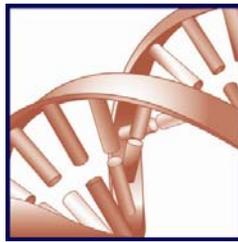




BD GeneOhm™ VanR-Test



REF 441250 48 TESTS



REF 441251 200 TESTS

Inhalt

Verwendungszweck	3
Zusammenfassung und Erläuterung des Tests	3
Testprinzip	3
Reagenzien	3
Vorsichtsmaßnahmen	4
Mitgelieferte Materialien	4
Lagerung, Handhabung und Stabilität	5
Gesammelte Proben	5
Reagenzien	5
Nicht mitgelieferte, aber erforderliche Materialien	5
Gebrauchsanleitung	6
Probenentnahme	6
Probenvorbereitung	6
BD GeneOhm™ VanR-Testverfahren	6
Qualitätskontrolle	7
Positiv- und Negativkontrollen	7
Verfahrenskontrollproben	7
Kultivierung klinischer Proben	8
Plattenausstrichmethode	8
Anreicherungsmedium	8
Interpretation der Ergebnisse	9
Ungültiger Testlauf	9
Nicht aufgeklärte Proben	9
Proben nicht bestimmbar aufgrund I-CORE®-Modulfehler	9
Verfahrensbeschränkungen	9
Störsubstanzen	10
Leistungsmerkmale	10
Klinische Leistung	10
Testspezifität	11
Testempfindlichkeit	11
Referenzen	12
Symbolindex	13

Deutsch

Verwendungszweck

Der BD GeneOhm™ VanR-Test ist ein qualitativer *In-vitro*-Test zum Schnellaufweis von Vancomycinresistenzgenen (*VanA* und *VanB*) direkt aus Perianal- und/oder Rektalabstrichen. Der BD GeneOhm™ VanR-Test weist die Anwesenheit der *VanA*- und *VanB*-Gene nach, die mit vancomycinresistenten Enterokokken (vancomycin resistant enterococci - VRE) assoziiert sein können. Der Test wird in einem automatisierten Real-Time PCR-Gerät mit Perianal- und/oder Rektalabstrichen von Personen durchgeführt, die von einer VRE-Kolonisierung bedroht sind. Der BD GeneOhm™-VanR-Test kann die Identifizierung, Verhütung und Kontrolle vancomycinresistenter Kolonisierung im Krankenhausbereich unterstützen. Der BD GeneOhm™-VanR-Test dient nicht der Diagnose von VRE-Infektionen oder der Lenkung bzw. Überwachung der Behandlung von VRE-Infektionen. Parallele angesetzte Kulturen sind erforderlich, um Organismen zur epidemiologischen Typisierung und für weitere Bestätigungstests zu isolieren.

Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

Ein Perianal- und/oder Rektalabstrich wird entnommen und in einem geeigneten Transportmedium (siehe „Nicht mitgelieferte, aber erforderliche Materialien“) an das Labor geschickt. Der Abstrich wird in Probenpuffer eluiert und die Probe lysiert. Ein Aliquot des Lysats wird den PCR-Reagenzien mit *VanA*- und *VanB*-spezifischen Primern hinzugefügt, die die Zielgene (falls vorhanden) amplifizieren. Der Test enthält ebenfalls eine interne Kontrolle (IC), um PCR-hemmende Substanzen nachzuweisen und die Integrität der Testreagenzien zu bestätigen. Amplifizierte Zielgene werden mittels Hybridisierungs sonden nachgewiesen, die mit emissionsunterdrückten Fluorophoren (Molecular Beacons) markiert sind. Die Amplifizierung, Detektion und Interpretation der Signale wird automatisch von der Cepheid SmartCycler®-Gerätesoftware durchgeführt. Das gesamte Verfahren dauert je nach Anzahl der zu verarbeitenden Proben ca. 60–75 Minuten. Die Isolierung der Organismen zur Speziesidentifizierung und epidemiologischer Typisierung kann durch Animpfen entsprechender Kulturmedien während der Probenvorbereitung bzw. bis zu 24 Stunden nach der Verarbeitung durchgeführt werden.

Enterokokken sind Bewohner des Gastrointestinaltrakts und zählen zur normalen Darmflora. Ihre Entwicklung zu wichtigen nosokomialen Pathogenen in den vergangenen zwanzig Jahren beruht größtenteils auf ihrer Resistenz gegen viele häufig verwendete Antibiotika.^{1,2} Obwohl die meisten Enterokokkeninfektionen auf endogene Quellen zurückzuführen sind (normale Darmflora des einzelnen Patienten), findet auch eine Übertragung durch kontaminierte Hände von Personal, kontaminierte Gerätschaften zur Patientenpflege und/oder Oberflächen des Umfelds statt. Die Behandlung einiger Enterokokkeninfektionen, besonders jene verursacht durch vancomycinresistente Stämme ist zu einer signifikanten Herausforderung geworden. Trotz der Tatsache, dass für die Vancomycinresistenz (intrinsisch oder erworben) mehrere Gene verantwortlich sind, werden bei vancomycinresistenten Enterokokken (VRE)³ hauptsächlich die *VanA*- und *VanB*-Gene angetroffen, welche auch die einzigen von klinischer Relevanz sind. Für die Infektionskontrolle ist die Kenntnis des Resistenztyps entscheidend. *VanA*- und *VanB*-Gene sind übertragbar und können sich von Organismus zu Organismus verbreiten. Im Gegensatz dazu sind *VanC*-Gene nicht übertragbar, wurden weniger häufig mit schweren Infektionen und nicht mit Ausbrüchen in Zusammenhang gebracht.² In Gesundheitseinrichtungen nehmen VRE ständig zu und stellen über 28,5 % der Enterokokkenisolate auf Intensivstationen amerikanischer Krankenhäuser dar.² Der *VanA*-Phänotyp wird in den USA in rund 70 % der VRE-Isolate gefunden und der *VanB*-Phänotyp in ca. 25%.⁴ Risikofaktoren für Kolonisierung und Infektion mit VRE in Gesundheitseinrichtungen sind u. a. verlängerte Krankenhausaufenthalte, Aufenthalt auf Intensiv-, Transplantations- oder Onkologiestationen, vorherige Behandlung mit Antibiotika und unmittelbare Nähe zu mit VRE infizierten oder kolonisierten Patienten.^{1,2,4} Ein frühes Patienten-Screening auf VRE-Träger zur Identifizierung von Patienten, die isoliert werden müssen, kann Teil eines effektiven Programms zur VRE-Infektionskontrolle darstellen. Derzeitig zugelassene Techniken zum VRE-Nachweis erfordern alle einen Kulturschritt und die Isolierung reiner Kolonien, gefolgt von entweder einem Vancomycin-Empfindlichkeitstest oder dem Nachweis von *VanA*- und *VanB*-Genen. Das verlängert die Zeit bis zur Identifizierung eines VRE-Trägers auf mindestens 48 Stunden mit einer Durchschnittsdauer von mehr als 72 Stunden. Im Hinblick auf die Geschwindigkeit mit der sich VRE besonders in Gesundheitseinrichtungen ausbreiten, wo oft Träger anzutreffen sind, bedeutet die Möglichkeit, Ergebnisse einer perianalen und/oder rektalen VRE-Besiedelung noch am Aufnahmetag zu liefern, einen Gewinn für Programme zur Infektionskontrolle.

