pase al punto C para diluir la muestra.**
- v. **Pase al punto E (Método de lisis) si no es necesario el paso iv.**

#### 3) Se sugiere el siguiente procedimiento para otros tipos de muestras:

- i. **Pase al punto B para la concentración de la muestra, si es necesario.**
- ii. **Pase al punto C para la dilución de la muestra, si es necesario.**
- iii. **Pase al punto D para el lavado de la muestra, si es necesario.**
- iv. **Pase directamente al punto E (Método de lisis) si el tipo de muestra no requiere ningún tratamiento antes de la lisis.**

**B- Método de concentración**

- 1) **Transfiera** un máximo de 1000 µL de la muestra al tubo de lisis, **ciérrelo herméticamente** y **centrifúguelo** a alta velocidad (**entre 14 000 x g y 21 000 x g**) durante **5 minutos** a temperatura ambiente.
- 2) **Quite el sobrenadante y deséchelo.**  
Utilice una pipeta de transferencia estéril; tenga cuidado de no tocar el sedimento. Utilice una nueva pipeta de transferencia para cada muestra.
- 3) **Repita los pasos 1 y 2 tantas veces como sea necesario. De lo contrario, continúe con el paso 4.**
- 4) **Añada de 50 µL a 100 µL de tampón de muestras al tubo de lisis; ciérrelo herméticamente. Si es necesario una etapa de lavado, pase al punto D.**
- 5) **Continúe con el paso 2 del Método de lisis (E).**

**C- Método de dilución**

- 1) **Use el tampón de muestras para diluir una muestra concentrada.**
- 2) **Continúe con el paso 1 del Método de lisis (E).**

**D- Método de lavado**

- 1) **Centrifugue** el tubo de lisis, con un máximo de 1000 µL de la muestra, a alta velocidad (**entre 14 000 x g y 21 000 x g**) durante **5 minutos** a temperatura ambiente.
- 2) **Quite el sobrenadante y deséchelo.**  
Utilice una pipeta de transferencia estéril; tenga cuidado de no tocar el sedimento. Utilice una nueva pipeta de transferencia para cada muestra.
- 3) **Añada de 50 µL a 100 µL de tampón de muestras al tubo de lisis; ciérrelo herméticamente.**  
Utilice una punta de pipeta nueva para cada muestra.
- 4) **Repita los pasos 1 a 3 tantas veces como sea necesario.**
- 5) **Continúe con el paso 2 del Método de lisis (E).**

**E- Método de lisis**

- 1) **Añada de 50 µL a 100 µL de la muestra al tubo de lisis (tapa amarilla); ciérrelo herméticamente.**  
Utilice una micropipeta adecuada y una punta de pipeta nueva para cada muestra. Identifique el tubo de lisis en la tapa y/o la etiqueta del tubo. No añada más de 100 µL al tubo de lisis.
- 2) **Agite con vortex a alta velocidad durante 5 minutos.**  
El tiempo puede variar dependiendo del tipo de muestra que vaya a lisarse. Para procesar múltiples muestras puede usarse un adaptador con varios lugares de sujeción.
- 3) **Centrifugue el tubo de lisis a velocidad baja durante 2 a 5 segundos, para que el contenido quede al fondo del tubo.**
- 4) **Caliéntelo a 95 ± 2 °C durante dos (2) minutos.**  
Utilice un bloque de calor seco o un baño maría.
- 5) **Mantenga el tubo de lisis en hielo o en un bloque de enfriamiento.**

- Notas:**
- 1- **Dilución de lisado:** Para diluir un lisado, añada el volumen apropiado de tampón de muestras al tubo de lisis y consérvelo en hielo o en un bloque de enfriamiento.
  - 2- **Conservación de lisado:** El lisado puede congelarse a -20 ± 5 °C para uso posterior, si es necesario. El ciclo de congelación-descongelación puede eliminar también las sustancias inhibitoras de PCR.

## Resultados

Tabla 1. Resultados previstos

Especies	Tipo de muestra	Cantidad (UFC <sup>1</sup> /mL)	Eficiencia de la lisis (%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Vaginal/anal con torunda	Entre 10 <sup>5</sup> y 10 <sup>6</sup>	98,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	Suspensión bacteriana		>99
<i>Bacillus anthracis</i> (células vegetativas)	Nasal con torunda		>99
<i>Bacillus anthracis</i> (Esporas)	Polvo de sílice (0,24mg)		>99
<i>Bacillus subtilis</i> (Esporas)	Suspensión de esporas		98,8

<sup>1</sup> UFC: Unidad formadora de colonia

La lisis obtenida con el equipo *BD GeneOhm™ Lysis Kit* da como resultado la liberación de componentes intracelulares, según demostró la amplificación de ácidos nucleicos genómicos presentes en los lisados resultantes<sup>3, 4, 5, 6, 7, 8, 9</sup>.

