



BD GeneOhm™ MRSA Testi



REF 441242

200 Test

REF 441244

IVD

48 Test

İçindekiler

Türkçe

Kullanım amacı	3
Testin özeti ve açıklaması	3
İşlemin prensibi	3
Ayırıcılar	3
Önlemler	4
Sağlanan materyaller	4
Saklama, muamele ve stabilite	4
Toplanan örnekler	4
Ayırıcılar	4
Gereken ama sağlanmayan materyaller	5
Kullanım talimatı	5
Örnek toplama	5
Örnek hazırlama	6
BD GeneOhm™ MRSA test işlemi	6
Kalite kontrolü	7
Pozitif ve negatif kontroller	7
Örnek işleme koyma kontrolleri	7
Klinik örneklerden kültür alınması	8
Tek koloni ekimi	8
Zenginleştirme için broth	8
Sonuçların yorumlanması	8
Geçersiz test çalışması	8
Çözümlememiş örnek	8
I-CORE® modülü başarısızlığı nedeniyle örnek saptanmadı	8
İşlemin sınırlamaları	9
Enterferans yapan maddeler	9
Beklenen değerler	9
Performans özellikleri	9
Klinik performans	9
Analitik özgüllük	11
Analitik hassasiyet	11
Tekrarlanabilirlik	11
Referanslar	13
Semboller indeksi	14

TÜRKÇE

KULLANIM AMACI

BD GeneOhm™ MRSA testi sağlık kurumlarında MRSA enfeksiyonlarının önlenmesi ve kontrolüne yardımcı olmak için metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ile nazal kolonizasyonun doğrudan saptanması için kalitatif bir *in vitro* diagnostik testtir. Test kolonizasyon riski altındaki hastalarda bir nazal sürüntü örneği kullanılarak SmartCycler® aleti ile yapılır ve MRSA DNA amplifikasyonu için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve amplifiye DNA'nın saptanması için florojenik, hedefe spesifik hibridizasyon problemleri kullanır. BD GeneOhm™ MRSA testinin MRSA enfeksiyonlarına tanı koyması veya MRSA enfeksiyonları konusunda tedaviye rehberlik yapması veya tedaviyi izlemesi amaçlanmamıştır. Eş zamanlı kültürler sadece epidemiyolojik tipin belirlenmesi amacıyla organizmaların elde edilmesi veya daha ileri duyarlılık testleri için gereklidir.

TESTİN ÖZETİ VE AÇIKLAMASI

Bir nazal örnek alınıp laboratuvara önerilen eküvyon ve Sıvı Stuart Besiyeri kullanılarak gönderilir (gerekli ama sağlanmayan Materyaller kısmına bakın). Test yapmak için sürüntü örnek tamponuna yerleştirilir. Örnek konsantre edilir ve lizise uğratılır. Lizat sıvısı mevcutsa genetik hedefi amplifiye etmek için kullanılan MRSA'ya spesifik primerleri içeren PCR ayıraçlarına eklenir. Test ayrıca test ayıraçlarının doğruluğunu kontrol etmek açısından PCR inhibitör örnekleri saptamak için bir dahili kontrol (IC) içerir. Amplifiye hedefler sönmüş floroforlar (moleküler işaretler) ile etiketlenmiş hibridizasyon problemleri ile saptanır. Sinyallerin amplifikasyonu, saptanması ve yorumlanması otomatik olarak Cepheid SmartCycler® yazılımı ile yapılır. İşleme alınan örneklerin sayısına bağlı olarak tüm işlem 60–75 dakika sürer. Epidemiyolojik tür belirleme veya daha ileri antibiyotik duyarlılık testi için MRSA elde edilmesi amacıyla, örnek hazırlama sırasında veya hazırlamadan sonraki 24 saat içinde kültür ortamına inokülasyon yapılabilir.

S. aureus nozokomiyal enfeksiyonların temel bir nedenidir. Bulaşma genelde *S. aureus* taşıyan bir kişinin kontamine elleri yoluyla olur. *S. aureus* klinik belirtileri püstüllerden sepsis ve ölüme kadar gidebilen enfeksiyonlara neden olabilir de¹ sıklıkla sağlıklı bireylerin burnunda veya cildinde bulunur (asemptomatik taşıyıcılar). *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisi daha önceden etkili olan antimikrobiyal ajanlara dirençli suşların ortaya çıkmasıyla önemli bir konu haline gelmiştir. Metisiline dirençli *S. aureus* suşları sıklıkla sağlık bakımı ortamlarında bulunur ve bazı Kuzey Amerika hastanelerinde hastaneden elde edilen *S. aureus* izolatlarının %50'sinden fazlasını temsil eder.² Sağlık bakımı ortamında MRSA ile enfeksiyonun risk faktörleri arasında hastanede uzun süre kalma, MRSA ile enfekte hastalara yakın olma, çok sayıda ve uzun süreli geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi kullanma ve nazal MRSA taşıma vardır. Hastaların nazal MRSA taşıma açısından erken dönemde taranarak izolasyon gerektiren hastaların tanımlanması MRSA için etkin bir enfeksiyon kontrolü programının bir parçası olabilir. MRSA'yı saptamak için halen kullanılan tekniklerin tümünde bir kültür basamağı ve saf kolonilerin izolasyonu vardır ve bunu oksasilin duyarlılık testi, *mecA* geni saptanması veya *mecA* geni tarafından kodlanan penisilin bağlayıcı protein (PBP 2a) saptanması yer alır. Bu durum MRSA taşıyıcılık durumunun belirlenmesi süresini minimum 16 saate çıkarır; ortalama süre 48 saatin üzerindedir. *S. aureus* enfeksiyonlarının özellikle taşıyıcıların sık görüldüğü sağlık bakımı ortamlarında hızla yayılabilmesi nedeniyle nazal MRSA taşımanın sonuçlarının hastaneye yatma gününde sağlanabilmesi enfeksiyon kontrolü programları için kesin bir avantaj sağlamaktadır.

İŞLEMİN PRENSİBİ

Lizis sonrasında hedef [Staflokoksis Kaset Kromozomu *mec* (SCC*mec*) insersiyon bölgesi yakınındaki dizi] amplifikasyonu olur. MRSA'da bulunmayan 277-bp dizisi dahil 335-bp DNA fragmanı olan IC'nin amplifikasyonu da PCR inhibitör maddeler mevcut değilse gerçekleşir.

Amplifiye DNA hedefleri bir uçta bir söndürücü ve öteki uçta bir floresan raportör boya (florofor) ile etiketlenmiş, saç tokası şekli oluşturan tek iplikli oligonükleotidler olan moleküler işaretler tarafından saptanır. Hedef yokluğunda floresans söner. Hedef varlığında saç tokası yapısı işaret/hedef hibridizasyonu durumunda açılıp floresans yayar. MRSA ampikonlarının saptanması için moleküler işaret 5' ucunda FAM floroforunu ve oligonükleotidin karşı ucunda floresan olmayan söndürücü kısım DABCYL içerir. IC ampikonlarını saptamak için moleküler işarette 5' ucunda TET floroforu ve 3' ucunda söndürücü DABCYL bulunur. Her işaret-hedef hibridi belirli moleküler işarette kullanılan floroforun dalga boyu özelliğine göre floresans yayar. Herhangi bir döngüde veya döngü sonrasında floresans miktarı o anda bulunan belirli ampikonların miktarına bağlıdır. SmartCycler® her işarette yayılan floresansı aynı anda izler, tüm verileri yorumlar ve cycling programı sonunda son bir sonuç verir (bakınız Sonuçların yorumlanması).