Testprinzip

Nach Lyse der Probe werden die *VanA*- und *VanB*-Zielgene (falls vorhanden) amplifiziert. Darüber hinaus findet ebenfalls eine Amplifikation der IC statt (ein DNA-Fragment von 294 bp Länge, welches eine 254 bp-Sequenz enthält, die bei VRE nicht vorkommt), falls sich keine PCR-hemmenden Substanzen in der Probe befinden.

Die amplifizierten DNA-Zielsequenzen werden mittels Molekular-Beacon-Hybridisierungssonden nachgewiesen, einzelsträngigen Oligonukleotiden mit Haarnadelstruktur, die an einem Ende mit einem Emissionsunterdrücker (Quencher) und am anderen Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (Fluorophor) markiert sind. In Abwesenheit einer DNA-Zielsequenz wird die Fluoreszenz unterdrückt. Bei deren Anwesenheit öffnet sich die Haarnadelstruktur aufgrund der Beacon-/Zielsequenzhybridisierung, was dann zur Emission von Fluoreszenz führt. Zum Nachweis des *VanA*-Amplifikats enthält die Molekular-Beacon-Sonde das Fluorophor FAM am 5'-Ende und den nicht fluoreszierenden Quencher-Anteil DABCYL am entgegengesetzten 3'-Ende des Oligonukleotids. Zum Nachweis des *VanB*-Amplifikats enthält die Molekular-Beacon-Sonde das Fluorophor Texas Red am 5'-Ende sowie den Quencher DABCYL am 3'-Ende. Zum Nachweis des IC-Amplifikats enthält die Molekular-Beacon-Sonde das Fluorophor TET am 5'-Ende sowie den Quencher DABCYL am 3'-Ende. Jedes Beacon-Zielsequenzhybrid fluoresziert bei einer Wellenlänge, welche für das in der jeweiligen Molekular-Beacon-Sonde verwendete Fluorophor charakteristisch ist. Die Stärke der Fluoreszenz während jedes PCR-Zyklus bzw. nach Abschluss aller Zyklen hängt von der Menge des spezifischen Amplifikats zu jeder Zeit ab. Die SmartCycler®-Software überwacht simultan die von jeder Molekular-Beacon-Sonde emittierte Fluoreszenz, wertet alle Daten aus und liefert am Ende des Cycling-Programms ein Endergebnis (siehe Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“).

Reagenzien

BD GeneOhm™ VanR-Test	48 Tests	200 Tests
Probenpuffer (Sample Buffer)	60 x 1 mL	240 x 1 mL
Tris-EDTA-Puffer		
Lyseröhrchen (Lysis tube)	50 Röhrchen	200 Röhrchen
Glasperlen		
Master-Mix (Master Mix)	8 Röhrchen	34 Röhrchen
< 0,0005 % DNA-Polymerasekomplex		
< 0,001 % Interne Kontrolle - nicht infektiöse DNA mit <i>VanA</i> - und <i>VanB</i> -Primerbindungssequenzen mit einer einzigartigen Sequenz zur Sondenhybridisierung		

< 0,002 % Primer
 < 0,002 % Molekularsonden
 < 0,05 % dATP, dCTP, dGTP, dTTP
 Rinderserumalbumin
 Kohlenhydrat
 MgCl₂
 < 0,001 % nicht infektiöse genomische *Staphylococcus epidermidis*-DNA (ATCC 14990)

Kontroll-DNA (Control DNA)**8 Röhrchen 34 Röhrchen**

Tris-EDTA-Puffer
 Kohlenhydrat
 < 0,001 % nicht infektiöse genomische *Enterococcus faecium* DNA mit *VanA*- (ATCC 700221)
 und *Enterococcus faecalis* DNA mit *VanB* (ATCC 51299)

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

Tris-HCl-Puffer
 MgCl₂
 (NH₄)₂SO₄
 KCl

Vorsichtsmaßnahmen**Nur zur *In-vitro*-Diagnostik**

- Den Kit nicht verwenden, wenn das Sicherheitssiegel der äußeren Umverpackung beschädigt ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Ankunft geöffnet oder beschädigt sind.
- Nicht das Trockenmittel aus den Schutzbeuteln mit Master-Mix und Kontroll-DNA entfernen.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn sich in den Beuteln des Master-Mix und der Kontroll-DNA kein Trockenmittel befindet.
- Schutzbeutel von Master-Mix und Kontroll-DNA nach jedem Gebrauch mit dem Zippverschluss verschließen.
- Reagenzien sind zwischen den Chargen nicht austauschbar.
- Reagenzien verschiedener Röhrchen nicht zusammenschütten, auch nicht wenn sie aus derselben Charge stammen.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Verschlusskappen nicht untereinander austauschen. Das kann zur Kontamination führen und die Testergebnisse beeinträchtigen.
- Bei der Entnahme von Aliquots aus den Röhrchen Kontamination durch Mikroorganismen und Desoxyribonuklease (DNAse) vermeiden. Die Verwendung steriler DNAse-freier Einwegpipettenspitzen mit Filterblockierung oder positiver Verdrängung ist zu empfehlen.
- Die Reaktionsröhrchen nach der Amplifizierung nicht mehr öffnen, um eine Kontamination des Umfelds mit *VanA*- und *VanB*-Amplifikaten zu vermeiden.
- Für jede Probe bzw. jedes Reagenz eine neue Pipettenspitze verwenden.
- Die Testdurchführung über die empfohlene Zeitspanne hinaus kann ungültige Testergebnisse ergeben. Tests, die nicht innerhalb der angegebenen Zeitspanne durchgeführt wurden, müssen wiederholt werden.
- Gemäss der Richtlinien bzw. Vorschriften geltender gesetzlicher Bestimmungen bzw. Vorgaben von Zulassungsorganisationen können zusätzliche Kontrollen getestet werden.
- Werden in demselben Bereich des Labors ebenfalls PCR-Tests mit offenen Röhrchen durchgeführt, sind Probenvorbereitung und Amplifizierung/Detektion in separaten, abgetrennten Arbeitsbereichen auszuführen. Verbrauchsartikel und Gerätschaften sollten den einzelnen Bereichen zugeordnet sein und dürfen zwischen den Bereichen nicht ausgetauscht werden. Immer Schutzhandschuhe tragen, die zwischen den einzelnen Bereichen gewechselt werden müssen. Schutzhandschuhe vor dem Umgang mit lyophilisierten Reagenzien wechseln.
- Proben immer als potenziell infektiös behandeln und gemäß der Laborsicherheitsrichtlinien verarbeiten wie z. B. in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁵ und im CLSI-Dokument M29⁷ beschrieben.
- Bei der Handhabung von Kitreagenzien Schutzkleidung und Einweg-Handschuhe tragen. Nach Beendigung des Tests gründlich die Hände waschen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In Bereichen, in denen mit Proben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Nicht verbrauchte Reagenzien und Abfälle gemäß geltender gesetzlicher Bestimmungen entsorgen.

Mitgelieferte Materialien

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

- Master-Mix (*Master Mix*)
- Kontroll-DNA (*Control DNA*)
- Verdünnungspuffer (*Diluent*)
- SmartCycler®-Reaktionsröhrchen, 25 µl
- Etiketten zur Probenkennzeichnung

Lagerung, Handhabung und Stabilität

Gesammelte Proben

Proben während des Transports bei 2–25 °C lagern. Vor Einfrieren oder übermäßiger Hitzeeinwirkung schützen.

Proben können vor dem Testen bis zu 5 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Proben, die innerhalb von 36 Stunden getestet werden, können bei Raumtemperatur (15–25 °C) aufbewahrt werden.