Tabla 2. UFC detectada por reacción de PCR.

Especies	Tipo de muestra	Cálculo				
		Concentración inicial	Volumen añadido al tubo de lisis (µL)	Dilución de lisado	Volumen añadido al tubo de reacción (µL)	Concentración final
<i>S. saprophyticus</i> <sup>3</sup>	<b>Orina</b>	1,4x10 <sup>3</sup> UFC/mL	50	N/Ap	1	≤ 1,4 UFC/rx
<i>C. difficile</i> <sup>4</sup>	<b>Heces</b>	10 <sup>7</sup> UFC/g de heces	75 (heces líquidas)	N/Ap	1,5	10 <sup>4</sup> UFC/g de heces
<i>M. smegmatis</i>	<b>Suspensión</b>	2,4 x10 <sup>5</sup> UFC/mL	100	1/2500	1	9,6 UFC/rx
<i>S. epidermidis</i>	<b>Suspensión</b>	2,4 x10 <sup>8</sup> UFC/mL	100	1/10000	1	24 UFC/rx
<i>E. coli</i> <sup>8</sup>	<b>Heces</b>	10 <sup>8</sup> UFC/g de heces	100 (heces líquidas)	N/Ap	1,5	10 <sup>5</sup> UFC/g de heces
<i>E. coli</i>	<b>Suspensión</b>	10 <sup>8</sup> UFC/mL	100	1/100000	1	1 UFC/rx
<i>E. faecium</i>	<b>Suspensión</b>	8 x10 <sup>8</sup> UFC/mL	100	1/100000	1	≤ 8 UFC/rx
<i>C. albicans</i>	<b>Suspensión</b>	10 <sup>8</sup> UFC/mL	10	1/10000	1	≤ 10 UFC/rx

rx = reacción

## Italiano

### Uso previsto

Il kit di lisi BD GeneOhm™ è utilizzato per la lisi rapida di cellule e spore di diversi tipi di campioni.

### Reagenti

<b>Kit di lisi BD GeneOhm™</b>	<b>100 reazioni</b>
<b>Tampone (Sample Buffer)</b>	<b>120 x 1 mL</b>
Soluzione tampone EDTA tris	
<b>Provetta di lisi (Lysis Tube)</b>	<b>100 provette</b>
Perle di vetro	

### Precauzioni

- Non utilizzare il kit se è rotta la chiusura di sicurezza sul contenitore esterno.
- Non utilizzare i reagenti se i sacchetti protettivi sono aperti o danneggiati alla consegna.
- Chiudere le buste protettive con chiusura a cerniera dopo ciascun utilizzo.
- Non utilizzare i reagenti dopo la relativa data di scadenza.
- Non scambiare i tappi tra i reagenti, in quanto esiste la possibilità di contaminazione che comprometterebbe i risultati del test.
- Si consiglia l'utilizzo di puntali per pipettrici sterili monouso con blocco a filtro o a spostamento positivo.
- Utilizzare un nuovo puntale per ciascun campione o reagente.
- Trattare sempre i campioni come infettivi in conformità alle procedure sicure di laboratorio quali ad esempio quelle descritte in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>1</sup> e nel documento CLSI M29<sup>2</sup>.
- Indossare abbigliamento protettivo e guanti monouso quando si trattano reagenti del kit. Lavare a fondo le mani dopo l'uso.
- Non pipettare con la bocca.
- Non fumare, bere né mangiare in aree in cui sono maneggiati i campioni.
- Smaltire i reagenti inutilizzati e i rifiuti in conformità alle normative nazionali, regionali, provinciali e locali.

### Materiali forniti

- Tampone (Sample Buffer)
- Provetta di lisi (Lysis tube)

### Conservazione, trattamento e stabilità

Componenti del kit		Sample Buffer (tappo blu)	Lysis tube (tappo giallo)
Busta sigillata	Temperatura	2-25 °C	2-25 °C
	Stabilità	Data di scadenza	Data di scadenza
Busta aperta	Temperatura	2-25 °C	2-25 °C
	Stabilità	2 mesi <sup>1</sup>	Data di scadenza

<sup>1</sup> Purché la sacca sia correttamente chiusa con la chiusura a cerniera dopo ciascun utilizzo.