AYIRAÇLAR

BD GeneOhm™ MRSA Testi	48 Test	200 Test
Örnek tamponu (Sample Buffer)	60 X 1 mL	240 X 1 mL
Tris-EDTA tamponu		
Lizis tüpü (Lysis tube)	50 tüp	200 tüp
Cam boncuklar		
Ana karışım (her birinde 8 reaksiyon) (Master Mix)	8 tüp	34 tüp
< %0,0005 DNA polimeraz kompleksi		
< %0,001 Dahili Kontrol - MRSA-primer bağlayıcı diziler ve prob hibridizasyonu için özgün bir dizi içeren enfeksiyöz olmayan DNA		
< %0,002 primerler		
< %0,002 moleküler problemler		
< %0,05 dATP, dCTP, dGTP, dTTP		
Sığır serum albümini		
Karbonhidrat		
MgCl ₂		
< %0,001 enfeksiyöz olmayan <i>Staphylococcus epidermidis</i> genomik DNA'sı (ATCC 14990)		
Kontrol DNA (Control DNA)	8 tüp	34 tüp
Tris-EDTA tamponu		
Karbonhidrat		
< %0,001 enfeksiyöz olmayan genomik MRSA DNA'sı (ATCC 43300)		

Seyreltici (Diluent)**8 X 700 µL****34 X 700 µL**

Tris-HCl tamponu
MgCl₂
(NH₄)₂SO₄
KCl

ÖNLEMLER

Bu test sadece *in vitro* diagnostik kullanım içindir.

- Dış karton güvenlik mührü bozulmuşsa kiti kullanmayın.
- Koruyucu poşetler geldiklerinde açık veya yırtıkta ayıraçları kullanmayın.
- Ana karışımlar ve kontrol DNA'nın koruyucu poşetlerini her kullanımdan sonra fermuar şeklinde kapanan mühürle çabucak kapatın.
- Ana karışım ve kontrol DNA poşetleri içinde kurutucu yoksa ayıraçları kullanmayın.
- Ana karışım ve kontrol DNA poşetlerinden kurutucuyu çıkarmayın.
- Ayıraçlar lotlar arasında değiştirilemez.
- Farklı tüplerden ayıraçları, aynı lottan olsalar bile, asla bir araya koymayın.
- Ayıraçları son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
- Ayıraçların kapaklarını birbirleriyle değiştirmeyin çünkü kontaminasyon oluşabilir ve test sonuçlarını tehlikeye atabilir.
- Tüplerden alikotları çıkarırken ayıraçların mikrobiyel ve deoksiribonükleaz (DNase) kontaminasyonundan kaçının. Steril, DNase içermeyen tek kullanımlık filtre bloku veya pozitif displasman pipetör uçlarının kullanılması önerilir.
- Ortamın MRSA amplikonlarıyla kontaminasyonunu önlemek için reaksiyon tüplerini amplifikasyon sonrasında açmayın.
- Her örnek veya ayıraç için yeni bir uç kullanın.
- Testin süresinin önerilen süre aralığının dışına çıkması geçersiz sonuçlara neden olabilir. Belirtilen süreler içinde yapılmayan testler tekrarlanmalıdır.
- Ek kontroller kılavuz ilkelere veya yerel, bölgesel ve ulusal yönetmelikler veya sertifikasyon sağlayan kurumlara göre test edilebilir.
- Laboratuvar tarafından açık tüplü PCR testlerinin de yapıldığı durumlarda örnek hazırlama ve amplifikasyon/saptama aktiviteleri için ayrılmış çalışma alanları kullanılmalıdır. Malzeme ve ekipman her alan için ayrı olmalı ve bir alandan ötekine götürülmemelidir. Daima eldiven kullanılmalı ve bir alandan ötekine giderken değiştirilmelidir. Liyofilize ayıraçlar kullanılmadan önce eldivenler değiştirilmelidir.
- Toplama cihazını dondurmayın. Oda sıcaklığında saklayın. Açılmadığında toplama cihazı belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir.
- Örnekleri daima bulaşıcı olabilir gibi *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³ ve CLSI Belgesi M29⁴ içinde tanımlandığı gibi güvenli laboratuvar işlemlerine göre kullanın.
- Kit ayıraçlarını kullanırken koruyucu giysiler ve tek kullanımlık eldivenler kullanın. Testi yaptıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın.
- Ağzınızla pipetlemeyin.
- Örneklerin veya kit ayıraçlarının kullanıldığı yerlerde sigara içmeyin ve bir şey yemeyin ve içmeyin.
- Kullanılmamış ayıraçları ve atıkları ülke, bölgesel ve yerel düzenlemelere göre atın.

SAĞLANAN MATERYALLER

- Örnek tamponu (*Sample Buffer*)
- Lizis tüpü (*Lysis tube*)
- Ana karışım (*Master Mix*)
- Kontrol DNA (*Control DNA*)
- Seyreltici (*Diluent*)
- SmartCycler® reaksiyon tüpleri, 25 µL
- Örnek tanımlama etiketleri

SAKLAMA, MUAMELE VE STABİLİTE**Toplanan örnekler**

Örnekler taşıma sırasında 2 ile 30°C arasında tutulmalıdır. Donmaya veya aşırı ısıya maruz kalmaya karşı koruyun.

Enterferans yapabilecek maddelerle (örn. kan, aşırı nazal sekresyon, vs.) ilgili deliller bulunan örnekler 24–36 saat içinde test edilmelidir. Aksi halde örnekler test yapılmasından önce 2–8°C'de 5 gün saklanabilir. Testin 36 saat içinde yapılabileceği örnekler oda sıcaklığında (15–30°C) saklanabilir.

Ayıraçlar

Not: Saklama koşulları her poşette yazılı spesifikasyonlara uymalıdır. Koruyucu torbaları dışındaki tüpler belirtilen zaman sınırı içinde kullanılmadıklarında atılmalıdır.

Kit Bileşeni		Master Mix ve Control DNA (beyaz ve kırmızı strip etiketler)	Lysis tube (sarı kapak)	Sample Buffer ve Diluent (sırasıyla mavi kapak, ve siyah strip etiket)
Mühürlenmiş poşet	Sıcaklık	2–25°C	2–25°C	2–25°C
	Stabilite	Son kullanma tarihi	Son kullanma tarihi	Son kullanma tarihi
Açılmış poşet	Sıcaklık	2–8°C ¹	2–25°C	2–25°C ²
	Stabilite	1 ay ³	Son kullanma tarihi	2 ay ³

¹ Poşetteki orijinal mühür bozulduktan sonra poşeti her kullanım sonrasında fermuar şeklinde kapanan bir mühürle dikkatle kapatın ve uygun sıcaklıkta saklayın.

² Bu ayraçlar oda sıcaklığında saklanabilir de aynı lottan birlikte gelen ayraçlarla birlikte 2–8°C’de saklanmalıdır.

³ Torbanın her kullanımından sonra fermuar şeklinde kapanan mühürle uygun şekilde kapatılması şartıyla.

Koruyucu poşeti dışındaki kit bileşeni			Master Mix ve Control DNA (beyaz ve kırmızı strip etiketler)
Rekonstitüsyon yapılmamış tüpler		Sıcaklık	15–25°C
		Stabilite	2 saat
Rekonstitüsyon yapılmış tüpler ¹	Orijinal kap	Sıcaklık	2–8°C
		Stabilite	3 saat
	SmartCycler® tüpü	Sıcaklık	2–8°C
		Stabilite	1 saat

¹ Gecikme sonlandığında kullanılmamış tüpleri atın.