Reagenzien

Hinweis: Gemäß den auf jedem Beutel verzeichneten Angaben lagern.

Kitkomponente		<i>Master Mix und Control DNA</i> (weiß/rot-gestreifte Etiketten)	<i>Lysis tube</i> (gelbe Verschlusskappe)	<i>Sample Buffer und Diluent (blaue</i> Verschlusskappe bzw. schwarz- gestreiftes Etikett)
Versiegelter Beutel	Temperatur	2–25 °C	2–25 °C	2–25 °C
	Stabilität	Verfallsdatum	Verfallsdatum	Verfallsdatum
Geöffneter Beutel	Temperatur	2–8 °C ¹	2–25 °C ²	2–25 °C ²
	Stabilität	1 Monat ³	Verfallsdatum	2 Monate ³

¹ Nach Aufbrechen des Originalsiegels von Master-Mix und Kontroll-DNA den Beutel nach jedem Gebrauch mit dem Zippverschluss sorgfältig verschließen und bei der entsprechenden Temperatur lagern.

² Auch wenn diese Reagenzien bei Raumtemperatur gelagert werden können, sollten sie mit den anderen Reagenzien derselben Charge bei 2–8 °C aufbewahrt werden.

³ Mitgelieferte Beutel sollten nach jedem Gebrauch mit dem Zippverschluss fest verschlossen werden.

Kitkomponenten außerhalb des Schutzbeutels		<i>Master Mix und Control DNA</i> (weiß/rot-gestreifte Etiketten)	
Nicht rekonstituierte Röhrchen	Temperatur	15–25 °C	
	Stabilität	2 Stunden	
Rekonstituierte Röhrchen ¹	Originalbehälter	Temperatur	2–8 °C
		Stabilität	3 Stunden
	SmartCycler®- Reaktionsröhrchen	Temperatur	2–8 °C
		Stabilität	1 Stunde

¹ Nicht verwendete Röhrchen nach Ablauf der angegebenen Stabilitätsperiode verwerfen.

Nicht mitgelieferte, aber erforderliche Materialien

- **BBL™ CultureSwab™ Liquid Stuart** (Becton Dickinson, Bestell-Nr. 220099), **Copan Transystem™ Liquid Stuart** (Copan Italia International, Bestell-Nr. 141C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Liquid Stuart** (Copan Diagnostics Inc., Bestell-Nr. 141C.US), oder
- **BBL™ CultureSwab™ Liquid Amies** (Becton Dickinson, Bestell-Nr. 220093), **Copan Transystem™ Liquid Amies** (Copan Italia International, Bestell-Nr. 140C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Liquid Amies** (Copan Diagnostics Inc., Bestell-Nr. 140C.US), oder
- **BBL™ CultureSwab™ Plus Amies Gel ohne Kohle** (Becton Dickinson, Bestell-Nr. 220116), **Copan Transystem™ Plus Amies Agargel ohne Kohle** (Copan Italia International, Bestell-Nr. 108C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Plus Amies Gel ohne Kohle** (Copan Diagnostics Inc., Bestell-Nr. 108C.US), oder
- **BBL™ CultureSwab™ Plus Amies Gel mit Kohle** (Becton Dickinson, Bestell-Nr. 220121), **Copan Transystem™ Amies Agargel mit Kohle** (Copan Italia International, Bestell-Nr. 114C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Amies Gel mit Kohle** (Copan Diagnostics Inc., Bestell-Nr. 114C.US).
- **Gallen-Äsculin-Azid-Agarplatten mit Zusatz von 6 µg/mL Vancomycin**
- **Vortex** Genie 2 (Fisher) mit 1,5 mL Mikroröhrchenhalter oder vergleichbares Produkt. Zur Verarbeitung mehrerer Proben können Adapter mit Mehrfachprobeneinsätzen verwendet werden.
- **Mikropipetten** (Genauigkeitsbereich 1–10 µl, 10–100 µl und 100–1000 µl)
- **Sterile DNase-freie Mikropipettenspitzen** mit Filterblockierung oder positiver Verdrängung
- **DNase-freie Mikrozentrifugenröhrchen**
- **Schere**
- **Gaze**

- Einweghandschuhe, ungepudert
- **Mikrozentrifuge** zur Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit
- **Trockenheizblock** für 1,5 mL Röhrrchen oder Wasserbad
- Eis oder **Kühlblock** für 1,5 mL Röhrrchen
- Verschlusskappenentferner (z. B. MATRIX, Katalog-Nr. 4469) (optional)
- Stoppuhr oder **Laborwecker**
- **SmartCycler®-Startersystem** mit **Dx-Software** (PCR-Block, Bedienungsanleitung, Zubehörkit und Computer)

Gebrauchsanleitung

Probenentnahme

Um eine geeignete Probe zu erhalten, muss diese Arbeitsanleitung zur Probenentnahme genau befolgt werden.

Mit einem der empfohlenen **Abstrichtupfer** (siehe Abschnitt „Nicht mitgelieferte, aber erforderliche Materialien“) eine Perianal- und/oder Rektalprobe gemäß des folgenden Verfahrens entnehmen (Schritte 2, 3, 4 und 5 sind für alle drei Abstrichtechniken gleich):

- a. Zur Entnahme einer Perianalprobe: Den perianalen Bereich abtupfen.
- b. Zur Entnahme einer Rektalprobe: Den Abstrichtupfer ca. 2,5 cm (1 Zoll) über den Afterschließmuskel hinaus einführen und Abstrichtupfer fünf Mal abrollen.
- c. Zur Entnahme einer Perianal-/Rektalprobe: Den Perianalbereich abstreichen, dann den Abstrichtupfer ca. 2,5 cm (1 Zoll) über den Afterschließmuskel hinaus einführen und Abstrichtupfer fünf Mal abrollen.
2. Den Abstrichtupfer in den Behälter zurücklegen.
3. Den Behälter beschriften.
4. Den Abstrichtupfer gemäß den Standardarbeitsanweisungen des Krankenhauses zum Labor schicken.
5. Siehe auch Abschnitt „Lagerung, Handhabung und Stabilität – Lagerung und Handhabung entnommener Proben“.

Probenvorbereitung

Hinweis: Für jede zu testende Probe ist ein *Sample Buffer* (Probenpufferröhrrchen, blaue Verschlusskappe) und ein *Lysis tube* (Lyseröhrrchen **gelbe Verschlusskappe**) erforderlich. Die benötigte Anzahl Röhrrchen aus den Schutzbeuteln nehmen, **überschüssige Luft entfernen und die Beutel mit dem Zippverschluss schnell wieder verschließen**.

Die Abstrichproben können vor der Durchführung des BD GeneOhm™ VanR-Tests kultiviert werden. Genaue Angaben siehe Abschnitt „Kultivierung klinischer Proben – Plattenausstrichmethode“.