## Materiali necessari, ma non forniti

- **Vortice** Genie 2 (Fisher) con supporto per microprovette da 1,5 mL o equivalente; per trattare più campioni, è possibile utilizzare un adattatore con più siti di mantenimento
- **Micropipettatrici** (intervallo accurato 10-100 µL e 100-1000 µL)
- **Puntali per micropipettatrice sterili** con blocco a filtro o a spostamento positivo
- **Pipette di trasferimento sterili** (opzionali)
- **Provette sterili** (opzionali)
- **Soluzione salina sterile (0,85% NaCl)** (opzionale)
- **Forbici** (opzionali)
- **Garze** (opzionali)
- **Guanti monouso**
- **Microcentrifuga** per la centrifuga ad alta (deve raggiungere 14.000 x g) (opzionale) e bassa velocità
- **Blocco di riscaldamento a secco** per provette da 1,5 mL o bagno d'acqua
- Ghiaccio o **blocco di raffreddamento** per provette da 1,5 mL
- Cronometro o **timer**

## Istruzioni per l'uso

**Nota:** Una *Lysis tube* (provetta di lisi, **tappo giallo**) e almeno una provetta di *Sample Buffer* (tampone, **tappo blu**) devono essere preparate per ciascun campione a seconda della procedura. Rimuovere il numero necessario di provette dalle rispettive buste protettive e chiudere le buste con la chiusura a cerniera.

(Tempo di preparazione circa 15 minuti)

### A- Preparazione del campione per la lisi

#### 1) La procedura seguente è suggerita per colonie isolate:

- i. **Colonie isolate risospese in soluzione salina sterile (0,85% NaCl) ad una torbidità di 0,5 McFarland.**
- ii. **Procedere col punto C se è necessaria la diluizione del campione. Altrimenti, procedere col punto D.**

#### 2) La seguente procedura è suggerita per il prelievo di campioni su un tampone:

- i. **Collocare il dispositivo di prelievo (tampone) in una provetta di tampone (tappo blu).**

Identificare la provetta di tampone sull'etichetta del tappo e/o della provetta.

- ii. **Rompere lo stelo del campione e chiudere saldamente la provetta.**

Tenere il tampone per lo stelo in prossimità dell'orlo della provetta (utilizzare garza per ridurre al minimo i rischi di contaminazione). Sollevare il tampone di qualche millimetro dal fondo e spingerlo contro il bordo della provetta per romperlo. Metodo alternativo: utilizzare forbici pulite per tagliare lo stelo. Accertarsi che il tappo si chiuda saldamente.

- iii. **Mescolare con moto vorticoso ad alta velocità per un minuto.**

Il tempo potrebbe variare col tipo di campione. Per trattare più campioni, è possibile utilizzare un adattatore con più siti di mantenimento.

- iv. **Procedere col punto B per concentrare il campione. Procedere col punto C per diluire il campione.**
- v. **Procedere col punto E (metodo di lisi) se il passo iv non è richiesto.**

#### 3) La seguente procedura è suggerita per altri tipi di campioni:

- i. **Procedere col punto B per la concentrazione di campione, se necessario.**
- ii. **Procedere col punto C per la diluizione di campione, se necessario.**
- iii. **Procedere col punto D per il lavaggio di campione, se necessario.**
- iv. **Procedere direttamente col punto E (metodo di lisi) se il tipo di campione non richiede alcun trattamento prima della lisi.**

**B- Metodo di concentrazione**

- 1) **Trasferire** un massimo di 1000 µL di campione alla provetta di lisi, **chiudere saldamente** e **centrifugare**, ad alta velocità (**tra 14.000 x g e 21.000 x g**), per **5 minuti** a temperatura ambiente.
- 2) **Rimuovere il supernatante e scartarlo.**  
Utilizzare una pipetta di trasferimento sterile; prestare attenzione a non toccare la pastiglia. Utilizzare una nuova pipetta di trasferimento per ciascun campione.
- 3) **Se necessario, ripetere i passaggi 1 e 2 per il numero di volte necessario. Altrimenti, procedere col passaggio 4.**
- 4) **Aggiungere da 50 µL a 100 µL di tampone alla provetta di lisi; chiudere saldamente. Se è necessario un passaggio di lavaggio, procedere col punto D.**
- 5) **Continuare col passaggio 2 del metodo di lisi (E).**

