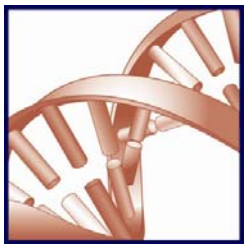
Saggio BD GeneOhm™ VanR



REF 441250 48 TEST

IVD

REF 441251 200 TEST

Sommario

Uso previsto ---------- 3
Sommario e spiegazione del test ---------- 3
Principio della procedura ---------- 3
Reagenti ---------- 3
Precauzioni ---------- 4
Materiali forniti ---------- 4
Modalità di conservazione e stabilità ---------- 5
Campioni prelevati ---------- 5
Reagenti ---------- 5
Materiali necessari, ma non forniti ---------- 5
Istruzioni per l'uso ---------- 6
Prelievo dei campioni ---------- 6
Preparazione dei campioni ---------- 6
Procedura del saggio BD GeneOhm™ vanR ---------- 6
Controllo di qualità ---------- 7
Controlli positivo e negativo ---------- 7
Controlli per l'analisi dei campioni ---------- 7
Coltura di campioni clinici ---------- 8
Metodo dello striscio su piastra ---------- 8
Brodo di arricchimento ---------- 8
Interpretazione dei risultati ---------- 8
Seduta non valida ---------- 9
Campioni incerti ---------- 9
Campioni non determinati a causa di problemi al modulo I-CORE® ---------- 9
Limiti della Procedura ---------- 9
Sostanze che interferiscono ---------- 9
Prestazioni metodologiche ---------- 9
Prestazioni cliniche ---------- 9
Specificità analitica ---------- 11
Sensibilità analitica ---------- 11
Riferimenti ---------- 12
Indice dei simboli ---------- 13

Italiano

Uso previsto

Il saggio BD GeneOhm™ vanR è un test qualitativo *in vitro* per il rilevamento rapido dei geni della resistenza alla vancomicina (*vanA* e *vanB*) direttamente da tampone perianale e/o rettale. Il saggio BD GeneOhm™ vanR rileva la presenza dei geni *vanA* e *vanB* che possono essere associati alla resistenza alla vancomicina negli enterococchi (vancomycin resistant enterococci, VRE). Il saggio viene eseguito automaticamente, in tempo reale, su uno strumento per la reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction, PCR), utilizzando tamponi perianali e/o rettali di pazienti a rischio di colonizzazione da VRE. Il saggio BD GeneOhm™ vanR può essere utilizzato come ausilio per individuare, prevenire e controllare le colonizzazioni vancomicina resistenti negli ambienti sanitari. Il saggio BD GeneOhm™ vanR non è inteso per la diagnosi delle infezioni da VRE, né come guida o controllo nel trattamento delle infezioni da VRE. Le colture concomitanti sono necessarie unicamente per recuperare organismi per la tipizzazione epidemiologica o per ulteriori test di conferma.

Sommario e spiegazione del test

Dopo il prelievo, il tampone perianale e/o rettale viene trasferito in laboratorio usando un adeguato dispositivo di trasporto (cfr. Materiali necessari, ma non forniti). Il tampone viene eluito nel relativo buffer e il campione viene lisato. Una aliquota del lisato viene aggiunta ai reagenti della PCR che contengono i primer specifici dei geni *vanA* e *vanB* utilizzati per l'amplificazione dei target genetici, qualora siano presenti. Il saggio comprende anche un controllo interno (CI) per individuare i campioni inibitori della PCR e confermare l'integrità dei reagenti. I target amplificati vengono rilevati dall'ibridazione con sonde marcate con fluorofori (" molecular beacon"). Amplificazione, rivelazione e interpretazione dei segnali vengono eseguite automaticamente dal software del dispositivo Cepheid SmartCycler®. L'intera procedura richiede circa 60-75 minuti, a seconda del numero di campioni trattati. Il recupero degli organismi per l'identificazione delle specie e la tipizzazione epidemiologica possono essere effettuati inoculando un appropriato terreno di coltura durante la preparazione dei campioni o fino a 24 ore dopo il trattamento.

