



Prueba BD GeneOhm™ VanR



REF 441250

48 PRUEBAS

IVD

REF 441251

200 PRUEBAS

Índice

Uso previsto	3
Resumen y explicación de la prueba	3
Principios del procedimiento	3
Reactivos	3
Precauciones	4
Materiales suministrados	4
Conservación, manejo y estabilidad	5
Muestras recogidas	5
Reactivos	5
Materiales necesarios pero no suministrados	5
Instrucciones de uso	6
Obtención de las muestras	6
Preparación de las muestras	6
Procedimiento de la prueba BD GeneOhm™ VanR	6
Control de calidad	7
Controles positivos y negativos	7
Controles de procesamiento de muestras	7
Cultivo de muestras clínicas	8
Método de extensión en placa	8
Caldo de enriquecimiento	8
Interpretación de los resultados	9
Serie analítica inválida	10
Muestra no resuelta	10
Muestra no determinada por fallo del módulo I-CORE®	10
Limitaciones del procedimiento	10
Sustancias interferentes	10
Características de rendimiento	10
Rendimiento clínico	10
Especificidad analítica	12
Sensibilidad analítica	12
Referencias	13
Índice de símbolos	14

Español

Uso previsto

La prueba BD GeneOhm™ VanR es una prueba cualitativa *in vitro* para la detección rápida de genes de resistencia a la vancomicina (*vanA* y *vanB*) directamente a partir de torundas perianales y/o rectales. La prueba BD GeneOhm™ VanR detecta la presencia de genes *vanA* y *vanB* que se pueden asociar con los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV). La prueba se lleva a cabo en un instrumento de PCR automatizado en tiempo real utilizando como muestras torundas perianales y/o rectales de personas que corren riesgo de colonización por ERV. La prueba BD GeneOhm™ VanR se puede utilizar para identificar, prevenir y controlar la colonización por microorganismos resistentes a la vancomicina en entornos de asistencia sanitaria. La prueba BD GeneOhm™ VanR no está indicada para diagnosticar infecciones por ERV ni para guiar o controlar el tratamiento de las infecciones por ERV. Se necesitan cultivos concomitantes para recuperar organismos para su tipado epidemiológico y para la posterior confirmación de la identificación.

Resumen y explicación de la prueba

La torunda perianal y/o rectal se recoge y se transporta al laboratorio utilizando un dispositivo de transporte recomendado (véase la sección "Materiales necesarios pero no suministrados"). La torunda se eluye en tampón de muestras y posteriormente se lisa la muestra. Se añade una alícuota del lisado a los reactivos de PCR que contienen los cebadores específicos de *vanA* y *vanB* utilizados para amplificar las dianas genéticas, en el caso de estar presentes. La prueba también contiene un control interno (CI) para detectar la presencia de inhibidores de la PCR y para confirmar la integridad de los reactivos analíticos. Las dianas amplificadas se detectan mediante sondas de hibridación marcadas con fluoróforos del tipo baliza molecular (*molecular beacon*). El software del instrumento Cepheid SmartCycler® lleva a cabo automáticamente la amplificación, detección e interpretación de las señales. Todo el proceso se realiza entre 60 y 75 minutos, en función del número de muestras procesadas. La recuperación de organismos para identificación de especies y tipado epidemiológico se puede realizar inoculando un medio de cultivo adecuado durante la preparación de las muestras o hasta 24 horas después de su procesamiento.

Los enterococos habitan en el tubo digestivo y se consideran flora normal. Su aparición como importantes patógenos hospitalarios en las últimas dos décadas se ha debido principalmente a su resistencia a muchos antibióticos de uso común^{1,2}. Aunque la mayoría de las infecciones enterocócicas se han atribuido a fuentes endógenas (flora normal del paciente), la transmisión se produce por las manos del personal, equipos de asistencia sanitaria o superficies del entorno contaminadas. El tratamiento de algunas infecciones enterocócicas se ha convertido en un desafío importante, especialmente con la aparición de cepas resistentes a la vancomicina. A pesar del hecho de que existen varios genes responsables de la resistencia a la vancomicina (intrínseca o adquirida), los genes *vanA* y *vanB* son los que se encuentran de forma predominante en los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV)³, y son los únicos clínicamente relevantes. El conocimiento del tipo de resistencia es crítico para fines de control de las infecciones. Los genes *vanA* y *vanB* son transferibles y se pueden transmitir de organismo en organismo. En contraste, los genes *vanC* no son transferibles, se han asociado con menos frecuencia con infecciones graves y no se han asociado con brotes². La presencia de ERV está aumentando en entornos de asistencia sanitaria y representa el 28,5% de los aislados enterocócicos en las unidades de cuidados intensivos de los hospitales estadounidenses². En EE.UU., el fenotipo *vanA* se observa aproximadamente en el 70% de los aislados de ERV y el fenotipo *vanB* aproximadamente en el 25%⁴. Los factores de riesgo de colonización e infección con ERV en entornos de asistencia sanitaria incluyen las hospitalizaciones prolongadas, la exposición a unidades de cuidados intensivos, servicios de trasplante u oncología, exposición anterior a antibióticos y proximidad a pacientes infectados o colonizados con ERV^{1,2,5}. El cribado precoz de los pacientes portadores de ERV, para identificar a los que requieren aislamiento, puede formar parte de un programa efectivo de control de infecciones para los ERV. Todas las técnicas aprobadas actualmente para detectar los ERV requieren un paso de cultivo y el aislamiento de colonias puras, seguido de pruebas de sensibilidad a la vancomicina o de la detección de los genes *vanA* y *vanB*. Esto aumenta el tiempo de determinación de la condición de portador de ERV a un mínimo de 48 horas, con una mediana de más de 72 horas. Con la rapidez a la que se pueden extender los ERV, especialmente en entornos de asistencia sanitaria donde los portadores son frecuentes, la capacidad de ofrecer resultados de la presencia perianal y/o rectal de ERV el día del ingreso representa una ventaja para los programas de control de infecciones.

Principios del procedimiento

Tras la lisis de las muestras, se amplifican las dianas genéticas *vanA* y *vanB*, si están presentes. Se producirá también la amplificación del CI, un fragmento de ADN de 294 pb que comprende una secuencia de 254 pb que no se encuentra en los ERV, a menos que estén presentes sustancias inhibitoras de la PCR.