GEREKEN AMA SAĞLANMAYAN MATERYALLER

- BBL™ CultureSwab™ Liquid Stuart** (Becton Dickinson katalog no. 220099), **Copan Transystem™ Liquid Stuart** (Copan Italia International katalog no. 141C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Liquid Stuart** (Copan Diagnostics Inc. katalog no. 141C.US), **HealthLink TransPorter™ single Liquid Stuart** (HealthLink katalog no. 4432)
- BBL™ CHROMagar™ Staph aureus katalog no. 214982, Mannitol Salt Agarı (MSA) katalog no. 221773 veya 221271 veya eşdeğer ortam (isteğe bağlı)
- Vortex** Genie 2 (Scientific Industries Inc.) 1,5 mL mikrotüp tutucu veya eşdeğeri ile; çok sayıda örneğin işleme konması için çok sayıda tutma bölgesi olan adaptör kullanılabilir
- Mikropipetörler** (hassas aralık 1–10 µL , 10–100 µL ve 100–1000 µL arasında)
- Steril, DNase-içermeyen** filtre bloklu veya pozitif displasman **mikropipetör uçları**
- Steril ince uçlu transfer pipetleri** (örn. VWR katalog no. 14670-329, 14670-332) veya artırılmış uzunluk steril DNase içermeyen filtre bloklu uçlar 1250 µL (örn. MATRIX katalog no. 8255)
- Makas**
- Gazlı bez**
- Tek kullanımlık **eldivenler, pudrasız**
- Mikrosantrifüj**, yüksek (14.000 x g değerine ulaşmalıdır) ve düşük hızda santrifüjasyon için
- Kuru ısıtma bloğu** 1,5 mL tüpler için veya su banyosu
- Buz veya **soğutma bloğu** 1,5 mL tüpler için
- Kapak çıkarma aracı (örn. MATRIX katalog no. 4469) (isteğe bağlı)
- Kronometre veya **süre ölçer**
- SmartCycler® başlangıç sistemi**, **Dx Yazılımı** ile (işleme koyma bloğu, kullanıcı kılavuzu, aksesuar kiti ve masaüstü bilgisayarı) (Cepheid, Sunnyvale, CA, A.B.D.)

KULLANIM TALİMATI

Örnek toplama

Yeterli bir örnek almak için örnek toplama işlemi yakından izlenmelidir.

Sıvı Stuart Besiyeri ile önerilen eküvyon kullanılarak (gereken ama sağlanmayan Materyaller kısmına bakın) nazal örnekler aşağıdaki işleme göre alınır:

- Eküvyonu iki damla (yaklaşık 50 µL) steril serum fizyolojik (salin) ile nemlendirin veya kuru olarak kullanın.
- Eküvyonu dikkatle hastanın burun deliğine yerleştirin (**eküvyon ucu burun kanadının kenarından 2,5 cm (1 inç) mesafeye kadar yerleştirilmelidir**).
- Eküvyonu 5 kez çevirin.
- Aynı eküvyonu ikinci burun deliğine yerleştirin ve **2 ve 3** kısımlarına olduğu şekilde örnek almayı tekrarlayın.
- Eküvyonu kabına yerleştirin.
- Kabı etiketleyin.
- Eküvyonu laboratuvara hastanenin standart çalışma işlemlerine göre gönderin.
- Saklama ve muamele için bakınız Saklama, muamele ve stabilite – Toplanan örnekler.

Örnek hazırlama

Not: Her örneğin işleme göre hazırlanması için bir *Lysis tube* (lizis tüpü, **sarı kapaklı**) ve en az bir *Sample Buffer* tüpü (örnek tamponu, **mavi kapaklı**) gerekir. Ayrıca test edilecek her 20 örneklilik grup için ek bir *Sample Buffer* tüpü (**mavi kapaklı**) gereklidir. Gerekli sayıda tüp koruyucu poşetten çıkarın, **fazla havayı giderin ve poşetleri hemen fermuar şeklinde kapanan mühürle kapatın.**

BD GeneOhm™ MRSA testini yapmadan önce klinik örneklerden (sürüntü) kültür almanın ayrıntıları için bakınız Klinik örneklerden kültür alma – Tek koloni ekim yöntemi.

- Toplama cihazını (eküvyon) bir örnek tamponu tüpüne (mavi kapak) yerleştirin.**

Örnek tamponu tüpünün tanımını kapak ve/veya tüp etiketi üzerine yazın.

- Eküvyon sapını kırın ve tüpü sıkıca kapatın.**

Eküvyonu tüp kenarına yakın olarak ucundan tutun (kontaminasyon riskini en aza indirmek için gazlı bez kullanın). Eküvyonu en dipten birkaç milimetre kaldırın ve kırmak için tüpün kenarına doğru bükerek kırın. Alternatif yöntem: kök kısmını kesmek için temiz makas kullanın. Kapağın sıkıca kapandığından emin olun.

- Yüksek hızda bir dakika vorteksleyin.**

Çok sayıda örneği işleme koymak için çok sayıda tutma bölgesi olan adaptör kullanılabilir.

- Tüm hücre süspansiyonunu bir lizis tüpüne (sarı kapak) aktarın.**

Steril, ince uçlu bir transfer pipeti veya arttırılmış uzunluklu uca sahip bir P-1000 mikropipetör kullanın.

Kalan eküvyondan klinik örnek kültürleri alınması ayrıntıları için bakınız Klinik örneklerden kültür alma - Zenginleştirme için broth.

- Oda sıcaklığında 5 dakika yüksek hızda (14.000 x g ve 21.000 x g arasında) santrifüj edin.**

- Süpernatanı alıp atın.**

Steril, ince uçlu bir transfer pipeti kullanın; pellete dokunmamaya dikkat edin. Her örnek için yeni bir transfer pipeti kullanın.

- Lizis tüpüne 50 µL örnek tamponu ekleyin; sıkıca kapatın.**

Her örnek için yeni bir pipetör ucu kullanın. Bir örnek tamponu tüpüyle 20 adete kadar örnek hazırlanabilir. 20 adetten fazla örnek için gerektiği kadar örnek tampon tüpü hazırlayın (**kullanılmamış tamponu BD GeneOhm™ MRSA test işleminin daha sonraki basamakları için saklayın**).

- Yüksek hızda 5 dakika vorteksleyin.**

Çok sayıda örneği işleme koymak için çok sayıda tutma bölgesi olan adaptör kullanılabilir.

- Lizis tüpünü kısa süre santrifüje edin (hızlı çevirme).**

Düşük hızda 2–5 saniye; içeriği tüpün alt kısmına getirmek için.

- İki (2) dakika boyunca 95 ± 2 °C'de ısıtın.**

1,5 mL tüpler için bir kuru ısıtma bloğu veya su banyosu kullanın.

- Lizis tüpünü buz üzerinde veya bir soğutma bloğunda tutun.**

Lizatlar 2–8°C'de 4 saate kadar stabildir. Lizatlar bu süre içinde kullanılmamışlarsa daha sonra kullanılmak üzere -20 ± 5°C'de saklayın.