1. **Die Entnahmevorrichtung (Abstrichtupfer) in ein Probenpufferröhrrchen (blaue Verschlusskappe) überführen.**
Das Probenpufferröhrrchen auf der Kappe und/oder dem Röhrrchenetikett beschriften.
2. **Den Stiel des Abstrichtupfers abbrechen und Röhrrchen fest verschließen.**
Den Abstrichtupfer am Stiel nahe dem Röhrrchenrand fassen (Gaze verwenden, um Kontaminationsrisiko zu verringern). Den Abstrichtupfer einige Millimeter vom Boden anheben und den Stiel zum Abbrechen gegen die Röhrrchenkante drücken. Alternative Methode: Den Stiel mit einer sauberen Schere abschneiden. Vergewissern Sie sich, dass die Verschlusskappe fest schließt.
3. **Bei maximaler Geschwindigkeit 1 Minute mit dem Vortexer mischen.**
Bei Verarbeiten von mehreren Proben kann ein Adapter mit Mehrfachprobeneinsätzen verwendet werden.
4. **50 µL Zellsuspension in ein Lyseröhrrchen (gelbe Verschlusskappe) überführen.**
Genaue Angaben zum Kultivieren von Proben mit der verbleibenden Zellsuspension bzw. dem Abstrichtupfer siehe Abschnitt „Kultivierung klinischer Proben – Anreicherungsmedium“.
5. **Lyseröhrrchen 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit mit dem Vortexer mischen.**
Bei Verarbeiten von mehreren Proben kann ein Adapter mit Mehrfachprobeneinsätzen verwendet werden.
6. **Das Lyseröhrrchen kurz abzentrifugieren (quick spin).**
Für 2–5 Sekunden bei niedriger Umdrehung zentrifugieren, um den festen Inhalt auf den Röhrrchenboden zu bringen.
7. **Für 2 Minuten bei 95 ± 2 °C erhitzen.**
Dafür einen für 1,5 mL Röhrrchen bestimmten Trockeneisblock oder ein Wasserbad verwenden.
8. **Das Lyseröhrrchen auf Eis oder in einen Kühlblock aufbewahren.**
Lysate sind bei 2–8 °C bis zu 4 Stunden stabil.

BD GeneOhm™ VanR-Testverfahren

Hinweis: Ein rekonstituiertes Röhrrchen mit Master-Mix (Master Mix, **weißes Etikett**) enthält ausreichend Reagenz für **8 Reaktionen**. Ein SmartCycler®-Röhrrchen für jede zu testende Probe und 2 weitere SmartCycler®-Röhrrchen für die positive- und negative Kontrolle verwenden. **Bei jedem BD GeneOhm™ VanR-Testlauf muss eine (1) positive und eine (1) negative Kontrolle mitgeführt werden.** Für jeden Testlauf ist eine *Control DNA* (Kontroll-DANN, **rotgestreiftes Etikett**) erforderlich (positive Kontrolle). Ein (1) Röhrrchen mit *Diluent* (Verdünnungspuffer **schwarzgestreiftes Etikett**) ist zur Rekonstitution von bis zu 3 Röhrrchen Master Mix erforderlich. Die benötigte Anzahl Röhrrchen aus den Schutzbeuteln nehmen, **überschüssige Luft entfernen und die Beutel mit dem Zippverschluss schnell wieder schließen**.

Nur soviel SmartCycler®-Röhrrchen vorbereiten, um die verfügbaren I-CORE®-Module in dem SmartCycler®-Gerät zu füllen.

1. **Die erforderliche Anzahl an Master-Mix-Röhrrchen auf Eis oder in einen Kühlblock für 1,5 mL Röhrrchen stellen.**

2. 225 µl Verdünnungspuffer (schwarzgestreiftes Etikett) zu jedem Master-Mix Röhrchen geben.

Die Spitze der Mikropipette durch das Septum der Verschlusskappe des Master-Mix Röhrchens einführen. Die Spitze nicht zu tief in die Verschlusskappe einführen. Das Verdünnungspuffer einspritzen. Anschließend nicht gebrauchtes Verdünnungspuffer verwerfen.

3. Röhrchen 5–10 Sekunden mit dem Vortexer mischen.

Röhrchen bis zur Weiterverwendung auf Eis oder in einen Kühlblock für 1,5 mL Röhrchen stellen. Rekonstituierte Master-Mix Röhrchen sind auf Eis oder in einem Kühlblock 3 Stunden stabil.

4. Ein Röhrchen Kontroll-DNA (rotgestreiftes Etikett) auf Eis oder in einen Kühlblock für 1,5 mL Röhrchen stellen.**5. 225 µl Probenpuffer (blaue Verschlusskappe) in das Röhrchen mit Kontroll-DNA geben.**

Die Spitze der Mikropipette durch das Septum der Verschlusskappe des Kontroll-DNA Röhrchens einführen. Die Spitze nicht zu tief in die Verschlusskappe einführen. Den Probenpuffer zugeben.

6. Das Röhrchen 5–10 Sekunden mit dem Vortexer mischen.

Röhrchen bis zur Weiterverwendung auf Eis oder in einen Kühlblock für 1,5 mL Röhrchen stellen.

7. Die benötigte Anzahl SmartCycler®-Röhrchen in den SmartCycler®-Kühlblock setzen.

Es sind ein SmartCycler®-Röhrchen pro Probe sowie zwei weitere SmartCycler®-Röhrchen für die Kontrollen vorgesehen. **Die optischen Detektionsfenster an den unteren Röhrchenrändern und den unteren rautenförmigen Bereich nicht anfassen.**

Die folgenden Schritte MÜSSEN innerhalb EINER STUNDE durchgeführt werden:

8. 25 µl rekonstituierten Master-Mix in die SmartCycler®-Röhrchen geben.

Vor dem Pipettieren des Reagenzes die Verschlusskappe entfernen. Die Flüssigkeit in das Reservoir (oberer Teil) der SmartCycler®-Röhrchen geben. Die SmartCycler®-Röhrchen auf der Verschlusskappe beschriften. Dafür können die im Kit enthaltenen Etiketten zur Probenkennzeichnung verwendet werden. Nicht verwendeten Master-Mix verwerfen.

9. 3,0 µl jeder lysierten Probe in ein anderes der vorher mit rekonstituiertem Master-Mix befüllten SmartCycler®-Röhrchen geben. Röhrchen verschließen.

Beim Pipettieren aus den Lyseröhrchen darauf achten, dass keine Perlen mitgeführt werden. Nach Zugabe der Probe zum SmartCycler®-Röhrchen, 2–3-mal im Reservoir auf- und abpipettieren, um sicherzustellen, dass die vollständige Menge abgegeben wurde. Für jede Probe eine neue Mikropipettenspitze verwenden.

10. 3,0 µl der rekonstituierten Kontroll-DNA in das vorletzte SmartCycler®-Röhrchen geben (Positivkontrolle). Röhrchen verschließen.

Nach der Zugabe der DNA 2–3-mal im Reservoir auf- und abpipettieren, um sicherzustellen, dass das gesamte Volumen abgegeben wurde. Als Positivkontrolle kennzeichnen. Nicht gebrauchte Kontroll-DNA verwerfen.

11. 3,0 µl Probenpuffer (blaue Verschlusskappe) in das letzte SmartCycler®-Röhrchen (Negativkontrolle) geben. Röhrchen verschließen.

Das Röhrchen mit Probenpuffer aus Schritt 5 verwenden. Dies dient zur Kontrolle von PCR-Verunreinigungen, die während des Umgangs mit den Proben auftreten könnten. Als Negativkontrolle kennzeichnen. Nicht gebrauchten Probenpuffer danach verwerfen.

12. Alle Reaktionsröhrchen 5–10 Sekunden zentrifugieren.

Dafür die speziell adaptierte mit dem SmartCycler® mitgelieferte Mikrozentrifuge verwenden.

13. Vor Beladen des Geräts die Röhrchen bei 2–8 °C auf dem SmartCycler® Kühlblock belassen.

Bei Bedarf die verbleibenden Lysate zur späteren Verwendung bei -20 ± 5 °C einfrieren.

14. Einen Testlauf gemäß dem BD GeneOhm™ VanR-Testprotokoll erstellen.

Siehe die Bedienungsanleitung der SmartCycler® Dx-Software.