Las dianas de ADN amplificadas son detectadas con sondas de baliza molecular, oligonucleótidos monocatenarios en forma de horquilla marcados en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En ausencia de la diana, la fluorescencia queda extinguida. En presencia de la diana, la estructura en forma de horquilla se abre tras la hibridación de la baliza con la diana, ocasionando la emisión de fluorescencia. Para la detección del amplicón *vanA*, la sonda de baliza molecular contiene el fluoróforo FAM en el extremo 5' y la porción extintora no fluorescente DABCYL en el extremo 3' del oligonucleótido. Para la detección del amplicón *vanB*, la sonda de baliza molecular contiene el fluoróforo Texas Red en el extremo 5' y el extintor DABCYL en el extremo 3'. Para la detección del amplicón CI, la sonda de baliza molecular contiene el fluoróforo TET en el extremo 5' y el extintor DABCYL en el extremo 3'. Cada híbrido baliza-diana emite fluorescencia a una longitud de onda característica del fluoróforo utilizado en esa sonda de baliza molecular concreta. La cantidad de fluorescencia en un ciclo determinado, o en subsiguientes ciclos, depende de la cantidad del amplicón específico presente en ese momento. El software SmartCycler® controla simultáneamente la fluorescencia emitida por cada sonda de baliza molecular, interpreta todos los datos y ofrece un resultado final cuando termina el programa de ciclos (véase la sección "Interpretación de los resultados").

Reactivos

Prueba BD GeneOhm™ VanR	48 pruebas	200 pruebas
Tampón de muestras (Sample Buffer)	60 X 1 mL	240 X 1 mL
Tampón Tris-EDTA		
Tubo de lisis (Lysis tube)	50 tubos	200 tubos
Microesferas de vidrio		
Mezcla maestra (Master Mix)	8 tubos	34 tubos
< 0,0005% de complejo de ADN polimerasa		
< 0,001% de control interno:	ADN no infeccioso que contiene secuencias de unión de los cebadores de <i>vanA</i> y <i>vanB</i> con una secuencia única para la hibridación de la sonda	
< 0,002% de cebadores		
< 0,002% de sondas moleculares		

< 0,05% de dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Albúmina de suero bovino

Carbohidrato

MgCl₂

< 0,001% de ADN genómico no infeccioso de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990)

ADN de control (Control DNA)

8 tubos

34 tubos

Tampón Tris-EDTA

Carbohidrato

< 0,001% de ADN genómico no infeccioso de *Enterococcus faecium* portador de *vanA* (ATCC 700221)

y de *Enterococcus faecalis* portador de *vanB* (ATCC 51299)

Diluyente (Diluent)

8 X 700 µL

34 X 700 µL

Tampón Tris-HCl

MgCl₂

(NH₄)₂SO₄

KCl

Precauciones

Solamente para diagnóstico *in vitro*.

- No utilizar el kit si el precinto de seguridad de la caja exterior está roto.
- No utilizar los reactivos si las bolsas protectoras están abiertas o desgarradas a su llegada.
- No retirar el desecante de las bolsas de mezcla maestra y de ADN de control.
- No utilizar los reactivos si no hay desecante dentro de las bolsas de mezcla maestra y de ADN de control.
- Cerrar rápidamente las bolsas protectoras de la mezcla maestra y del ADN de control con el cierre rápido después de cada uso.
- Los reactivos no son intercambiables entre lotes.
- Nunca se deben reunir reactivos de diferentes tubos, aunque sean del mismo lote.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad.
- No intercambiar las tapas entre los reactivos, ya que se puede producir contaminación, comprometiendo los resultados de la prueba.
- Evitar la contaminación de los reactivos con microorganismos y con desoxirribonucleasa (ADNasa) cuando se extraigan alícuotas de los tubos. Se recomienda el uso de puntas para pipetas estériles desechables libres de ADNasa bloqueadas con filtro o puntas para pipetas de desplazamiento positivo.
- Para evitar la contaminación ambiental con amplicones de *vanA* y *vanB*, no abrir los tubos de reacción después de la amplificación.
- Utilizar una punta de pipeta nueva para cada muestra o reactivo.
- La realización de la prueba fuera de los márgenes de tiempo recomendados puede producir resultados inválidos. Las pruebas no terminadas dentro de los márgenes especificados deben repetirse.
- Se pueden analizar controles adicionales de acuerdo con las directrices o requisitos de la normativa local, estatal, provincial y/o federal, o de las organizaciones de acreditación.
- En los casos en que el laboratorio lleve a cabo pruebas de PCR en tubo abierto en la misma zona general, se deben asignar zonas de trabajo separadas y segregadas para la preparación de muestras y para las actividades de amplificación/detección. Los suministros y el equipo deben ser específicos para cada zona y no deben trasladarse de una zona a otra. Hay que llevar siempre guantes y cambiarlos antes de pasar de una zona a otra. Hay que cambiar de guantes antes de manipular reactivos liofilizados.
- Manejar siempre las muestras como si fueran infecciosas y de conformidad con procedimientos de laboratorio seguros tales como los descritos en *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁶ y en el Documento M29 del CLSI⁷.
- Llevar indumentaria protectora y guantes desechables cuando se manejan reactivos del kit. Lavar bien las manos después de realizar la prueba.
- No pipetear con la boca.
- No fumar, beber ni comer en áreas donde se manipulan muestras o reactivos del kit.
- Desechar los reactivos no utilizados y los desechos de conformidad con la normativa nacional, federal, provincial, estatal y local.

Materiales suministrados

- Tampón de muestras (Sample Buffer)
- Tubo de lisis (Lysis tube)
- Mezcla maestra (Master Mix)
- ADN de control (Control DNA)
- Diluyente (Diluent)
- Tubos de reacción SmartCycler®, capacidad de 25 µL
- Etiquetas de identificación de muestras

Conservación, manejo y estabilidad

Muestras recogidas

Las muestras deben mantenerse entre 2 °C y 25 °C durante el transporte. Proteger las muestras frente a la congelación o la exposición a un calor excesivo.

Las muestras pueden conservarse hasta 5 días a 2-8 °C antes de su análisis. Las muestras que se puedan analizar en el plazo de 36 horas se pueden conservar a temperatura ambiente (15-25 °C).