BD GeneOhm™ MRSA test işlemi

Not: Bir rekonstitüsyon yapılmış *Master Mix* tüpü (Ana karışım, **beyaz etiket**) 8 reaksiyon yapmaya yeterli ayaç sağlar. Test edilecek örnek başına bir SmartCycler® tüpü ve pozitif ve negatif kontrol için iki ek SmartCycler® tüpü ayırın. Her BD GeneOhm™ MRSA test çalışmasına bir (1) pozitif ve bir (1) negatif kontrol dahil edilmelidir. Her test çalışması için bir *Control DNA* (kontrol DNA, **kırmızı strip etiketi**) gereklidir 3 adede kadar Ana karışım tüpünün rekonstitüsyonu için bir *Diluent* tüpü (seyreltme, **siyah strip etiketi**) gereklidir. Gerekli sayıda tüp koruyucu poşetten çıkarın, **fazla havayı giderin ve poşetleri hemen fermuar şeklinde kapanan mühürle kapatın.**

Sadece SmartCycler® aletindeki mevcut I-CORE® modüllerini doldurmaya yetecek kadar SmartCycler® tüpü hazırlayın.

- Gerekli sayıda Ana karışım tüpünü/tüplerini buza veya 1,5 mL tüpler için soğutma bloğuna koyun.**

- Her Ana karışım tüpüne 225 µL seyreltici (siyah strip etiketi) ekleyin.**

Mikropipetör ucunu kapak septumu içinden Ana karışım tüpüne yerleştirin. Ucu kapak içine fazla derin yerleştirmeyin. Seyrelticiyi koyun. Sonra kullanılmamış seyrelticiyi atın.

- Tüpü/tüpleri 5–10 saniye vorteksleyin.**

- SmartCycler® soğutma bloğuna gerekli sayıda SmartCycler® tüp yerleştirin.**

Her örnek başına bir SmartCycler® tüp ve kontroller için iki adet daha SmartCycler® tüp ayırın. Tüpün alt kenarlarındaki optik saptama pencerelerine ve alt elmas şekilli alana dokunmaktan kaçının.

Aşağıdaki basamaklar MUTLAKA bir saatli içinde yapılmalıdır:

- SmartCycler® tüplerine 25 µL rekonstitüsyon yapılmış Ana karışım ekleyin.**

Ayırıcın pipetlenmesinden önce septum kapağını çıkarın. Sıvıyı SmartCycler® tüplerinin rezervuarına (üst kısım) koyun. SmartCycler® tüplerini kapakta tanımlayın. Örnek tanımlama etiketleri (kitle sağlar) kullanılabilir. Kullanılmamış ana karışım **hemen 4–8°C'de, karanlıkta maksimum 3 saat boyunca saklanırsa** gerektiğinde çözülmemiş sonuçlar için tekrar test yapmak amacıyla kullanılabilir. Bu aşamadan sonra kullanılmamış ana karışımı atın.

- Her lizise uğratılmış örnekten 2,8 µL miktarını önceden doldurulmuş farklı bir SmartCycler® tüpüne koyun; tüpleri kapatın.**

Lizis tüpü içine pipetleme yaparken boncukları aspire etmemeye dikkat edin. Örnek eklendikten sonra tüm hacmin aktarıldığından emin olmak için rezervuar içinde 2–3 kez yukarı aşağı pipetleme yapın. Her örnek için yeni bir mikropipetör ucu kullanın.

- Bir kontrol DNA tüpünü (kırmızı strip etiket) buza veya 1,5 mL tüpler için soğutma bloğuna koyun.**

- Kontrol DNA tüpüne 225 µL örnek tamponu (mavi kapaklı) ekleyin.**

Örnek Hazırlama protokolünde basamak 7'de elde edilen örnek tamponu tüpünü kullanın. Mikropipetör ucunu Kontrol DNA tüpünün kapak septumu içinden yerleştirin. Ucu kapak içine fazla derin yerleştirmeyin. Örnek tamponunu verin.

- Tüpü 5–10 saniye vorteksleyin.**

10. **Rekonstitüsyon yapılmış kontrol DNA'sından 2,8 µL miktarını en sondan bir önceki SmartCycler® tüpüne (Pozitif Kontrol) ekleyin; tüpü kapatın.**
DNA eklendikten sonra tüm hacmin aktarıldığından emin olmak açısından rezervuar içinde 2–3 kez yukarı aşağı pipetleme yapın. Pozitif kontrol olarak tanımlayın. Kullanılmamış kontrol DNA **hemen 4–8°C'de, ışıktan uzak olarak maksimum 3 saat boyunca saklanırsa** gerektiğinde çözülmemiş sonuçlar için tekrar test yapmak amacıyla yeni bir pozitif kontrol hazırlamak için kullanılabilir. Bu aşamadan sonra kullanılmamış kontrol DNA'yı atın.
11. **Son SmartCycler® tüpüne (Negatif Kontrol) 2,8 µL örnek tamponu (mavi kapaklı) ekleyin; tüpü kapatın.**
Örnek Hazırlama protokolünde basamak 7'de elde edilen örnek tamponu tüpünü kullanın. Bu işlem örneklerin kullanımı sırasında olabilecek PCR kontaminasyonu izleme açısından kontrol gerçekleştirilecektir. Negatif kontrol olarak tanımlayın. Sonra kullanılmamış örnek tamponunu atın.
12. **Tüm reaksiyon tüplerini 5–10 saniye santrifüje edin.**
SmartCycler® aleti ile sağlanan özel olarak uyarlanmış mikrosantrifüjü kullanın.
13. **Tüpleri cihaza yüklemeyen önce SmartCycler® soğutma bloğu üzerinde 2–8°C'de tutun.**
Kalan lizatlar gerekirse daha sonra kullanım için -20 ± 5°C'de dondurulmalıdır.
14. **BD GeneOhm™ MRSA test protokolü ile bir çalışma oluşturun.**
Gerekirse SmartCycler® Dx Yazılımı Kullanım Kılavuzuna bakın. Çalışmayı başlatmadan önce örnekler için tanımlama parametrelerini girmeniz gerekir.
15. **Her reaksiyon tüpünü SmartCycler® I-CORE® modülüne yerleştirin ve I-CORE® kapağını kapatın.**
Pozitif ve negatif kontrolleri uygun pozisyona yerleştirin (bakınız "Kalite kontrolü" kısmı). Tüm tüpleri sıkıca yerlerine aşağıya doğru itin
16. **Çalışmayı başlatın.**

KALİTE KONTROLÜ

Pozitif ve negatif kontroller

Kalite kontrol işlemleri test performansını izlemek üzere tasarlanmıştır. Pozitif kontrol önemli ayıracı hatalarını izlemek üzere tasarlanmıştır. Negatif kontrol MRSA DNA veya MRSA ampliconlarıyla ayıracı veya çevresel kontaminasyonu (veya taşımayı) saptamak üzere tasarlanmıştır. Test kontrolleri (çalışma kontrolleri) pozitif ve negatif kontrollerdir. Geçersiz bir kontrol çalışmayı geçersiz hale getirir. Son olarak her reaksiyon karışımına dahil edilen bir dahili kontrolün her örnekte PCR engellemesini ve ayıracı bütünlüğünü izlemesi amaçlanmıştır.

SmartCycler® üzerinde çalışılan her test için bir pozitif kontrol ve bir negatif kontrol dahil edilmelidir. Yazılım otomatik olarak cihaz üzerinde kontrollerin pozisyonunu atar (bakınız SmartCycler® Dx Yazılımı Kullanım Kılavuzu).