15. Alle Reaktionsgefäße in ein I-CORE®-Modul des SmartCyclers® setzen und den Deckel des I-CORE® schließen.

Die Positiv- und Negativkontrolle an die dafür vorgesehene Position (siehe Abschnitt „Qualitätskontrolle“) setzen. Alle Röhrchen fest andrücken.

16. Den Testlauf starten.

Qualitätskontrolle

Positiv- und Negativkontrollen

Qualitätskontrollverfahren sind dafür vorgesehen, die Testleistung zu überprüfen. Die positive Kontrolle dient dabei zur Überprüfung auf schwerwiegendes Reagenzienversagen. Die Negativkontrolle dient zur Erkennung von Verunreinigungen der Reagenzien oder aus dem Umfeld (oder carry-over), durch jedwede DNA, die vanA- oder vanB-Gene oder -Amplikons enthält. Positiv- und Negativkontrollen sind Testkontrollen (Testlaufkontrollen). Eine ungültige Kontrolle macht den ganzen Testlauf ungültig. Die jeder Reaktionsmischung hinzugefügte interne Kontrolle dient zur Prüfung auf PCR-hemmenden Substanzen in jeder negativen Probe sowie der Reagenzienintegrität. Alle Kontrollen müssen gültige Ergebnisse ergeben (keine ungültige Positiv- oder Negativkontrollen).

Bei jedem Testlauf des SmartCyclers® muss je eine Positiv- und Negativkontrolle mit eingeschlossen sein. s

Verfahrenskontrollproben

Nach den Richtlinien oder Anforderungen geltender gesetzlicher Bestimmungen bzw. von Zulassungsorganisationen können Kontrollstämme getestet werden. Ein VRE-Referenzstamm (z. B. American Type Culture Collection, ATCC 51299) oder ein gut charakterisiertes klinisches VRE-Isolat kann als eine positive Verfahrenskontrollprobe verwendet werden, während eine Kultur mit vancomycinempfindlichen Enterokokken (z. B. ATCC 29212) oder anderen nicht *VanA/B*-VRE (z. B. *Enterococcus gallinarum* ATCC 700425) als negative Verfahrenskontrollprobe verwendet werden kann.

Isolierte Kolonien von einer 18- bis 24-h inkubierten 5 % Schaffblutagarplatte in Kochsalzlösung bis zu einer Trübung von 0,5 McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ KBE/mL) resuspendieren. Weiter mit Kochsalzlösung verdünnen, um eine Suspension mit $\sim 10^8$ KBE/mL zu erhalten. Einen der empfohlenen Abstrichtupfer (siehe Abschnitt „Nicht mitgelieferte, aber erforderliche Materialien“) in die Bakteriensuspension tauchen und überschüssige Flüssigkeit ausdrücken. Wie eine klinische Probe

verarbeiten und testen (siehe die Abschnitte „Probenvorbereitung“ und „BD GeneOhm™ VanR-Testverfahren“). Die Verfahrenskontrollproben müssen gültige Ergebnisse erzielen.

Hinsichtlich allgemeiner QC-Richtlinien sei der Benutzer auf die CLSI MM3⁸ and C24⁹ hingewiesen.

Kultivierung klinischer Proben

Zur Speziesidentifizierung, antimikrobieller Empfindlichkeitsprüfung oder epidemiologischer Typisierung können klinische Proben an zwei verschiedenen Schritten des BD GeneOhm™ VanR-Testverfahrens kultiviert werden. Kulturen können mit dem Entnahmegesäß (Abstrichtupfer) mithilfe des Plattenausstrichverfahrens vor Durchführen des BD GeneOhm™ VanR-Tests angelegt werden oder aus der Zellsuspension nach einem Anreicherungsprozess (nach Suspension der Zellen in Probenpuffer während der Probenvorbereitung).

Plattenausstrichmethode

Diese Kulturmethode sollte vor der BD GeneOhm™ VanR-Probenvorbereitung durchgeführt werden.

1. Eine Erstisierungsplatte für VRE durch Ausstreichen des entnommenen Abstrichtupfers auf den ersten Quadranten der Platte animpfen.
Es wird eine Gallen-Äsculin-Azid-Platte mit 6 µg/mL Vancomycin (BEAV) empfohlen.
2. Den Abstrichtupfer in seinen Behälter zurückgeben oder in ein Probenpufferröhrchen (blaue Verschlusskappe) überführen und den Stiel abbrechen. Fahren Sie dann gemäß den Anweisungen im Abschnitt Probenvorbereitung fort.
3. Mit einer sterilen Impfpöse das Inokulum auf die verbleibenden Quadranten der Platte ausstreichen.
4. Die Platte 24–72 Stunden bei 35 °C inkubieren.
5. *Enterokokken*kolonien identifizieren und bestätigen und gemäß den Standardmethoden auf Vancomycinresistenz testen.

Anreicherungsmedium

Diese Kulturmethode kann mit der im Probenpufferröhrchen verbliebenen Zellsuspension durchgeführt werden, nachdem 50 µL Zellsuspension in das Lyseröhrchen überführt wurden. In geschlossenen Probenpufferröhrchen kann die Zellsuspension bei 2-8 °C für bis zu 24 Stunden vor Kultivierung aufbewahrt werden. Möglicherweise ist eine Isolierung von Bakterien aus klinischen Proben mit geringem VRE-Gehalt nicht erfolgreich.

1. 300 µL Zellsuspension zu 5 mL Anreicherungsmedium geben.
Es wird Gallen-Äsculin-Azid-Medium empfohlen.
2. 2–5 Sekunden mit Vortexer mischen.
3. 24–48 Stunden bei 35 °C inkubieren.
4. Auf einem entsprechenden festen Medium für 24–72 Stunden bei 35 °C subkultivieren.
Es wird eine BEAV-Platte empfohlen.
5. *Enterokokken*kolonien identifizieren und bestätigen und gemäß den Standardmethoden auf Vancomycinresistenz testen.

Interpretation der Ergebnisse

Der Entscheidungsalgorithmus für den BD GeneOhm™ VanR-Test ist die SmartCycler®-Software eingebettet. Die Interpretation der Testergebnisse wird nach folgenden Kriterien vorgenommen:

Probenotyp	Testergebnis des Geräts ¹	IC-Ergebnis des Geräts ¹	Anwenderinterpretation der Ergebnisse
Klinische Probe	NEG (NEG)	PASS (BESTANDEN)	Keine <i>VanA</i> - oder <i>VanB</i> -DNA nachweisbar.
	POS (POS)	NA (ENTFÄLLT)	DNA des <i>vanA</i> -Resistenzgens nachgewiesen (kein <i>VanB</i> nachweisbar), vermutlich vancomycinresistente Enterokokken (VRE).
	PRESUMPTIVE POS (VERMUTLICH POS)	NA (ENTFÄLLT)	DNA des <i>VanB</i> -Resistenzgens nachgewiesen ² (kein <i>VanA</i> nachweisbar), vermutlich vancomycinresistente Enterokokken (VRE), <i>VanB</i> -Resistenzgen stammt möglicherweise von einem anderen Organismus.
	POSITIVE (POSITIV)	NA (ENTFÄLLT)	DNA von <i>VanA</i> - und <i>VanB</i> -Resistenzgenen nachgewiesen, vermutlich vancomycinresistente Enterokokken (VRE). ³
	UNRESOLVED (NICHT AUFGEKLÄRT)	FAIL (NICHT BESTANDEN)	Nicht aufgeklärt – hemmende Substanzen oder Reagenzienversagen.
	ND (NICHT BESTIMMT)	ND (NICHT BESTIMMT)	Nicht bestimmbar aufgrund I-CORE®-Modulfehler (mit Warnung oder Fehlercode ¹)
Positivkontrolle	VALID (GÜLTIG)	NA (ENTFÄLLT)	Gültige Positivkontrolle, gültiger Testlauf, wenn Negativkontrolle ebenfalls gültig.
	INVALID (UNGÜLTIG)	NA (ENTFÄLLT)	Ungültige Positivkontrolle, ungültiger Lauf. ⁴ Testergebnisse sind ungültig und dürfen nicht einbezogen werden.
Negativkontrolle	VALID (GÜLTIG)	PASS (BESTANDEN)	Gültige Negativkontrolle, gültiger Testlauf, wenn Positivkontrolle ebenfalls gültig.
	INVALID (UNGÜLTIG)	FAIL (NICHT BESTANDEN)	Ungültige Negativkontrolle, ungültiger Lauf. ⁴ Testergebnisse sind ungültig und dürfen nicht einbezogen werden.