Reactivos

Nota: Las condiciones de conservación deben seguir las especificaciones escritas en cada bolsa.

Componente del kit		Master Mix y Control DNA (etiquetas con banda blanca y roja)	Lysis tube (tapón amarillo)	Sample Buffer y Diluent (tapón azul y etiqueta con banda negra , respectivamente)
Bolsa cerrada	Temperatura	2-25 °C	2-25 °C	2-25 °C
	Estabilidad	Fecha de caducidad	Fecha de caducidad	Fecha de caducidad
Bolsa abierta	Temperatura	2-8 °C ¹	2-25 °C ²	2-25 °C ²
	Estabilidad	1 mes ³	Fecha de caducidad	2 meses ³

¹ Una vez abierto el cierre original de las bolsas de Master Mix y de Control DNA, cerrar cuidadosamente la bolsa con el cierre rápido después de cada uso y conservar a temperatura adecuada.

² Aunque estos reactivos se pueden conservar a temperatura ambiente, deben mantenerse con sus reactivos acompañantes del mismo lote a 2-8 °C.

³ Siempre que las bolsas se cierren debidamente con el cierre rápido después de cada uso.

Componente del kit fuera de su bolsa protectora			Master Mix y Control DNA (etiquetas con banda blanca y roja)
Tubos no reconstituidos		Temperatura	15-25 °C
		Estabilidad	2 horas
Tubos reconstituidos ¹	Recipiente original	Temperatura	2-8 °C
		Estabilidad	3 horas
	Tubo de SmartCycler®	Temperatura	2-8 °C
		Estabilidad	1 hora

¹ Desechar los tubos no utilizados una vez transcurrido el tiempo de estabilidad indicado.

Materiales necesarios pero no suministrados

- **Líquido de Stuart BBL™ CultureSwab™** (nº de catálogo de Becton Dickinson 220099), **líquido de Stuart Transystem™ de Copan** (nº de catálogo de Copan Italia International 141C.USE), **líquido de Stuart Venturi Transystem™ de Copan** (nº de catálogo de Copan Diagnostics Inc. 141C.US), o bien
- **Líquido de Amies BBL™ CultureSwab™** (nº de catálogo de Becton Dickinson 220093), **líquido de Amies Transystem™ de Copan** (nº de catálogo de Copan Italia International 140C.USE), **líquido de Amies Venturi Transystem™ de Copan** (nº de catálogo de Copan Diagnostics Inc. 140C.US), o bien
- **Gel de Amies sin carbón BBL™ CultureSwab™ Plus** (nº de catálogo de Becton Dickinson 220116), **gel de agar de Amies sin carbón Transystem™ de Copan** (nº de catálogo de Copan Italia International 108C.USE), **gel de agar de Amies sin carbón Venturi Transystem™ de Copan** (nº de catálogo de Copan Diagnostics Inc. 108C.US), o bien
- **Gel de Amies con carbón BBL™ CultureSwab™ Plus** (nº de catálogo de Becton Dickinson 220121), **gel de agar de Amies con carbón Transystem™ de Copan** (nº de catálogo de Copan Italia International 114C.USE), **gel de agar de Amies con carbón Venturi Transystem™ de Copan** (nº de catálogo de Copan Diagnostics Inc. 114C.US).
- **Placas de agar Bilis Esculina Azida complementadas con 6 µg/mL de vancomicina**
- **Vórtex Genie 2** (Fisher) con soporte para microtubos de 1,5 mL o equivalente; para procesar múltiples muestras se puede usar un adaptador capaz de sostener múltiples tubos
- **Micropipetas** (intervalo de precisión entre 1-10 µL, 10-100 µL y 100-1000 µL)
- **Puntas de micropipeta estériles libres de ADNasa** bloqueadas con filtro o de desplazamiento positivo
- **Tubos de microcentrifuga libres de ADNasa**
- **Tijeras**
- **Gasa**
- **Guantes** desechables, sin talco
- **Microcentrifuga** para centrifugación a baja velocidad

- **Bloque térmico seco** específico para tubos de 1,5 mL o baño María
- Hielo o **bloque refrigerador** específico para tubos de 1,5 mL
- Herramienta para quitar tapones (p. ej. n° de catálogo de MATRIX 4469, opcional)
- Cronómetro o **temporizador**
- **Sistema de iniciación SmartCycler®** con **software Dx** (bloque de procesamiento, manual del usuario, kit de accesorios y ordenador)

Instrucciones de uso

Obtención de las muestras

Para obtener una muestra adecuada, debe seguirse estrictamente el procedimiento para la recogida de muestras.

Utilizando una torunda recomendada (véase “Materiales necesarios pero no suministrados”), las muestras perianales y/o rectales se recogen conforme al siguiente procedimiento (los pasos 2, 3, 4 y 5 son iguales en las tres técnicas de muestreo):

- a. Para recoger una muestra perianal: pasar la torunda por la zona perianal.
- b. Para recoger una muestra rectal: insertar la torunda aproximadamente 2,5 cm más allá del esfínter anal y hacerla girar 5 veces.
- c. Para recoger una muestra perianal/rectal: pasar la torunda por la zona perianal y después insertarla aproximadamente 2,5 cm más allá del esfínter anal y hacerla girar 5 veces.
2. Colocar la torunda en su recipiente.
3. Rotular el recipiente.
4. Enviar la torunda al laboratorio siguiendo los procedimientos operativos habituales del laboratorio.
5. Véanse instrucciones de conservación y manejo en la sección titulada “Conservación, manejo y estabilidad: muestras recogidas”.

Preparación de las muestras

Nota: Se necesita un tubo de *Sample Buffer* (tampón de muestras, **tapón azul**) y un *Lysis tube* (tubo de lisis, **tapón amarillo**) para cada muestra a analizar. Retirar el número necesario de tubos de sus bolsas protectoras, **extraer el exceso de aire y cerrar rápidamente las bolsas con el cierre rápido**.

Las muestras de torundas se pueden cultivar antes de realizar la prueba BD GeneOhm™ VanR; véanse más datos en la sección “Cultivo de muestras: método de extensión en placa”.