Örnek işleme koyma kontrolleri

Kontrol suşları yerel, bölgesel ve ulusal yönetmelikler veya sertifikasyon sağlayan kurumların gereklilikleri veya kılavuz ilkelerine göre test edilebilir. Bir referans MRSA suşu (örn. American Type Culture Collection, ATCC 43300) veya iyi karakterize bir MRSA klinik izolatu bir örnek işleme alma kontrolü olarak kullanılabilirken metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* kültürü (örn. ATCC 29213) veya başka herhangi bir *Staphylococcus aureus* dışı organizma (örn. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990) harici bir negatif kontrol olarak kullanılabilir.

İzole edilmiş kolonileri %5 koyun kanlı agar plağında (örn. BBL™ Triptikaz Soya Agarı (TSA II) %5 Koyun Kanlı, BD katalog no. 221239 veya 221261) içinde salinde 0,5 McFarland (~1,5 X 10⁸ CFU/mL) türbiditeye kadar 18–24 saat tekrar süspansiyon haline getirin. ~10⁶ CFU/mL süspansiyon elde edecek şekilde salin ile seyreltin. Önerilen eküvyonu Sıvı Stuart Besiyeriyle (gerekli ama sağlanmayan Materyaller kısmına bakın) bakteriyel süspansiyona batırın, fazla sıvıyı bastırarak giderin, eküvyonu kabına yerleştirin (nakil ortamıyla temas etmesi için) ve oda sıcaklığında 5 dakika bırakın. Klinik örneği işleme koyun ve kontroller dahil olmak üzere test edin (bakınız "Örnek hazırlama" ve "BD GeneOhm™ MRSA test işlemi" kısımları). Tüm örnekler ve kontroller geçerli sonuçlar vermelidir (geçersiz pozitif veya negatif kontrol yok ve hatalı dahili kontrol yok).

Genel kalite kontrolü rehberliği için CLSI MM3 C24⁵ kısmına bakabilirsiniz.

KLİNİK ÖRNEKLERDEN KÜLTÜR ALINMASI

Antimikrobiyel duyarlılık testi veya epidemiyolojik tiplendirme yapmak için klinik örnekler BD GeneOhm™ MRSA test işleminin iki farklı basamağından da kültür alınabilir. Bu işlem BD GeneOhm™ MRSA ile analiz yapılmadan önce toplama cihazı (eküvyon) ile tek koloni ekim yöntemi kullanılarak veya bir zenginleştirme basamağı kullanarak aşağıdaki örnek hazırlık işleminden sonra eküvyon ile yapılabilir.

Tek koloni ekimi

Bu kültür yöntemi BD GeneOhm™ MRSA için örnek hazırlama işleminden önce yapılabilir.

1. Toplama cihazını (eküvyon) kabından çıkarın.
2. Bir mannitol tuzlu agarı (MSA) plakasını bu plakanın birinci çeyreğine yayarak inoküle edin.
3. Eküvyonu kabına geri koyun veya BD GeneOhm™ MRSA örnek tampon tüpünde (mavi kapaklı) kırıp "Örnek hazırlama" kısmındaki talimata göre devam edin.
4. Bir özeyle inokulumu MSA plağının kalan çeyreklerine yayın.
5. MSA plağını 35°C'de 24–48 saat inkübe edin.
6. Standart yöntemlere göre *S. aureus* kolonilerini tanımlayın ve doğrulayın ve metisilin direnç testi yapın.

Zenginleştirme için broth

Bu kültür yöntemi hücre süspansiyonunun lizis tüpüne aktarılmasından sonra örnek tamponu tüpünde kalan eküvyonlarla yapılabilir. Eküvyonlar kapalı örnek tamponu tüpünde 2–8°C'de kültür alınmasından önce 24 saate kadar saklanabilir; az miktarda MRSA bulunan klinik örneklerle geri kazanım başarılı olmayabilir.

1. Eküvyonu içeren örnek tampon tüplerine 1,0 mL zenginleştirme broth ekleyin.
%6,5 NaCl eklenmiş TSB (triptik soya broth) önerilir.
2. 35°C'de 24–48 saat inkübe edin.
3. Uygun katı ortamda 24–48 saat 35°C'de pasajlayın.
%5 koyun kanlı agar besiyeri önerilir.
4. Standart yöntemlere göre *S. aureus* kolonilerini tanımlayın ve doğrulayın ve metisilin direnç testi yapın.

SONUÇLARIN YORUMLANMASI

BD GeneOhm™ MRSA testi için karar algoritması SmartCycler® yazılımına gömülüdür. Test sonuçlarının yorumlanması aşağıdaki kriterlere göre yapılır:

Bildirilen test sonucu	Bildirilen IC sonucu	Sonucun yorumlanması ¹
NEG (NEG)	PASS (GEÇTİ)	MRSA DNA saptanmadı, MRSA nazal kolonizasyon olasılığı düşük
POS (POS)	NA (Uygulanamaz)	MRSA DNA saptandı, MRSA nazal kolonizasyonu
Unresolved (Çözümlememiş)	FAIL (BAŞARISIZ)	Çözümlememiş–inhibitör örnek veya ayıraç başarısızlığı
ND (Belirlenmedi)	ND (Belirlenmedi)	I-CORE® Modülü başarısızlığı nedeniyle saptanmadı (Uyarı veya Hata Kodları ile ²)

IC – Dahili Kontrol NA – geçersiz; ND – belirlenmedi

¹ BD GeneOhm™ MRSA sonuçları kurumsal programlar ve uygulamalarla birlikte izolasyon ve önlem düzeyi için bir kılavuz olarak kullanılabilir.

² Uyarı ve hata kodlarının yorumlanması için SmartCycler® Dx Yazılımı Kullanım Kılavuzuna bakınız.

Geçersiz bir pozitif veya negatif kontrol test çalışmasını geçersiz hale getirir. Bu gibi durumlarda o çalışma için alınan test sonuçları geçersizdir ve bildirilmemelidir. Geçersiz bir test çalışması veya cihaz hata kodları veya uyarıları ekran üzerinde ve raporlarda işaretlenir. MRSA sonuçlarını bildirmeden önce daima test çalışmasının geçerli olduğundan emin olun.

Sonuçların yazdırılması için SmartCycler® Dx Yazılımı Kullanım Kılavuzuna bakın.

Geçersiz test çalışması

Donmuş lizat(lar) kullanılarak o test çalışmasında yeni kontrol tüpleriyle birlikte tüm klinik örnekler için yeni reaksiyon tüpleri hazırlayın.

Çözümlememiş örnek

Testi ilgili örneğin donmuş lizatı ile tekrarlayın. Dondurma-çözme döngüsünün PCR inhibitör maddeleri azalttığı gösterilmiştir.

I-CORE® modülü başarısızlığı nedeniyle örnek saptanmadı

Testi ilgili örneğin donmuş lizatı ile tekrarlayın. Uyarı veya hata kodu mesajlarının yorumlanması için SmartCycler® Dx Yazılımı Kullanım Kılavuzuna bakınız.