IC - Internal Control (interne Kontrolle)

HINWEISE: ¹ Zur Interpretation von Warnhinweisen und Fehlermeldungen siehe die Bedienungsanleitung der SmartCycler® Dx-Software.

² Für *VanB* positive, aber *VanA* negative Proben sollte eine Kultur angelegt werden, um die Anwesenheit von vancomycinresistenten Enterokokken zu bestätigen.

³ Legen Sie, falls es aus epidemiologischen Gründen notwendig ist, das *VanB*-Gen zu bestätigen, erst eine Kultur an und führen dann *VanB*-Bestätigungstests durch.

⁴ Ungültige Testläufe oder Gerätefehlermeldungen und Warnhinweise werden auf dem Bildschirm und auf den Berichten angezeigt. Vor der Bekanntgabe von *VanA*- und *VanB*-Ergebnissen immer sicherstellen, dass der Testlauf gültig ist.

Im Falle, dass Verfahrenskontrollproben (SPC) getestet wurden, muss der Anwender das Ergebnis selbst interpretieren.

Ungültiger Testlauf

Für alle klinischen Proben innerhalb dieses Testlaufs neue Reaktionsgefäße sowie Kontrollröhrchen vorbereiten und eingefrorene(n) Lysat(e) wiederverwenden.

Nicht aufgeklärte Proben

Mit dem/den entsprechenden eingefrorenen Probenlysat(en) den Test wiederholen. Einfrieren und Auftauen kann nachweislich PCR-Hemmsubstanzen reduzieren.

Proben nicht bestimmbar aufgrund I-CORE®-Modulfehler

Mit dem/den entsprechenden eingefrorenen Probenlysat(en) den Test wiederholen. Zur Interpretation von Warnhinweisen und Fehlermeldungen siehe die Bedienungsanleitung der SmartCycler® Dx-Software.

Verfahrensbeschränkungen

- Die Verwendung dieses Produkts mit einem anderen automatischen Real-Time PCR-Gerät als dem SmartCycler® oder die Durchführung der Probenentnahme und Verwendung eines nicht im Abschnitt „Nicht mitgelieferte, aber erforderliche Materialien“ aufgelisteten Transportsystems, ist nicht empfehlenswert, da dafür keine Leistungsmerkmale erstellt wurden.
- Die Leistungseigenschaften dieses Produkts wurden nicht mit anderen klinischen Proben bestimmt.
- Negative Testergebnisse können von unsachgemäßer Probenentnahme, Handhabung und Lagerung, der Anwesenheit von Hemmstoffen, technischen Fehlern und Probenverwechslung verursacht sein, oder weil die Anzahl der Organismen in der Probe unterhalb der analytischen Empfindlichkeit des Tests liegt. Sorgfältiges Befolgen der in diesem Beipackzettel sowie in der Bedienungsanleitung der SmartCycler® Dx-Software gegebenen Anweisungen ist zur Vermeidung fehlerhafter Ergebnisse unerlässlich. Dieser Test sollte nur von Personen durchgeführt werden, die mit dem Verfahren und dem Gebrauch des SmartCyclers® vertraut sind.
- BD GeneOhm™ VanR-Testergebnisse können gelegentlich Nicht aufgeklärt, Nicht bestimmbar (aufgrund eines I-Core®-Fehlers) oder Ungültig (aufgrund einer ungültigen Kontrolle) sein und einen Wiederholungstest erfordern.
- Ein positives Testergebnis weist nicht unbedingt auf die Anwesenheit lebensfähiger Organismen hin; es kann auch durch eine gleichzeitige Antibiotikatherapie beeinflusst sein. Ein positives Ergebnis lässt jedoch stark die Anwesenheit von VRE vermuten, basierend auf dem Nachweis der *VanA*- und *VanB*-Gene. Der Test weist keine Enterokokken nach. Der Test kann aber *VanA*- und *VanB*-Gene nachweisen, die von Nicht-Enterokokken getragen werden.
- Mutationen oder Polymorphismen in Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter VRE-Varianten beeinträchtigen und zu falsch negativen Testergebnissen führen.

- Wenngleich eine Reagenzienvorbereitung nicht erforderlich ist und die Haupttechnik aus Pipettieren besteht, ist für eine korrekte Testdurchführung eine gute Labortechnik unerlässlich. Aufgrund der hohen analytischen Empfindlichkeit dieses Tests sollte sorgfältig darauf geachtet werden, die Reinheit der Reagenzien zu erhalten, besonders in Fällen, wo mehrere Aliquots aus einem Röhrchen entnommen werden.
- Überwachungstests bestimmen den Status der Kolonisierung zu einem bestimmten Zeitpunkt und können variieren, abhängig von der Behandlung des Patienten, dem Patientenstatus oder einer Aussetzung in Hochrisikobereichen (z. B. Kontakt mit VRE-Träger, verlängerter Krankenhausaufenthalt). Das Überwachen des Kolonisierungsstatus sollte laut den in der Klinik geltenden Regeln vorgenommen werden.
- Positive BD GeneOhm™ VanR-Ergebnisse für *VanB* in Abwesenheit von *VanA* können auf andere Organismen als VRE zurückzuführen sein. Es wird empfohlen, zur Bestätigung dieser Organismen eine Kultur anzulegen.
- Wie in der Literatur beschrieben, können einige anaerobe Bakterien gefunden werden, die das *VanB*-Gen enthalten,^{10,11,12} und die dieser Test nachweisen würde. Die klinische Relevanz solcher Befunde ist allerdings nicht bekannt. Es wurde darauf hingewiesen, dass anaerobe, *VanB*-Gen positive Bakterien ein Reservoir von Vancomycinresistenzdeterminanten bilden². Diese Hypothese ist allerdings nicht gesichert.
- Es wurden bei Patienten vancomycinresistente *Staphylococcus aureus*-Stämme, die das *VanA* Vancomycinresistenz-Gen enthalten, identifiziert.¹³ Diese würden sehr wahrscheinlich mit diesem Test positiv getestet.
- Eine niedrige Anzahl an Kopien der *VanA*-Zielssequenz kann möglicherweise in Anwesenheit einer sehr hohen Anzahl Kopien der *VanB*-Zielssequenz ($\geq 10^5$ DNA-Kopien/PCR) nicht nachgewiesen werden.