1. **Colocar el dispositivo de recogida (torunda) en un tubo de tampón de muestras (tapón azul).**
Identificar el tubo de tampón de muestras en el tapón o en la etiqueta del tubo.
2. **Romper el vástago de la torunda y cerrar bien el tubo.**
Sostener la torunda por el vástago cerca del borde del tubo (utilizar una gasa para reducir al mínimo el riesgo de contaminación). Levantar la torunda unos milímetros del fondo y doblar el vástago contra el borde del tubo para romperlo. Método alternativo: usar unas tijeras limpias para cortar el vástago. Comprobar que el tapón cierre bien.
3. **Agitar en vórtex a alta velocidad durante 1 minuto.**
Para procesar múltiples muestras se puede utilizar un adaptador con múltiples soportes.
4. **Transferir 50 µL de suspensión celular a un tubo de lisis (tapón amarillo).**
Para realizar un cultivo de muestras con la suspensión celular restante y la torunda, véase más información en la sección “Cultivo de muestras: caldo de enriquecimiento”.
5. **Agitar el tubo de lisis durante 5 minutos a alta velocidad.**
Para procesar múltiples muestras se puede utilizar un adaptador con múltiples soportes.
6. **Centrifugar brevemente el tubo de lisis (pulso rápido).**
Hacer girar a baja velocidad durante 2 a 5 segundos, para llevar el contenido al fondo del tubo.
7. **Calentar a 95 ± 2 °C durante 2 minutos.**
Utilizar un bloque térmico específico para tubos de 1,5 mL o un baño María.
8. **Mantener el tubo de lisis en hielo o en un bloque refrigerador.**
Los lisados son estables hasta 4 horas a 2-8 °C.

Procedimiento de la prueba BD GeneOhm™ VanR

Nota: Un tubo de *Master Mix* (mezcla maestra, **etiqueta blanca**) reconstituida contiene suficientes reactivos **para efectuar 8 reacciones**. Utilizar un tubo de reacción SmartCycler® por cada muestra a analizar y 2 tubos de reacción SmartCycler® adicionales para los controles positivo y negativo. **Hay que incluir un (1) control positivo y uno (1) negativo en cada serie de la prueba BD GeneOhm™ VanR.** Hace falta un tubo de *Control DNA* (ADN de control, **etiqueta con banda roja**) por cada serie analítica (control positivo). Hace falta un (1) tubo de *Diluent* (diluyente, **etiqueta con banda negra**) para la reconstitución de hasta tres (3) tubos de mezcla maestra. Retirar el número necesario de tubos de sus bolsas protectoras, **extraer el exceso de aire y cerrar rápidamente las bolsas con el cierre rápido**.

Preparar sólo un número de tubos SmartCycler® suficiente para llenar los módulos I-CORE® disponibles en el instrumento SmartCycler®.

1. **Colocar el número necesario de tubos de mezcla maestra sobre hielo o sobre un bloque refrigerador específico para tubos de 1,5 mL.**
2. **Añadir 225 µL de diluyente (etiqueta con banda negra) a cada tubo de mezcla maestra.**
Insertar la punta de la micropipeta a través de la membrana del tapón del tubo de mezcla maestra. No insertar la punta a demasiada profundidad en el tapón. Administrar el diluyente. Desechar después el diluyente no utilizado.
3. **Agitar el (los) tubo(s) en vórtex durante 5-10 segundos.**
Colocar el tubo sobre hielo o sobre un bloque refrigerador específico para tubos de 1,5 mL hasta el momento de usarlo. Los tubos de mezcla maestra reconstituida son estables durante 3 horas sobre hielo o sobre un bloque refrigerador.
4. **Colocar un tubo de ADN de control (etiqueta con banda roja) sobre hielo o sobre un bloque refrigerador específico para tubos de 1,5 mL.**
5. **Añadir 225 µL de tampón de muestras (tapón azul) al tubo de ADN de control.**
Insertar la punta de la micropipeta a través de la membrana del tapón del tubo de ADN de control. No insertar la punta a demasiada profundidad en el tapón. Administrar el tampón de muestras.
6. **Agitar el tubo en vórtex durante 5-10 segundos.**
Colocar el tubo sobre hielo o sobre un bloque refrigerador específico para tubos de 1,5 mL hasta el momento de usarlo.
7. **Colocar el número necesario de tubos de SmartCycler® sobre el bloque refrigerador SmartCycler®.**
Calcular un tubo de SmartCycler® por muestra y dos tubos de SmartCycler® más para los controles. **Evitar tocar las ventanas de detección óptica que hay en los bordes inferiores del tubo y la zona inferior en forma de rombo.**

Los siguientes pasos **DEBEN** realizarse en el plazo de **UNA HORA**:

8. **Añadir 25 µL de mezcla maestra reconstituida a los tubos de SmartCycler®.**
Retirar el tapón antes de pipetear el reactivo. Administrar el líquido en el depósito (parte superior) de los tubos de SmartCycler®. Identificar los tubos de SmartCycler® en el tapón. Se pueden utilizar etiquetas de identificación de muestras (suministradas con el kit). Desechar la mezcla maestra no utilizada.
9. **Añadir 3,0 µL de cada muestra lisada a un tubo de SmartCycler® diferente y previamente llenado de mezcla maestra reconstituida; cerrar los tubos.**
Tener cuidado de no aspirar microesferas al pipetear desde el tubo de lisis. Tras la adición de la muestra al tubo de SmartCycler®, pipetear arriba y abajo 2-3 veces en el depósito para garantizar la transferencia del volumen completo. Utilizar una punta nueva para cada muestra.
10. **Añadir 3,0 µL del ADN de control reconstituido al penúltimo tubo de SmartCycler® (control positivo); cerrar el tubo.**
Tras la adición del ADN, pipetear arriba y abajo 2-3 veces en el depósito para garantizar la transferencia del volumen completo. Identificarlo como el control positivo. Desechar el ADN de control no utilizado.
11. **Añadir 3,0 µL de tampón de muestras (tapón azul) al último tubo de SmartCycler® (control negativo); cerrar el tubo.**
Utilizar el tubo de tampón de muestras del paso 5. Éste controlará la contaminación de la PCR que pudiera producirse durante la manipulación de las muestras. Identificarlo como control negativo. Desechar después el tampón de muestras no utilizado.
12. **Centrifugar todos los tubos de reacción durante 5-10 segundos.**
Utilizar la microcentrifuga especialmente adaptada suministrada con el instrumento SmartCycler®.
13. **Conservar los tubos a 2-8 °C en el bloque refrigerador SmartCycler® antes de cargarlos en el instrumento.**
Si es necesario, los restantes lisados pueden congelarse a -20 ± 5 °C para uso posterior.
14. **Crear una serie con el protocolo de la prueba BD GeneOhm™ VanR.**
Si es necesario, consultar el manual del operador del software SmartCycler® Dx.
15. **Insertar cada tubo de reacción en un módulo I-CORE® del SmartCycler® y cerrar la tapa del I-CORE®.**
Colocar los controles positivo y negativo en su posición adecuada (véase la sección titulada "Control de calidad"). Empujar firmemente todos los tubos hacia abajo en su sitio.
16. **Iniciar la serie.**