İŞLEMİN SINIRLAMALARI

- Bu testin yapılması SmartCycler® cihazıyla hastaneye yatmış hastalardan veya hastaneye yatma zamanında hastalardan nazal örneklerle ve Copan Venturi Transystem® ve Sıvı Stuart Besiyeri kullanılarak toplanan örneklerle saptanmıştır. Bu nedenle bu ürün sadece SmartCycler® ile kullanılabilir; ayrıca gereken ama sağlanmayan materyal kısmında listesi verilenler dışında örnek toplama ve transfer ürünleri kullanılması önerilmez. Başka klinik kaynaklar değerlendirilmemiştir ve bu testin performans özellikleri başka örnek tipleri ve hasta popülasyonlarında bilinmemektedir.
- Negatif test sonuçlarının nedeni uygunsuz örnek toplama, muamele veya saklama, inhibitör varlığı, teknik hata, örnek karışımı veya örnekteki organizma sayısının testin analitik duyarlılığının altında olması olabilir. Bu prospektüste ve SmartCycler® Dx Yazılımı Kullanım Kılavuzunda talimata dikkatle uyulması hatalı sonuçların önlenmesi için gereklidir. Bu testin kullanımı işlem ve SmartCycler® kullanımı konusunda eğitim almış personelle sınırlı olmalıdır.
- Ayrıca hazırlamaya gerek olmamasına ve ana teknik işlemin pipetleme olmasına rağmen bu testin doğru yapılması için iyi laboratuvar tekniği şarttır. Testin yüksek analitik hassasiyeti nedeniyle özellikle çok sayıda alikotun tüpten alındığı durumlarda reaktiflerin saflığını korumak için büyük dikkat gösterilmelidir.
- Tarama belirli bir zamanda kolonizasyon durumunu gösterir ve hastanın aldığı tedavi (örneğin dekolonizasyon rejimi), hastanın durumu (örn. aktif olarak MRSA saçmıyor) veya yüksek riskli ortamlara maruz kalma (örn. MRSA taşıyıcısıyla temas, uzun süreli hastanede yatma) gibi durumlarla değişebilir. Kolonizasyon durumunun izlenmesi hastane politikalarına göre yapılmalıdır.
- BD GeneOhm™ MRSA testinin sonuçları artmış önlemler gerektiren hastaları tanımlamak için nozokomiyal enfeksiyon kontrolü çabalarına yardımcı olarak yapılmalıdır. Testin stafilokoksik enfeksiyon bulunan hastaları tanımlaması amaçlanmamıştır. Sonuçlar MRSA enfeksiyonları için tedaviye kılavuzluk yapma veya bunu izleme için kullanılmamalıdır.
- BD GeneOhm™ MRSA pozitif bir sonuç DNA devam edebileceğinden tedavi eradikasyonunun başarısızlığını kesin olarak göstermez. Daha önceki bir pozitif test sonucundan sonraki negatif bir sonuç tedavi eradikasyonunun başarısını gösterebilir veya aralıklı yayma nedeniyle olabilir.
- BD GeneOhm™ MRSA testi sonuçları geçersiz bir kontrol nedeniyle çözümlenmemiş veya geçersiz olabilir ve sonuçların elde edilmesinde gecikmeye neden olabilecek şekilde tekrar test yapılmasını gerektirebilir.
- Pozitif bir test sonucu canlı organizmaların mutlaka bulunduğu anlamına gelmez. Ancak BD GeneOhm™ MRSA aynı anda SCCmec kaseti (mecA genini taşır) ve *orfX* geni içinde yer alan *S. aureus*'a spesifik bir dizi saptadığından MRSA bulunduğunu düşündürür. BD GeneOhm™ MRSA *mecA* genini ve bu genin kodladığı penisilin bağlayıcı proteini (PBP 2a) saptamaz.
- BD GeneOhm™ MRSA'nın hastanede yakalanılan veya toplumda yakalanılan enfeksiyonlarla ilişkili çeşitli MRSA tiplerini saptadığı gösterilmiştir; değerlendirmeler hastane ortamında daha virülen olabilecek suşları tanımlamak üzere MRSA izolatlarının fenotipik veya genotipik özelliklerini değerlendirmemiştir.
- Primer veya prob bağlayıcı bölgelerdeki mutasyonlar veya polimorfizmler yeni veya bilinmeyen MRSA varyantlarının saptanmasını etkileyebilir ve BD GeneOhm™ MRSA testi ile yalancı negatif bir sonuç verebilir.

ENTERFERANS YAPAN MADDELER

Olası enterferans yapan maddeler arasında verilenlerle sınırlı olmamak üzere şunlar vardır: kan, fazla nazal sekresyon/mukus, dekonjestanlar ve zaman zaman burun kuruluğunu ve/veya tahrişini gidermek üzere kullanılan maddeler. Fazla nazal sekresyon ve kan bulunması PCR'yi inhibe edip çözümlenmemiş sonuçlar verebilir.

786 nazal örnekle yapılan bir araştırma çalışmasında toplanan örneklerin %43'ünde enterferans yapabilecek maddeler bildirilmiştir. Toplam olarak 35 (%4,5) çözümlenmemiş örnek olmuştur. Bu 35 örneğin 24'ünde herhangi bir olası enterferans yapıcı bildirilmemiş, 10 örnekte nazal sekresyonlar bulunmuş ve bir örnekte birkaç madde bulunmuştur. Yirmi yedisi (27) bir dondurma-çözme döngüsü sonrasında normale dönmüştür. Çözümlenemeyen 8 örnek için 4 örnekte enterferans yapması olası bir madde gözlenmemiş, üç örnekte nazal sekresyonlar bulunmuş ve bir örnekte birkaç madde birden bulunmuştur.

BEKLENEN DEĞERLER

İnsanlar *S. aureus* için doğal bir rezervuardır. Kolonizasyon geçici veya kalıcı olabilir ve yıllarca sürebilir. Genel toplumda *S. aureus* için burunda taşıma oranları %25–30 olarak bildirilmiştir ve bir poliklinik popülasyonunda veya hastaneye yatma sırasında %10–40 oranları bildirilmiştir.⁶ Metisiline dirençli *S. aureus* artık bazı Kuzey Amerika hastanelerinde hastanede yakalanılan *S. aureus* izolatlarının %50'sinden fazlasını temsil etmektedir.²

BD GeneOhm™ MRSA testi için araştırma çalışmasında kültürün saptadığı genel nazal *S. aureus* taşıma oranı (iki kültür tekniğinden biriyle örneklerde izole edilen *S. aureus*) %36,1 olmuştur (aralık %33–40). *S. aureus* izolatlarının yüzde elli biri (%51) oksasiline tarama agar yöntemiyle dirençli bulunmuştur [oksasiline (6 µg/mL) ve NaCl (4% w/v) eklenmiş Mueller-Hinton agar plağı] ve bu genel olarak %18,6 MRSA nazal taşıma oranına karşılık gelmiştir. BD GeneOhm™ MRSA testiyle genel MRSA nazal taşıma oranı %20,3 bulunmuştur.

PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

Klinik performans

BD GeneOhm™ MRSA testinin performans özellikleri çok merkezli bir prospektif araştırma çalışmasında belirlenmiştir: MRSA kültür tabanlı tarama programları bulunan, ikisi Kanada ikisi A.B.D.'den dört tıp merkezi. Çalışmaya katılmak için hastaların yazılı onay vermeleri ve hastane politikalarına göre MRSA taraması için uygun olmaları ve MRSA ile ilgili antibiyotik tedavisi almamış olmaları gerekmektedir. Tarama kriterleri arasında verilenlerle sınırlı olmamak üzere şunlar vardır: hastaneye yatma sırasında tüm hastaların sistematik olarak taranması, önceki MRSA enfeksiyonu veya taşıyıcılık, başka kurumdan transfer, uzun süreli hastanede yatma veya uzun süreli hastanede yatma öyküsü ve bir MRSA taşıyıcısıyla temas.