Störsubstanzen

Die Tests können möglicherweise u. a. durch folgende Substanzen gestört werden: Blut, Fäzes, Schleim, Gleitmittel und Substanzen, die Hämorrhoiden-Beschwerden lindern.

Leistungsmerkmale

Klinische Leistung

Die Leistungsmerkmale des BD GeneOhm™ VanR-Tests wurden in einer multizentrischen prospektiven Studie bestimmt: An dieser Studie nahmen drei Kliniken teil. Um an dieser Studie teilnehmen zu können, mussten die Proben von Personen stammen, für die gemäß der Klinikregelungen Kulturen angelegt und/oder angefordert wurden.

Die Referenzmethode bestand aus einer Erstanalyse mit einer Gallen-Äsculin-Azid-Agarplatte mit 6 mg/mL Vancomycin (BEAV). Bestätigte Enterokokenkolonien wurden auf Vancomycinresistenz getestet. VRE-negative Proben wurden in einem Anreicherungsschritt in Gallen-Äsculin-Azid-Medium mit 6 µg/mL Vancomycin (BEAV) weiter analysiert. Phänotypidentifizierung auf *VanA* und *VanB* wurde durch minimale Hemmkonzentrationstests (MHK) für Vancomycin und Teicoplanin vollzogen. Eine auf *VanA* und/oder *VanB* VRE-positive Probe war definiert als eine Probe, die durch Kultur und MHK-Tests als auf *VanA* und/oder *VanB* positiv befundet wurde. Eine auf *VanA* und/oder *VanB* VRE-negative Probe war definiert als eine Probe, die mittels Erstkultur und Anreicherungskulturmethode auf *VanA* und *VanB* als negativ befundet wurde.

Für die Screeningmethode mit selektivem Wachstum auf BEAV wurden Platten direkt mit Abstrichproben angeimpft und bei 35 °C für 24–48 Stunden inkubiert. Mutmaßliche Kolonien von *Enterococcus* wurden auf 5 % Schafblutagarplatten subkultiviert und für 18–24 Stunden bei 35 °C inkubiert. Mutmaßliche Kolonien, der Gattung *Enterococcus* wurden dem Pyrrolidonyl-Arymalidase (PYR) Test unterzogen. Bei einem positiven PYR-Test wurde die Identifizierung der Enterokokkenspezies mit den entsprechenden kommerziell erhältlichen Tests durchgeführt. Vancomycin- und Teicoplaninresistenz für bestätigte Enterokokken wurde mit der MHK-Methode bestimmt. VRE-Screening mit einem Anreicherungsschritt in BEAV-Medium (Vancomycin 6 µg/mL) wurde ebenfalls in Fällen durchgeführt, wo mit dem BEAV-Platten-Screening ein empfindliches oder intermediäres Ergebnis für VRE erzielt wurde. Zu diesem Zweck wurden BEAV-Medien angeimpft nach direkter Kultur auf BEAV-Platten und bei 35 °C für 24–48 Stunden inkubiert. BEAV-Medien, die ein schwarzes Wachstum zeigten, wurden subkultiviert auf BEAV-Platten (Vancomycin 6 µg/mL) und 24–48 Stunden bei 35 °C inkubiert. Mutmaßliche Kolonien von *Enterococcus* wurden auf 5 % Schafblutagarplatten subkultiviert und 18–24 Stunden bei 35 °C inkubiert. Bestätigung der Kolonien und Nachweis der Vancomycin-/Teicoplaninresistenz wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Proben mit bestätigten vancomycinresistenten Enterokokken wurden als positiv betrachtet.

Tabelle 1 zeigt die übereinstimmenden und nicht übereinstimmenden Endergebnisse (823) des BD GeneOhm VanR™-Tests im Vergleich zur Referenzmethode. 89 Proben waren negativ mit der Kultur, aber positiv auf *VanB* durch PCR, was möglicherweise Nicht-Enterokokken anzeigt, die das *VanB*-Gen tragen.

Insgesamt wurden 836 Perianal- oder Rektalproben entnommen und mit der oben beschriebenen Referenzmethode sowie dem BD GeneOhm™ VanR-Test auf Anwesenheit vancomycinresistenter Enterokokken untersucht (Tabelle 2). Im Vergleich zur Referenzmethode identifizierte der BD GeneOhm™ VanR-Test 92,3 % der positiven und 83,5 % der negativen Proben.

Im Vergleich zur Referenzmethode erkannte der BD GeneOhm™ VanR-Test 94,5 % bzw. 90,0 % der positiven Perianal- und Rektalproben und identifizierte 88,0 % bzw. 76,1 % der negativen Perianal- und Rektalproben (Tabelle 3).

54 Proben waren anfangs nicht aufzuklären (z.B. Versagen der internen Kontrolle) entsprechend 6,5 %. Nach Wiederholungstests ergaben 41 dieser Proben einen klaren Befund, wobei 13 Proben auch weiterhin nicht aufzuklären waren, was einer Rate von 1,6 % entsprach (Tabelle 4).

Drei Läufe von insgesamt 87 ergaben ein ungültiges Ergebnis (z.B.. Versagen der Positiv- und/oder Negativkontrollen), was einem Gesamtanteil von 3,4 % entsprach (Tabelle 5).

Tabelle 1 Erzielte Ergebnisse des BD GeneOhm™ VanR-Tests im Vergleich zur Referenzmethode

		Ergebnisse der Kultur			Gesamt
		VanA	VanB	Negativ	
BD GeneOhm™ VanR-Ergebnisse	VanA	96	0	18	114
	VanA und VanB	23	2	5	30
	VanB	6	5	89	100
	Negativ	10	1	568	579
	Gesamt	135	8	680	823

Tabelle 2 Prüfzentrenspezifische und gesamte mit dem BD GeneOhm™ VanR-Test erhaltene klinische Leistung im Vergleich zur Referenzmethode.

Prüfzentrum	VRE-Prävalenz	Empfindlichkeit des BD GeneOhm™ VanR mit 95%-CI ¹	Spezifität des BD GeneOhm™ VanR mit 95%-CI ¹
Zentrum 1	17,1% (55/322)	98,2% (54/55) (90,3%–100,0%)	83,8% (218/260) (78,8%–88,1%)
Zentrum 2	10,9% (26/239)	88,5% (23/26) (69,8%–97,6%)	90,1% (192/213) (85,3%–93,8%)
Zentrum 3	23,6% (65/275)	88,7% (55/62) (78,1%–95,3%)	76,3% (158/207) (69,9%–81,9%)
Gesamte Studie	17,5% (146/836)	92,3% (132/143) (86,7%–96,1%)	83,5% (568/680) (80,5%–86,2%)

Zentrum 1 sammelte ausschließlich Perianalabstriche, Zentrum 3 nahm ausschließlich Rektalabstriche ab und Zentrum 2 sammelte sowohl Perianal- als auch Rektalabstriche.
¹ Binomiale 95 % Vertrauensbereiche.