Control de calidad

Controles positivos y negativos

Los procedimientos de control de calidad están diseñados para controlar el rendimiento de la prueba. El control positivo está destinado a controlar un fallo importante de los reactivos. El control negativo se utiliza para detectar la contaminación (o la transferencia) de los reactivos o del ambiente por ADN portador de genes *vanA* o *vanB* o por amplicones. Los controles positivo y negativo son controles del análisis (controles de la serie). Un control del análisis inválido invalida la serie. El control interno incorporado en cada mezcla reactiva está destinado a controlar la inhibición de la PCR en cada muestra negativa así como la integridad de los reactivos. Todos los controles deben producir resultados válidos (ningún control positivo o negativo inválido).

Hay que incluir un control positivo y uno negativo en cada serie analítica en el instrumento SmartCycler®. El software asigna automáticamente la posición de los controles en el instrumento (véase el manual del operador del software SmartCycler® Dx).

Controles de procesamiento de muestras

Se pueden analizar cepas de control de conformidad con las directrices o requisitos de la normativa local, estatal y/o federal, o de las organizaciones de acreditación. Se puede utilizar como control positivo de procesamiento de muestras una cepa de ERV de referencia (p. ej. American Type Culture Collection, ATCC 51299) o un aislado clínico de ERV bien caracterizado, mientras que se puede utilizar como control negativo de procesamiento de muestras un cultivo de enterococos sensibles a la vancomicina (p. ej. ATCC 29212) o cualquier otro ERV no *vanA/B* (p. ej. *Enterococcus gallinarum* ATCC 700425).

Tomar una o varias colonias aisladas en una placa de agar sangre de carnero al 5% (incubada durante 18-24 h) y resuspender en solución salina hasta una

turbidez de 0,5 McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Diluir con solución salina hasta obtener una suspensión de $\sim 10^6$ UFC/mL. Sumergir una torunda recomendada (véase "Materiales necesarios pero no suministrados") en la suspensión bacteriana y exprimir el exceso de líquido. Procesar y analizar como una muestra clínica (véanse las secciones tituladas "Preparación de las muestras" y "Procedimiento de la prueba BD GeneOhm™ VanR"). Los controles de procesamiento de muestras deben producir resultados válidos.

Para orientación general acerca del control de calidad, el usuario puede consultar los documentos CLSI MM3⁸ y C24⁹.

Cultivo de muestras clínicas

Para realizar la identificación a nivel de especie, pruebas de sensibilidad a antibióticos o tipado epidemiológico, las muestras clínicas se pueden cultivar a través de dos pasos diferentes del procedimiento de la prueba BD GeneOhm™ VanR. Se puede hacer desde el dispositivo de recogida (torunda), utilizando el método de extensión en placa antes de realizar la prueba BD GeneOhm™ VanR, o a partir de la suspensión celular, utilizando un paso de enriquecimiento (tras la suspensión de las células en tampón de muestras en el procedimiento de preparación de muestras).

Método de extensión en placa

Este método de cultivo debe realizarse antes del procedimiento de preparación de muestras de la prueba BD GeneOhm™ VanR.

1. Inocular una placa para aislamiento primario de ERV extendiendo la torunda recogida en el primer cuadrante de la placa.
Se recomienda una placa de Bilis Esculina Azida suplementada con 6 µg/mL de vancomicina (BEAV).
2. Devolver la torunda a su recipiente o romperla en un tubo de tampón de muestras (tapón azul) y continuar según las instrucciones de la sección "Preparación de las muestras".
3. Con un asa de inoculación estéril, extender el inóculo sobre los restantes cuadrantes de la placa.
4. Incubar la placa durante 24-72 horas a 35 °C.
5. Identificar y confirmar las colonias de enterococos y analizar su resistencia a la vancomicina según los métodos habituales.

Caldo de enriquecimiento

Este método de cultivo puede realizarse con la suspensión celular que queda en el tubo de tampón de muestras después de la transferencia de 50 µL de suspensión celular al tubo de lisis. La suspensión celular se puede conservar a 2-8 °C en un tubo cerrado de tampón de muestras hasta 24 horas antes de cultivarla; no obstante, la recuperación de organismos puede no tener éxito cuando las muestras clínicas contienen bajas cantidades de ERV.

1. Transferir 300 µL de suspensión celular a 5 mL de caldo de enriquecimiento.
Se recomienda caldo de Bilis Esculina Azida.
2. Agitar en vórtex durante 2-5 segundos.
3. Incubar durante 24-48 horas a 35 °C.
4. Subcultivar en un medio sólido adecuado durante 24-72 horas a 35 °C.
Se recomienda una placa BEAV.
5. Identificar y confirmar las colonias de enterococos y analizar su resistencia a la vancomicina según los métodos habituales.