Referans yöntemi mannitol tuz agarında selektif üreme sonrasında oksasiline tarama agar testi ile başlangıç analizinden oluştu. MRSA için negatif örnekler %6,5 NaCl içeren triptikaz soya broth (TSB) içinde bir zenginleştirme basamağı ve sonrasında oksasiline tarama agarı testinden oluşan ek bir analizden geçti. MRSA kültürü pozitif bir örnek iki kültür tekniğinden biriyle MRSA için pozitif bir örnek olarak tanımlandı. MRSA kültürü negatif bir örnek her iki kültür tekniğiyle MRSA için negatif bir örnek olarak tanımlandı.

Mannitol tuz agarında (MSA) selektif üreme ile tarama yöntemi için plakalar doğrudan nazal sürüntü örnekleriyle inoküle edildi ve sonrasında 24–48 saat boyunca 35°C'de inkübasyon yapıldı. Gerekliğinde *S. aureus* olduğu düşünülen koloniler %5 koyun kanlı agar plakalarında alt kültür yapıldı ve 35°C'de 24–48 saat inkübe edildi. Aksi halde izole edilen koloniler doğrudan MSA plakalarından test edildi. Stafilokoksik olduğu düşünülen koloniler lateks aglütinasyon testi veya bir tüp koagülaz testile doğrulandı. Doğrulanmış *S. aureus* kolonileri oksasiline (6 µg/mL) ve NaCl (%4 w/v) eklenmiş bir Mueller-Hinton agar plakasında tam 24 saat boyunca 33–35°C'de (35°C'yi geçmeden) inkübe edilerek test edildi. MRSA tarama yöntemiyle MRSA için negatif bir sonuç alınan vakalarda %6,5 NaCl içeren triptik soya broth (TSB) içinde bir zenginleştirme basamağı ile MRSA taraması da yapıldı. Bu amaçla TSB brothlara MSA'da doğrudan

plakalama sonrasında inokülasyon yapıldı 35°C'de gece boyunca inkübe edildi, 35°C'de 24–48 saat boyunca %5 koyun kanlı agar plakalarına pasaj yapıldı ve plakalar gerekirse test için 2–8°C'de saklandı. Varsayılan kolonilerin doğrulanması ve metisilin direncinin belirlenmesi yukarıda tanımlanan şekilde yapıldı. Bir araştırma merkezinde her örnek her iki tarama yöntemi kullanılarak test edildi.

Toplam olarak önerilen eküvyon ve Sıvı Stuart Besiyeri (gerekten ama sağlanmayan Materyaller kısmına bakın) ile toplanan 786 nazal örnek MRSA için yukarıda tanımlanan referans kültür yöntemi ve BD GeneOhm™ MRSA testi ile tarandı. Referans kültür yöntemi ile karşılaştırıldığında BD GeneOhm™ MRSA yöntemi iki kültür tekniğinden biri ile MRSA için pozitif örneklerin %92,5 ve her iki kültür tekniğiyle negatif örneklerin %96,4'ünü tanımladı (Tablo 1 ve 2). Test edilen popülasyon için bu durum %98,2 negatif prediktif değer %85,4 pozitif prediktif değere karşılık gelmektedir.

Tablo 1. Referans yöntemiyle karşılaştırmalı olarak BD GeneOhm™ MRSA testiyle elde edilen sonuçlar.¹

		BD GeneOhm™ MRSA		Total
		Pozitif	Negatif	
Kültür teknikleri	Pozitif	135	11	146
	Negatif	23	609	632
	Toplam	158	620	778

¹ Başlangıçta çözülmemiş sonuçlar verilen sekiz (8) örnek BD GeneOhm™ MRSA testi ile tekrar test yapıldığında halen çözülmemiş kaldı ve tabloya dahil edilmedi. Bunların 8'i de kültürde negatifti.

Kültür negatif ama BD GeneOhm™ MRSA olan 23 örneğin on dördü (14) daha ileri incelendiğinde MRSA kültür pozitif bulundu ve böylece toplam 160 kültür pozitif örnek içinde 149 kültür pozitif ve BD GeneOhm™ MRSA pozitif örneği bulundu. Kültür pozitif ama BD GeneOhm™ MRSA negatif olan iki örnek için oksasiline agar plakalarında metisilin direnci gösteren izolatların hiçbirinin Martineau *et al.* tarafından tanımlanan *mecA*-spesifik PCR testi ile test edildiğinde *mecA* genini taşıdığı gösterilemedi.⁷

Tablo 2. BD GeneOhm™ MRSA testinin araştırma merkezlerinde referans yöntemiyle karşılaştırıldığında performansı

	Hassasiyet (%95 GA) ¹	Özgüllük (95% GA) ¹	Çözülmemiş örnek sayısı ²	Geçersiz/toplam çalışma sayısı
Çalışma yeri 1	%86,8 (n = 38) (%71,9–95,6)	%99,6 (n = 261) (%97,9–100)	6	0/26
Çalışma yeri 2	%100 (n = 30) (%88,4–100)	%98,0 (n = 102) (%93,1–99,8)	16	0/21
Çalışma yeri 3	%89,3 (n = 28) (%71,8–97,7)	%90,8 (n = 119) (%84,1–95,3)	11	1/15
Çalışma yeri 4	%94,0 (n = 50) (%83,5–98,7)	%94,0 (n = 150) (%88,9–97,2)	2	2/27
Toplam	%92,5 (n = 146) (%86,9–96,2)	%96,4 (n = 632) (%94,6–97,27)	35	3/89

¹ Binomiyel %95 güven aralıkları.

² Engelleme veya reaktif başarısızlığını düşündürecek şekilde tüm örnekler hatalı dahili kontroller nedeniyle çözülmemiştir. 35 örneğin yirmi yedisi (27) tekrar test edildiğinde çözümlendi.

Oliviera ve de Lencastre'ye⁸ göre MRSA kültür pozitif örneklerde SCCmec tiplmesi tip I, II ve IV örnekler gösterdi. Çalışmada SCCmec tip III örnek izole edilmedi. Ancak ayrı bir çalışmada BD GeneOhm™ MRSA testi ile tüm SCCmec tiplerinin referans suşları ve diğer klinik izolatları test edilip saptandı.

Araştırma yerlerinde BD GeneOhm™ MRSA ile elde edilen performanslar ve kültür referans yöntemiyle karşılaştırmalı bireysel kültür teknikleri (her iki kültür tekniği) Tablo 3 ve 4'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Kültür referans yöntemiyle MRSA için pozitif örneklerde her kültür tarama tekniğiyle ve BD GeneOhm™ MRSA testiyle elde edilen sonuçlar.

Çalışma yeri	MRSA prevalansı ¹	Hassasiyet (%95 GA) ²		
		BD GeneOhm™ MRSA	OxaMSA ³	OxaTSB ⁴
Çalışma yeri 1	%12,7 (38/300)	%86,8 (%71,9–95,6)	%81,6 (%65,7–92,3)	Belirlenmedi
Çalışma yeri 2	%21,7 (30/138)	%100 (%88,4–100)	%93,3 (%77,9–99,2)	Belirlenmedi
Çalışma yeri 3	%18,9 (28/148)	%89,3 (%71,8–97,7)	%64,3 (%44,1–81,4)	Belirlenmedi
Çalışma yeri 4	%25,0 (50/200)	%94,0 (%83,5–98,7)	%80,0 (%66,3–90,0)	%78,0 (%64,0–88,5)
Toplam	%18,6 (146/786)	%92,5 (%86,9–96,2)	%80,1 (%72,7–86,3)	Belirlenmedi

¹ Kültür referans yöntemiyle elde edilen sonuçlardan belirlenmiştir (OxaMSA ve OxaTSB kombinasyonu).² Binomiyel %95 güven aralıkları.³ MSA üzerinde selektif üreme sonrasında oksasiline tarama agar testi.⁴ %6,5 NaCl ile TSB'de zenginleştirmeden sonra oksasiline tarama agar testi. Çalışma yeri 4 tüm örnekleri her iki kültür tekniğiyle test ederken diğer çalışma yerleri sadece OxaMSA kültür yöntemiyle negatif örnekleri test etti.**Tablo 4.** Kültür referans yöntemiyle MRSA için negatif örneklerde her iki kültür tarama tekniğiyle ve BD GeneOhm™ MRSA testiyle elde edilen sonuçlar.