**C- Metodo di diluizione**

- 1) **Utilizzare la tampone per diluire un campione concentrato.**
- 2) **Continuare col passaggio 1 del metodo di lisi (E).**

**D- Metodo di lavaggio**

- 1) **Centrifugare** la provetta di lisi contenente un massimo di 1000 µL di campione, ad alta velocità (**tra 14.000 x g e 21.000 x g**), per **5 minuti** a temperatura ambiente.
- 2) **Rimuovere il supernatante e scartarlo.**  
Utilizzare una pipetta di trasferimento sterile; prestare attenzione a non toccare la pastiglia. Utilizzare una nuova pipetta di trasferimento per ciascun campione.
- 3) **Aggiungere da 50 µL a 100 µL di tampone alla provetta di lisi; chiudere saldamente.**  
Utilizzare un nuovo puntale per pipettrice per ogni campione.
- 4) **Ripetere i passaggi da 1 a 3 per il numero di volte necessario.**
- 5) **Continuare col passaggio 2 del metodo di lisi (E).**

**E- Metodo di lisi**

- 1) **Aggiungere da 50 µL a 100 µL di campione alla provetta di lisi (tappo giallo); chiudere saldamente.**  
Utilizzare una micropipettrice appropriata e un nuovo puntale per pipettrice per ogni campione. Identificare la provetta di lisi del campione sull'etichetta del tappo e/o della provetta. Non aggiungere oltre 100 µL alla provetta di lisi.
- 2) **Mescolare con moto vorticoso ad alta velocità per 5 minuti.**  
Il tempo potrebbe variare col tipo di campione da lisare. Per trattare più campioni, è possibile utilizzare un adattatore con più siti di mantenimento.
- 3) **Centrifugare la provetta di lisi a bassa velocità per 2 - 5 secondi per portare il contenuto al fondo della provetta.**
- 4) **Riscaldare a 95 ± 2 °C per due (2) minuti.**  
Utilizzare un blocco di riscaldamento a secco o un bagno d'acqua.
- 5) **Mantenere la provetta di lisi su ghiaccio o su un blocco di raffreddamento.**

**Note:**

- 1- **Diluizione di lisato:** per diluire un lisato, aggiungere il volume appropriato di tampone alla provetta di lisi e conservare su ghiaccio o su un blocco di raffreddamento.
- 2- **Conservazione di lisato:** il lisato potrebbe essere congelato a -20 ± 5 °C per l'utilizzo successivo, se necessario. Cicli di congelamento e scongelamento potrebbero anche eliminare sostanze inibitorie di PCR.

## Risultati

Tabella 1. Rese previste

Specie	Tipo di campione	Quantitativo (UFC <sup>1</sup> /mL)	Efficienza della lisi (%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Tampone vaginale/anale	Tra 10 <sup>5</sup> e 10 <sup>6</sup>	98,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sospensione batterica		>99
<i>Bacillus anthracis</i> (cellule vegetative)	Tampone nasale		>99
<i>Bacillus anthracis</i> (spore)	Polvere di silice (0,24 mg)		>99
<i>Bacillus subtilis</i> (spore)	Sospensione di spore		98,8

<sup>1</sup> UFC: unità di formazione della colonia

Una lisi ottenuta col kit di lisi BD GeneOhm™ comporta il rilascio di componenti intracellulari come dimostrato dall'amplificazione di acidi nucleici genomici presenti nei lisati risultanti<sup>3, 4, 5, 6, 7, 8, 9</sup>.

Tabella 2. CFU rilevato da reazione PCR.



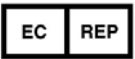






Specie	Tipo di campione	Calcolo				
		Concentrazione iniziale	Volume aggiunto alla provetta di lisi (µL)	Diluizione di lisato	Volume aggiunto alla provetta di reazione (µL)	Concentrazione finale
<i>S. saprophyticus</i> <sup>3</sup>	<b>Urina</b>	1,4x10 <sup>3</sup> UFC/mL	50	N/Ap	1	≤ 1.4 UFC/rx
<i>C. difficile</i> <sup>4</sup>	<b>Feci</b>	10 <sup>7</sup> UFC/g di feci	75 (feci liquide)	N/Ap	1,5	10 <sup>4</sup> UFC/g di feci
<i>M. smegmatis</i>	<b>Sospensione</b>	2,4 x10 <sup>5</sup> UFC/mL	100	1/2500	1	9.6 UFC/rx
<i>S. epidermidis</i>	<b>Sospensione</b>	2,4 x10 <sup>8</sup> UFC/mL	100	1/10000	1	24 UFC/rx
<i>E. coli</i> <sup>8</sup>	<b>Feci</b>	10 <sup>8</sup> UFC/g di feci	100 (feci liquide)	N/Ap	1,5	10 <sup>5</sup> UFC/g di feci
<i>E. coli</i>	<b>Sospensione</b>	10 <sup>8</sup> UFC/mL	100	1/100000	1	1 UFC/rx
<i>E. faecium</i>	<b>Sospensione</b>	8 x10 <sup>8</sup> UFC/mL	100	1/100000	1	≤ 8 UFC/rx
<i>C. albicans</i>	<b>Sospensione</b>	10 <sup>8</sup> UFC/mL	10	1/10000	1	≤ 10 UFC/rx