Interpretación de los resultados

El algoritmo de decisión para la prueba BD GeneOhm™ VanR está integrado en el software SmartCycler®. La interpretación de los resultados del análisis se lleva a cabo según los siguientes criterios:

Tipo de muestra	Resultado de la prueba registrado por el instrumento ¹	Resultado del CI registrado por el instrumento ¹	Interpretación de resultados por parte del usuario
Muestra clínica	NEG (NEG)	PASS (PASA)	No se ha detectado <i>vanA</i> ni <i>vanB</i> .
	POS (POS)	NA (NA)	Detectado ADN del gen de resistencia <i>vanA</i> (no se ha detectado <i>vanB</i>); probable presencia de enterococos resistentes a la vancomicina (ERV).
	Presumptive POS (Presunto POS)	NA (NA)	Detectado ADN del gen de resistencia <i>vanB</i> ² (no se ha detectado <i>vanA</i>); presunta presencia de enterococos resistentes a la vancomicina (ERV), el gen de resistencia <i>vanB</i> puede pertenecer a otro organismo.
	Positive (Positivo)	NA (NA)	Detectado ADN de los genes de resistencia <i>vanA</i> y <i>vanB</i> ; probable presencia de enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) ³ .
	Unresolved (No resuelto)	FAIL (FALLO)	No resuelto; muestra inhibida o fallo de los reactivos.
	ND (ND)	ND (ND)	No determinado debido a un fallo del módulo I-CORE® (con código de advertencia o error ¹).
Control positivo	Valid (Válido)	NA (NA)	Control positivo válido; serie válida si el control negativo también es válido.
	Invalid (Inválido)	NA (NA)	Control positivo inválido; serie inválida ⁴ . Los resultados de la prueba son inválidos y no se deben registrar.
Control negativo	Valid (Válido)	PASS (PASA)	Control negativo válido; serie válida si el control positivo también es válido.
	Invalid (Inválido)	FAIL (FALLO)	Control negativo inválido; serie inválida ⁴ . Los resultados de la prueba son inválidos y no se deben registrar.

CI: control interno; NA: no aplicable; ND: no determinado.

NOTAS: ¹ Consultar el manual del operador del software SmartCycler® Dx para conocer la interpretación de los códigos de advertencia y error.

² Las muestras positivas para *vanB* pero negativas para *vanA* deben cultivarse para confirmar la presencia de enterococos resistentes a la vancomicina.

³ Si la verificación del gen *vanB* es necesaria para fines epidemiológicos, llevar a cabo un cultivo y después efectuar pruebas de confirmación del gen *vanB*.

⁴ En la pantalla y en los informes se registran las series analíticas inválidas o los códigos de error o advertencia del instrumento. Antes de registrar los resultados de *vanA* y *vanB*, verificar siempre que la serie analítica es válida.

Si se analiza, la interpretación de los resultados de la muestra debe ser realizada por el usuario.

Serie analítica inválida

Utilizando el (los) lisado(s) congelado(s), preparar nuevos tubos de reacción para todas las muestras clínicas de esa serie analítica junto con nuevos tubos de control.

Muestra no resuelta

Repetir la prueba con el (los) lisado(s) congelado(s) de la muestra correspondiente. El ciclo de congelación-descongelación ha demostrado reducir las sustancias inhibitoras de la PCR.

Muestra no determinada por fallo del módulo I-CORE®

Repetir la prueba con el (los) lisado(s) congelado(s) de la muestra correspondiente. Para la interpretación de los mensajes de códigos de advertencia o error, consultar el manual del operador del software SmartCycler® Dx.

Limitaciones del procedimiento

- **No se recomienda el uso de este producto con un instrumento automatizado de PCR en tiempo real diferente del SmartCycler®, ni el uso de un sistema de recogida y transporte de muestras diferente de los enumerados en la sección de “Materiales necesarios pero no suministrados” porque no se han establecido sus características de rendimiento.**
- **Las características de rendimiento de este producto no han sido establecidas para otros tipos de muestras clínicas.**
- Se pueden producir resultados analíticos negativos por una incorrecta recogida, manipulación o conservación de las muestras, presencia de inhibidores, errores técnicos, confusión de muestras o porque el número de organismos de la muestra es inferior a la sensibilidad analítica de la prueba. Es necesario el cumplimiento estricto de las instrucciones dadas en el presente prospecto y en el manual del operador del software SmartCycler® Dx para evitar resultados erróneos. El uso de esta prueba debe estar limitado a personal con formación acerca del procedimiento y del uso del instrumento SmartCycler®.
- Los resultados de la prueba BD GeneOhm™ VanR pueden quedar a veces no resueltos, no determinados (debido a un fallo del módulo I-Core®) o inválidos (por un control inválido), requiriendo un nuevo análisis.
- Un resultado positivo de la prueba no indica necesariamente la presencia de organismos viables; también puede verse afectado por un tratamiento antibiótico concurrente. No obstante, un resultado positivo es presuntivo para la presencia de ERV con base en la detección de genes *vanA* y *vanB*. La prueba no detecta enterococos. La prueba puede detectar genes *vanA* y *vanB* portados por microorganismos diferentes de *Enterococcus*.
- Las mutaciones o los polimorfismos en las regiones de unión de los cebadores o de las sondas pueden afectar a la detección de variantes nuevas o desconocidas de ERV provocando un resultado falso negativo con la prueba.
- Aunque no hay necesidad de preparar los reactivos y la principal operación técnica es el pipeteado, es esencial una buena técnica de laboratorio para la ejecución correcta de esta prueba. Debido a la elevada sensibilidad analítica de esta prueba, hay que tener sumo cuidado para conservar la pureza de todos los reactivos, especialmente en los casos en que se extraen múltiples alícuotas de un tubo.
- Las pruebas de vigilancia determinan el estado de colonización en un momento determinado y los resultados pueden variar en función del tratamiento del paciente, el estado del paciente o la exposición a entornos de alto riesgo (p. ej., contacto con un portador de ERV, hospitalización prolongada). El control del estado de colonización debe realizarse de acuerdo con las normas del hospital.
- Unos resultados positivos de la prueba BD GeneOhm™ VanR para *vanB* en ausencia de *vanA* pueden deberse a organismos diferentes de los ERV. Se recomienda llevar a cabo una confirmación por cultivo de estos organismos.
- Como se ha descrito en la literatura médica, algunas bacterias anaerobias pueden contener el gen *vanB*^{10,11,12} y serían detectadas por esta prueba; no obstante, la relevancia clínica de dichos hallazgos es desconocida. Se ha propuesto que las bacterias anaerobias positivas para el gen *vanB* podrían constituir un reservorio de determinantes de la resistencia a la vancomicina², pero esta hipótesis no ha sido demostrada.
- Se han identificado pacientes portadores de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la vancomicina que contienen el gen *vanA* de resistencia a la vancomicina¹³, y que podrían ser positivos en esta prueba.
- Un número bajo de copias de la diana *vanA* puede no ser detectado en presencia de un número de copias muy elevado de la diana *vanB* ($\geq 10^5$ copias de ADN por PCR).