Çalışma yeri	MSSA ¹	Özgüllük (95% CI) ²		
		BD GeneOhm™ MRSA	OxaMSA ³	OxaTSB ⁴
Çalışma yeri 1	73/262	%99,6 (%97,9–100)	%100 (%98,6–100)	Belirlenmedi
Çalışma yeri 2	25/108	%98,0 (%93,2–99,8)	%100 (%96,4–100)	Belirlenmedi
Çalışma yeri 3	24/120	%90,8 (%84,1–95,3)	%100 (%96,9–100)	Belirlenmedi
Çalışma yeri 4	16/150	%94,0 (%88,9–97,2)	%100 (%97,6–100)	%100 (%97,6–100)
Toplam	138/640	%96,4 (%94,6–97,7)	%100 (%99,4–100)	Belirlenmedi

¹ Toplam MRSA kültür negatif popülasyonunda MSSA sayısı.² Binomiyel %95 güven aralıkları.³ MSA üzerinde selektif üreme sonrasında oksasiline tarama agar testi.⁴ %6,5 NaCl ile TSB'de zenginleştirmeden sonra oksasiline tarama agar testi. Çalışma yeri 4 tüm örnekleri her iki kültür tekniğiyle test ederken diğer çalışma yerleri sadece OxaMSA kültür yöntemiyle negatif örnekleri test etti.**Analitik özgüllük**

S. aureus ile filogenetik olarak ilişkili türleri ve nazal kommensal flora üyelerini temsil eden 37 ATCC suşunun genomik DNA'sı, 27 metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok suşu (15 referans suşu ve 12 klinik izolat), ve 44 metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok suşu (iki referans suşu ve 42 klinik izolat) test edildi. Özgüllük %100 bulundu.

Tablo 4'te görüldüğü gibi kültür teknikleri ile analiz edilen 138 örneğin araştırma yerlerinde metisiline duyarlı *S. aureus* içerdiği bulundu. Yedisi (7) BD GeneOhm™ MRSA testi ile pozitif sonuçlar verdi. Gelişmiş kültür teknikleriyle daha ileri inceleme sonrası 4'ünde MRSA bulunduğu gösterildi.

Analitik hassasiyet

Analitik hassasiyet (saptama limiti veya LOD) BD GeneOhm™ MRSA testi için 7 MRSA suşu ile belirlendi. Kantifiye edilmiş kültür ve purifiye genomik DNA'sı BD GeneOhm™ MRSA testi örnek tamponunda seyreltilip 5 replikatta test edildi. LOD, replikatların en az %92,5'unun pozitif sonuç verdiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır.

BD GeneOhm™ MRSA testi LOD değeri reaksiyon başına 15 genom kopyasıdır. CFU olarak LOD 5 CFU/reaksiyon şeklindedir. Örneğin işleme konması nedeniyle seyreltme faktörü dikkate alındığında bu yaklaşık olarak 325 CFU/sürüntü anlamına gelir.

Tekrarlanabilirlik

Çeşitli MRSA konsantrasyonları bulunan 10 simülasyon örneği ve BD GeneOhm™ MRSA testinin iki kontrolü (pozitif ve negatif) üç çalışma yerinin her birinde üç farklı günde üçlü olarak test edildi (10 örnek ve iki kontrol X 3 X 3 gün X 3 çalışma yeri olarak test edildi). Bu işlem üç ayraç lotuyla tekrarlandı.

Tablo 5. Tekrarlanabilirlik çalışmasının kümülatif verileri.

Örnek Kimliği	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Toplam anlaşıma	Toplam % anlaşıma
Negatif	27/27	27/27	27/27	81/81	%100
Negatif	27/27	27/27	27/27	81/81	%100
Zayıf pozitif ¹	19/27	18/27	16/27	53/81	%65
Kuvvetli pozitif	27/27	27/27	27/27	81/81	%100
Kuvvetli Pozitif	27/27	27/27	27/27	81/81	%100
Zayıf pozitif ¹	14/27	13/27	18/27	45/81	%56
Pozitif	27/27	27/27	27/27	81/81	%100
Pozitif	27/27	27/27	27/27	81/81	%100
Zayıf pozitif	27/27	27/27	27/27	81/81	%100
Pozitif	27/27	27/27	27/27	81/81	%100
Pozitif kontrol	26/27	27/27	27/27	80/81	%99
Negatif kontrol	26/27	27/27	27/27	80/81	%99
Toplam anlaşıma	301/324	301/324	304/324	906/972	%93
Toplam % anlaşıma	%93	%93	%94	%93	

¹ CFU değerinin testin saptama limitinin altında olduğu örnekler.

Referanslar

- ¹ Centers for Disease Control and Prevention. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin or soft tissue infection in a state prison. Mississippi, 2000. MMWR 2001; 50:919-922.
- ² National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. Am J Infect Control. 2002; 30:458-475.
- ³ 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.
- ⁴ Clinical and Laboratory Standards Institute.. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline – Second edition. Document M29 (Refer to the latest edition).
- ⁵ Clinical and Laboratory Standards Institute.. Statistical Quality Control for Quantitative Measurements: Principles and Definitions; Approved Guideline – Second Edition, Document C24 (Refer to the latest edition).
- ⁶ Jernigan, J.A. *et al.* Prevalence of and risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at the time of hospital admission. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24:409-414.
- ⁷ Martineau, F. *et al.* Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 2000; **44(2)** : 231-238
- ⁸ Oliveira, D.C. and H. de Lencastre. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:2155-2161.

Bu kit New York eyaleti Public Health Research Institute (Kamu Sağlığı Araştırmaları Enstitüsü) lisansı ile satılmaktadır ve sadece insan *in vitro* klinik diagnostikleri için PHRI patent haklarına göre kullanılabilir.

Bu ürünün satın alınması satın alan kişiye insanda *in vitro* diagnostik bilgi sağlamak amacıyla nükleik asit dizilerinin amplifikasyonu ve saptanması amacıyla kullanılması hakkı tanır. Bu satın almayla bu spesifik kullanım hakkı dışında herhangi bir genel patent veya başka herhangi bir türde lisans verilmez.

SEMBOLLER İNDEKSİ

Sembol	Anlamı
REF	Katalog numarası
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostik kullanım
	Üretici
EC REP	Yetkili avrupa temsilcisi
	İçindekiler “n” test için yeterlidir
LOT	Parti kodu
	Son kullanma tarihi
	Sıcaklık sınırlaması
	Işık ve nemden koruyun
	Kullandıktan sonra torbayı tekrar mühürleyin
	Kullanma talimatına bakınız
	Kutu 1/3



Müşteri Servisi : +1.888.436.3646