rx = reazione

## References / Références / Referenzen / Referencias / Riferimenti

- 1 Centers for disease Control and prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
- 2 Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guidelines – Second edition. Document M29 (Refer to the latest edition).
- 3 Martineau, F. *et al.* Development of a rapid PCR Assay Specific for *Staphylococcus saprophyticus* and Application to Direct Detection from Urine Samples. Journal of Clinical Microbiology. Sept 2000; 38(9): 3280-3284.
- 4 Bélanger, S D. *et al.* Rapid Detection of *Clostridium difficile* in Feces by Real-Time PCR. Journal of Clinical Microbiology. Feb. 2003; 41(2): 730-734.
- 5 BD Diagnostics, Sainte-Foy, Québec, Canada. Package insert of **BD GeneOhm™ MRSA Assay (cat. # 441242** for 200 tests kit and **441244** for 48 tests kit).
- 6 BD Diagnostics, Sainte-Foy, Québec, Canada. Package insert of **BD GeneOhm™ Strep B Assay (cat. # 441240)**.
- 7 Comparison of nine commercial kits for rapid nucleic acid extraction from microbial cultures. (M. Dion, C. Ménard, F.J. Picard *et al.* Abstr. 99th Annual Meeting of ASM, Chicago, abstr. C-481, 1999).
- 8 Bélanger, S D. *et al.* Rapid Detection of Shiga Toxin-Producing Bacteria in Feces by Multiplex PCR with Molecular Beacon on the SmartCycler. Journal of Clinical Microbiology. Apr. 2002; 40(4) : 1436-1440.
- 9 Martineau, F. *et al.* Species-Specific and ubiquitous DNA-Based Assays for Rapid Identification of *Staphylococcus epidermidis* Journal of Clinical Microbiology. Dec. 1996; 34(12): 2888-2893.

## Index of symbols / Table des symboles / Symbolindex / Índice de símbolos / Indice dei simboli

Symbol / Symbole / Símbolo / Simbolo	Meaning / Signification / Bedeutung / Significado / Significato
REF	Catalog number (US) / Catalogue number (UK) / Référence du Catalogue / Katalognummer / Número de Catálogo / Numero di catalogo
	In Vitro Diagnostic use / Aux fins de Diagnostic In Vitro / In-vitro-Diagnostika / Para fines de Diagnóstico in Vitro / Uso diagnostico In Vitro
	Manufacturer / Fabricant / Hersteller / Fabricante / Produttore
	Authorized european representative / Représentant européen autorisé / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft / Representante europeo autorizado / Rappresentante europeo autorizzato
	Contains sufficient for "n" tests / Contenu suffisant pour « n » tests / Inhalt ausreichend für « n » Prüfungen / Contiene cantidad suficiente para « n » pruebas / Il contenuto è sufficiente per "n" test
	Batch code / Code de lot / Chargenbezeichnung / Código de lote / Codice del lotto
	Use by / Utiliser avant / Verwendbar bis / Fecha de caducidad / Data di scadenza
	Temperature limitation / Limites de température / Temperaturbegrenzung / Límites de temperatura / Limiti di temperatura
	Reseal bag after use / Refermer le sac après utilisation / Beutel nach Gebrauch wieder verschließen / Volver a cerrar la bolsa después de la utilización / Richiudere la sacca dopo l'uso
	Consult instructions for use / Se référer aux instructions d'utilisation / Gebrauchsanweisung beachten / Ver las instrucciones de utilización / Consultare le istruzioni per l'uso



Customer Service/Service à la Clientèle/Kundendienst/ Servicio de Atención al Cliente/ Servizio Assistenza:  
1.888.436.3646



BENEX Limited, Bay K 1a/d,  
Shannon Industrial, Estate,  
Shannon, Country Clare,  
Ireland