Sustancias interferentes

Entre ellas se cuentan, sin limitación, las siguientes: sangre, heces, mucus, lubricantes y sustancias utilizadas para aliviar las molestias de las hemorroides.

Características de rendimiento

Rendimiento clínico

Las características de rendimiento de la prueba BD GeneOhm™ VanR se determinaron en un estudio prospectivo multicéntrico de investigación. En dicho estudio participaron tres centros médicos. Para participar en el estudio, las muestras tenían que proceder de personas para quienes el cultivo estaba indicado o había sido solicitado, según las normas institucionales.

El método de referencia consistió en un análisis inicial con una placa de agar de Bilis Esculina Azida suplementado con 6 µg/mL de vancomicina (BEAV). Las colonias de enterococos confirmadas se analizaron para determinar su resistencia a la vancomicina. Las muestras negativas para ERV se sometieron a un análisis adicional que consistió en un paso de enriquecimiento en caldo de Bilis Esculina Azida suplementado con 6 µg/mL de vancomicina (BEAV). Se llevó a cabo la identificación fenotípica de *vanA* y *vanB* mediante pruebas de concentración mínima inhibitora (CMI) con vancomicina y teicoplanina. Una muestra positiva para ERV *vanA* y/o *vanB* se definió como una muestra positiva para *vanA* y/o *vanB* por la técnica de cultivo y los resultados de CMI. Una muestra negativa para ERV *vanA* y/o *vanB* se definió como una muestra negativa para *vanA* o *vanB* mediante el método inicial y el de cultivo enriquecido.

Para el método de cribado por crecimiento selectivo en BEAV, las placas se inocularon directamente con muestras de torundas seguidas de incubación a 35 °C durante 24 a 48 horas. Las presuntas colonias de *Enterococcus* se subcultivaron en placas de agar sangre de carnero al 5% y se incubaron durante 18-24 horas a 35 °C. Las colonias sospechosas del género *Enterococcus* se sometieron a la prueba de pirrolidoniil arimalidasa (PYR). Si la prueba PYR era positiva, se realizaba una identificación de especies enterocócicas mediante pruebas comerciales adecuadas. Se determinó la resistencia a la vancomicina y a la teicoplanina para los enterococos confirmados utilizando un método de CMI. Se llevó a cabo también un cribado de ERV con un paso de enriquecimiento en caldo de BEAV

(vancomicina 6 µg/mL) en los casos en que se obtuvo un resultado de sensible o intermedio para ERV con el método de cribado en placa de BEAV. Para este fin, tras la extensión directa en placas de BEAV se inocularon caldos de BEAV y se incubaron durante 24 a 48 horas a 35 °C. Los caldos de BEAV que presentaron un crecimiento negro se subcultivaron a placas de BEAV (vancomicina 6 µg/mL) y se incubaron durante 24 a 48 horas a 35 °C. Las presuntas colonias de *Enterococcus* se subcultivaron en placas de agar sangre de carnero al 5% y se incubaron durante 18-24 horas a 35 °C. La confirmación de las colonias sospechosas y la determinación de la resistencia a la vancomicina/teicoplanina se realizaron como se ha descrito anteriormente. Las muestras con enterococos confirmados como resistentes a la vancomicina se consideraron positivas.

La Tabla 1 muestra los resultados finales concordantes y discordantes (823) de la prueba BD GeneOhm™ VanR en comparación con el método de referencia. Ochenta y nueve (89) muestras arrojaron un resultado negativo en cultivo pero positivo para *vanB* solamente por PCR y pueden representar microorganismos no enterocócicos portadores del gen *vanB*.

En total, se recogieron 836 muestras perianales o rectales y se cribaron para determinar la presencia de enterococos resistentes a la vancomicina utilizando el método de referencia descrito anteriormente y la prueba BD GeneOhm™ VanR (Tabla 2). En comparación con el método de referencia, la prueba BD GeneOhm™ VanR identificó el 92,3% de las muestras positivas y el 83,5% de las muestras negativas.

En comparación con el método de referencia, la prueba BD GeneOhm™ VanR identificó el 94,5% y el 90,0% de las muestras perianales y rectales positivas, respectivamente, e identificó el 88,0% y el 76,1% de las muestras perianales y rectales negativas, respectivamente (Tabla 3).

Cincuenta y cuatro (54) muestras arrojaron un resultado inicial no resuelto (esto es, fallo del control interno), lo que implica una tasa del 6,5%. Tras un nuevo análisis, 41 de estas muestras arrojaron un resultado registrable, mientras que solo 13 muestras permanecieron sin resolver, dando lugar a una tasa final de no resueltos del 1,6% (Tabla 4).

Tres (3) series de un total de 87 arrojaron un resultado inválido (esto es, fallo de los controles positivo o negativo de la serie), lo que implica una tasa total del 3,4% (Tabla 5).

Tabla 1. Resultados obtenidos con la prueba BD GeneOhm™ VanR en comparación con el método de referencia

		Resultados del cultivo			Total
		<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	Negativo	
Resultados de BD GeneOhm™ VanR	<i>vanA</i>	96	0	18	114
	<i>vanA</i> y <i>vanB</i>	23	2	5	30
	<i>vanB</i>	6	5	89	100
	Negativo	10	1	568	579
	Total	135	8	680	823

Tabla 2. Rendimiento clínico específico de cada centro de investigación y global obtenido con la prueba BD GeneOhm™ VanR en comparación con el método de referencia

Centro de investigación	Prevalencia de ERV	Sensibilidad de BD GeneOhm™ VanR con IC del 95% ¹	Especificidad de BD GeneOhm™ VanR con IC del 95% ¹
Centro 1	17,1% (55/322)	98,2% (54/55) (90,3% - 100,0%)	83,8% (218/260) (78,8% - 88,1%)
Centro 2	10,9% (26/239)	88,5% (23/26) (69,8% - 97,6%)	90,1% (192/213) (85,3% - 93,8%)
Centro 3	23,6% (65/275)	88,7% (55/62) (78,1% - 95,3%)	76,3% (158/207) (69,9% - 81,9%)
Estudio global	17,5% (146/836)	92,3% (132/143) (86,7% - 96,1%)	83,5% (568/680) (80,5% - 86,2%)

El centro 1 recogió torundas perianales exclusivamente, el centro 3 recogió torundas rectales exclusivamente y el centro 2 recogió una combinación de torundas perianales y rectales.