Tabelle 3 Mit dem BD GeneOhm™ VanR-Test erhaltene klinische Leistung nach Probenotyp und Gesamt im Vergleich zur Referenzmethode

Proben- typ	Empfindlichkeit des BD GeneOhm™ VanR mit 95%-CI	Spezifität des BD GeneOhm™ VanR mit 95%-CI
Perianal	94,5% (69/73) (86,6%–98,5%)	88,0% (374/425) (84,5%–90,9%)
Rektal	90,0% (63/70) (80,5%–95,9%)	76,1% (194/255) (70,4%–81,2%)
Gesamte Studie	92,3% (132/143) (86,7%–96,1%)	83,5% (568/680) (80,5%–86,2%)

Tabelle 4 Anteile nicht aufgeklärter Proben (Erstuntersuchung und Wiederholung) mit dem BD GeneOhm™ VanR-Test

Prüfzentren	Anteil nicht abgeklärter Proben bei Erstuntersuchung mit 95%-CI	Anteil nicht abgeklärter Proben nach Wiederholung mit 95%-CI
Zentrum 1	14,6% (47/322) (10,9%–18,9%)	2,2% (7/322) (0,9%–4,4%)
Zentrum 2	0,0% (0/239) (0,0%–1,5%)	0,0% (0/239) (0,0%–1,5%)
Zentrum 3	2,5% (7/275) (1,0%–5,2%)	2,2% (6/275) (0,8%–4,7%)
Gesamte Studie	6,5% (54/836) (4,9%–8,3%)	1,6% (13/836) (0,8%–2,6%)

Tabelle 5 Anteile ungültiger Ergebnisse mit dem BD GeneOhm™ VanR-Test

Prüfzentrum	Anteil ungültiger Testläufe mit 95%-CI
Zentrum 1	7,1% (2/28) (0,9%–23,5%)
Zentrum 2	4,5% (1/22) (0,1%–22,8%)
Zentrum 3	0,0% (0/37) (0,0%–9,5%)
Gesamte Studie	3,4% (3/87) (0,7%–9,7%)

Testspezifität

Genomische DNA aus 129 Stämmen, die eng verwandte Organismen repräsentieren, wurden getestet - normale und pathogene Perianal- und Rektalflora, humane DNA oder exogene DNA, 28 Stämme (17 Referenzstämme und 11 klinische Isolate) von vancomycinempfindlichen Enterokokken oder vancomycinresistenten Enterokokken außer *VanA/VanB*. Keine der getesteten Proben war positiv, daher betrug die analytische Spezifität 100 %.

Testempfindlichkeit

Die analytische Empfindlichkeit (Nachweisgrenze, LOD) wurde mit 1 ATCC Stamm (700221) *VanA* vancomycinresistenter Enterokokken (*E. faecium*) und mit 1 ATCC Stamm (51299) *VanB* vancomycinresistenter Enterokokken (*E. faecalis*) bestimmt. Eine Kultur mit bekannter Organismenzahl und gereinigte, in Probenpuffer des BD GeneOhm™ VanR-Tests verdünnte genomische DNA wurden in fünffacher Wiederholung getestet. Die LOD war definiert als die niedrigste Konzentration (in DNA-Kopien/Reaktion und KBE/Reaktion), bei der fünf Wiederholungen von fünf als positiv getestet wurden.

Die LOD des BD GeneOhm™ VanR-Tests beträgt für *VanA* und *VanB* vancomycinresistente Enterokokken 10 Genomkopien pro Reaktion (oder 2 KBE/Reaktion). Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors aufgrund der Probenverarbeitung stellt die LOD ca. 1600 KBE/Abstrichtupfer dar.

Referenzen

- ¹ Rice LB. Emergence of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7(2).
- ² National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 to June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control.* 2004; 32:470-485.
- ³ Centers for Disease Control and Prevention. Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) and the Clinical Laboratory. 1999. <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/Lab/FactSheet/vre.htm>
- ⁴ Moellering RC Jr. Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Infectious Diseases.* 1998. 26(5):1196-1199.
- ⁵ Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations for Preventing the Spread of Vancomycin Resistance – Recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). 1995; vol. 44 (RR-12): 1-13.
- ⁶ 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.
- ⁷ Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (Refer to the latest edition).
- ⁸ Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline. Document MM3 (Refer to the latest edition).
- ⁹ Clinical and Laboratory Standards Institute Statistical Quality Control for Quantitative Measurements: Principles and Definitions; Approved Guideline. Document M29 (Refer to the latest edition).
- ¹⁰ Stinear TP, Olden DC, Johnson PD, Davies JK, Grayson ML. Enterococcal vanB Resistance Locus in Anaerobic Bacteria in Human Feces. *The Lancet.* 2001. 357:855-856.
- ¹¹ Ballard SA, Grabsch EA, Johnson PDR, Grayson ML. Comparison of Three PCR Primer Sets for Identification of vanB Gene Carriage in Feces and Correlation with Carriage of Vancomycin-Resistant Enterococci: Interference by vanB-Containing Anaerobic Bacilli. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2005. 49(1): 77-81.
- ¹² Domingo M.-C, Huletsky A, Bernal A, Giroux A, Boudreau DK, Picard FJ, Bergeron MG. Characterization of a Tn5382-like Transposon Containing the vanB2 Gene Cluster in a *Clostridium* Strain Isolated from Human Faeces. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2005. 55(4):466-74.
- ¹³ Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Pouch Downes F, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the vanA Resistance Gene. *New England Journal of Medicine.* 2003. 348:1342-1347.

Dieser Kit wird unter Lizenz des Public Health Research Institute der Stadt New York, Inc. verkauft und kann gemäß den PHRI-Patentrechten nur zur klinischen *In-vitro*-Diagnostik am Menschen verwendet werden.

Mit dem Kauf dieses Produkts erwirbt der Käufer das Recht, das Produkt für die Amplifikation und den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen in der *In-vitro*-Humandiagnostik zu benutzen. Durch diesen Kauf wird weder ein allgemeines Patent noch eine Lizenz irgendwelcher Art verliehen, sondern nur dieses spezifische Nutzungsrecht.

Dieses Produkt unterliegt einem Vertrag zwischen Molecular Probes, Inc. und GeneOhm Sciences, Inc. Herstellung, Gebrauch, Verkauf oder Import dieses Produkts kann von einem oder mehreren US-Patenten, Patentanmeldungen bzw. den ausländischen Entsprechungen der Molecular Probes, Inc. (einer hundertprozentigen Tochtergesellschaft der Invitrogen Corporation) abhängig sein. Der Erwerb dieses Produkts überträgt dem Käufer das nicht übertragbare Recht, die erworbene Produktmenge sowie die Bestandteile des Produkts für Tests auf Nukleinsäurenachweis zum Zweck der Identifizierung von Mikroorganismen in der Humandiagnostik zu verwenden. Der Käufer darf dieses Produkt oder seine Bestandteile nicht zur Herstellung oder therapeutischer bzw. prophylaktischer Anwendung, zum Verkauf oder anderweitigen Übertragung dieses Produkts oder seiner Bestandteile an Dritte, oder zu einer anderen Verwendung als in der Humandiagnostik verwenden. Informationen über den Erwerb einer Lizenz, dieses Produkts für andere Zwecke als der Humandiagnostik zu verwenden, erhalten Sie über Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402 (USA), Tel.: +1-541-465-8300; Fax: +1-541-335-0504.

Symbolindex

Symbol	Bedeutung	Symbol	Bedeutung
	Hersteller		Chargennummer
REF	Katalognummer		Temperaturbereich
	Nur zur <i>In-Vitro</i> Diagnostik		Vor Licht und Feuchtigkeit schützen
	Autorisierter Europäischer Vertreter		Beutel nach Gebrauch wieder verschließen
	Haltbar bis		Siehe Gebrauchsanweisung
	Enthält ausreichend Material für „n“ Tests	 Xi R36/38	Reizt die Augen und die Haut.
	Karton 1 von 3		



Kundendienst: 1.888.436.3646



BENEX Limited,
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare,
Ireland



GeneOhm Sciences Canada, Inc.
2555 boul. du Parc-Technologique
Québec, Qc, Canada, G1P 4S5

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company
© 2012 BD.