¹ Intervalos de confianza exactos binomiales del 95%.

Tabla 3. Rendimiento clínico obtenido con la prueba BD GeneOhm™ VanR por tipo de muestra y global en comparación con el método de referencia

Tipo de muestra	Sensibilidad de BD GeneOhm™ VanR con IC del 95%	Especificidad de BD GeneOhm™ VanR con IC del 95%
Perianal	94,5% (69/73) (86,6% - 98,5%)	88,0% (374/425) (84,5% - 90,9%)
Rectal	90,0% (63/70) (80,5% - 95,9%)	76,1% (194/255) (70,4% - 81,2%)
Estudio global	92,3% (132/143) (86,7% - 96,1%)	83,5% (568/680) (80,5% - 86,2%)

Tabla 4. Tasas iniciales y tras la repetición de resultados no resueltos de la prueba BD GeneOhm™ VanR

Centro de investigación	Tasa inicial de no resueltos con IC del 95%	Tasa de no resueltos tras la repetición con IC del 95%
Centro 1	14,6% (47/322) (10,9% - 18,9%)	2,2% (7/322) (0,9% - 4,4%)
Centro 2	0,0% (0/239) (0,0% - 1,5%)	0,0% (0/239) (0,0% - 1,5%)
Centro 3	2,5% (7/275) (1,0% - 5,2%)	2,2% (6/275) (0,8% - 4,7%)
Estudio global	6,5% (54/836) (4,9% - 8,3%)	1,6% (13/836) (0,8% - 2,6%)

Tabla 5. Tasas de series inválidas de la prueba BD GeneOhm™ VanR

Centro de investigación	Tasas de series inválidas con un IC del 95%
Centro 1	7,1% (2/28) (0,9% - 23,5%)
Centro 2	4,5% (1/22) (0,1% - 22,8%)
Centro 3	0,0% (0/37) (0,0% - 9,5%)
Estudio global	3,4% (3/87) (0,7% - 9,7%)

Especificidad analítica

Se analizó el ADN genómico de 129 cepas de organismos estrechamente relacionados, de microorganismos de la flora perianal y/o rectal normal y patógena, ADN humano o ADN exógeno, 28 cepas (17 cepas de referencia y 11 aislados clínicos) de enterococos sensibles a la vancomicina o de enterococos resistentes a la vancomicina portadores de genes diferentes de *vanA/vanB*. Ninguna de las muestras resultó positiva, por lo que la especificidad analítica fue del 100%.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica (límite de detección o LDD) se determinó con 1 cepa ATCC (700221) de enterococo resistente a la vancomicina *vanA* (*E. faecium*) y con 1 cepa ATCC (51299) de enterococo resistente a la vancomicina *vanB* (*E. faecalis*). Se analizaron cultivos cuantificados y ADN genómico diluido en el tampón de muestras de la prueba BD GeneOhm™ VanR en cinco (5) duplicados. El límite de detección se definió como la concentración más baja, en número de copias de ADN por reacción y en UFC por reacción, en la que cinco duplicados de cinco resultaron positivos.

El LDD de la prueba BD GeneOhm™ VanR es de 10 copias del genoma por reacción (o 2 UFC por reacción) para enterococos resistentes a la vancomicina tanto *vanA* como *vanB*. Teniendo en cuenta el factor de dilución debido al procesamiento de las muestras, este LDD representa aproximadamente 1600 UFC/torunda.

Referencias

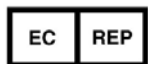
- ¹ Rice LB. Emergence of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7(2).
- ² National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 to June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control.* 2004; 32:470-485.
- ³ Centers for Disease Control 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. Documento M29 (consulte la última edición).
- ⁸ Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline. Documento MM3 (consultar la última edición).
- ⁹ Clinical and Laboratory Standards Institute Statistical Quality Control for Quantitative Measurements: Principles and Definitions; Approved Guideline. Documento C24 (consultar la última edición).
- 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.

Este kit se vende bajo licencia del Instituto de Investigación de Salud Pública (PHRI) de la Ciudad de Nueva York, Inc. y puede utilizarse bajo los derechos de patente del PHRI solamente para diagnóstico clínico humano *in vitro*.

La adquisición de este producto permite al comprador utilizarlo para la amplificación y detección de secuencias de ácidos nucleicos para ofrecer diagnósticos humanos *in vitro*. Por la presente no se concede ninguna patente general ni ninguna otra licencia de ninguna clase más que este derecho específico de uso por la adquisición.

Este producto está sujeto a un acuerdo entre Molecular Probes, Inc. y Geneohm Sciences, Inc., y la fabricación, uso, venta o importación de este producto puede estar sujeto a una o más patentes de los EE.UU., solicitudes pendientes y sus correspondientes equivalentes extranjeros, propiedad de Molecular Probes, Inc. (una empresa subsidiaria propiedad en su totalidad de Invitrogen Corporation). La adquisición de este producto concede al comprador el derecho no transferible de utilizar la cantidad adquirida del producto y los componentes del producto para uso en análisis para la detección de ácidos nucleicos con el fin de identificar microorganismos en diagnóstico humano. El comprador no podrá utilizar este producto ni sus componentes para la fabricación ni para uso terapéutico o profiláctico, ni vender ni transferir en modo alguno este producto ni sus componentes a ningún tercero, ni utilizarlo para ningún otro fin que para su uso en diagnóstico humano. Para obtener información sobre cómo comprar una licencia de este producto con fines distintos al diagnóstico humano, póngase en contacto con Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402, EE. UU., Tel: +1 (541) 465-8300. Fax: +1 (541) 335-0504.

Índice de símbolos

Símbolo	Significado	Símbolo	Significado
	Fabricante		Código del lote
REF	Número de catálogo		Limites de temperatura
	Uso diagnóstico <i>in vitro</i>		Protéjase de la luz y de la humedad
	Representante europeo autorizado		Volver a cerrar las bolsas después de su uso
	Fecha de caducidad		Consultar las instrucciones de uso
	Contiene cantidad suficiente para "n" pruebas	 Xi R36/38	Irrita los ojos y la piel
	Caja 1 de 3		



Servicio de atención al cliente: 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.