Gli enterococchi sono normalmente presenti nella flora gastrointestinale. La loro crescente rilevanza quali patogeni nosocomiali negli ultimi due decenni è largamente imputabile alla loro resistenza a numerosi antibiotici comunemente somministrati[1,2]. Sebbene le infezioni da enterococchi siano riconducibili in prevalenza a fonti endogene (la normale flora saprofita), si può verificare la trasmissione anche attraverso le mani contaminate del personale, le attrezzature contaminate utilizzate in ambito sanitario e/o le superfici ambientali. Il trattamento di alcune infezioni da enterococchi è divenuto un grave problema, in particolare con l'emergere di ceppi resistenti alla vancomicina. Sebbene vi sia un certo numero di geni ritenuti responsabili della resistenza (intrinseca o acquisita) alla vancomicina, i geni *vanA* e *vanB* sono quelli riscontrati più di sovente negli Enterococchi Vancomicina Resistenti (VRE)[3] e sono gli unici che presentano rilevanza clinica. La conoscenza del tipo di resistenza è fondamentale per l'efficacia del controllo delle infezioni. I geni *vanA* e *vanB* sono trasferibili e possono diffondersi da un organismo all'altro. Per contro, i geni *vanC* non sono trasferibili, sono stati associati meno frequentemente a infezioni gravi e non sono stati posti in relazione con la comparsa di epidemie[2]. La presenza di VRE si sta diffondendo in ambito sanitario e rappresenta oltre il 28,5% degli isolati di enterococchi rilevati nei nosocomi americani [2]. Negli Stati Uniti il fenotipo *vanA* è stato osservato in circa il 70% degli isolati di VRE, mentre il fenotipo *vanB* in circa il 25%[4]. Tra i fattori di rischio in termini di colonizzazione e infezione da VRE in ambito sanitario figurano il protrarsi del ricovero ospedaliero, la permanenza in unità intensive, o nei reparti onocologici o per trapianti, la precedente esposizione ad antibiotici e la vicinanza a pazienti infetti o colonizzati da VRE[1,2,5]. Lo screening precoce dei soggetti portatori di VRE al fine di individuare i pazienti che devono essere tenuti in isolamento fa parte di un efficace programma di controllo contro le infezioni da VRE. Le metodiche attualmente adottate per rilevare i ceppi VRE prevedono una fase in coltura, con isolamento di colonie pure, seguita da test di sensibilità alla vancomicina o di rilevamento dei geni *vanA* e *vanB*. Ciò aumenta il tempo necessario per individuare la condizione di portatore di VRE ad almeno 48 ore, con un valore medio superiore a 72 ore. Considerando la rapidità con cui i VRE possono diffondersi, in particolare in ambito sanitario dove i vettori sono numerosi, la capacità di stabilire se un soggetto è portatore di VRE già dal primo giorno di ricovero, con un semplice tampone perianale e/o anale, rappresenta un vantaggio per il controllo delle infezioni.

Principio della procedura

Dopo la lisi dei campioni, ha luogo l'amplificazione dei target genetici di *vanA* e *vanB*. Avrà luogo inoltre, a meno che non siano presenti sostanze inibitrici della PCR, l'amplificazione del Controllo Interno (CI), un frammento di DNA di 294 bp che comprende una sequenza di 254 bp assente nei VRE.

I target amplificati del DNA sono rilevaticon molecular beacon, oligonucleotidi a filamento singolo con struttura a forcina marcati a un'estremità con un inibitore e all'altra con un colorante reporter fluorescente (fluoroforo). In assenza del target, la fluorescenza viene inibita. In presenza del target, la struttura a forcina si apre per consentire l'ibridazione del segnale/target, determinando l'emissione di fluorescenza. Per individuare l'amplicone del *vanA*, la sonda del segnale molecolare contiene il fluoroforo FAM all'estremità 5' e il moiety inibitore DABCYL non fluorescente all'estremità opposta 3' dell'oligonucleotide. Per rilevare l'amplicone del *vanB,* la sonda del segnale molecolare contiene il fluoroforo Texas Red all'estremità 5' e l'inibitore DABCYL all'estremità 3'. Per reperire l'amplicone del CI, la sonda del segnale molecolare contiene il fluoroforo TET all'estremità 5' e l'inibitore DABCYL all'estremità 3'. Ogni ibrido segnale-target emette fluorescenza a una lunghezza d'onda specifica per il fluoroforo utilizzato con quel determinato segnale molecolare. Il livello di fluorescenza in un dato ciclo, o nei cicli successivi, dipende dalla quantità dello specifico amplicone presente in quel dato momento. Il software SmartCycler® monitorizza simultaneamente la fluorescenza emessa da ciascun beacon, interpreta tutti i dati e alla fine del programma di ciclo fornisce un risultato finale (cfr. Interpretazione dei risultati).

Reagenti

Saggio BD GeneOhm™ vanR	**48 test**	**200 test**
Tampone (Sample Buffer)	**60 X 1 mL**	**240 X 1 mL**
Soluzione Tampone Tris EDTA		
Provetta di lisi (Lysis tube)	**50 provette**	**200 provette**
Microsfere di vetro		
Master Mix (Master Mix)	**8 provette**	**34 provette**
< 0,0005 % complesso DNA polimerasi		
< 0,001% Controllo interno - DNA non infetto contenente sequenze di legame di primer per *vanA* e *vanB* con una sequenza specifica per l'ibridazione delle sonde		
< 0,002 % primer		
< 0,002 % sonde molecolari		
< 0,05 % dATP, dCTP, dGTP, dTTP		
Sieroalbumina bovina		

Carboidrati

$MgCl_2$

< 0,001 % DNA genomico non infetto di *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990)

DNA di controllo (Control DNA)	**8 provette**	**34 provette**
Soluzione Tampone Tris EDTA		
Carboidrati		
< 0,001 % *Enterococcus faecium* genomico non infetto portatore di DNA *vanA* (ATCC 700221) ed *Enterococcus faecalis* portatore di DNA *vanB* (ATCC 51299)		
Diluente (Diluent)	**8 X 700 µL**	**34 X 700 µL**
Tampone Tris HCl		
$MgCl_2$		
$(NH_4)_2SO_4$		
KCl		

Precauzioni

Questo test è solo per uso diagnostico *in vitro*.

- Non utilizzare il kit se è rotta la chiusura di sicurezza sul contenitore esterno.
- Non utilizzare i reagenti se il sacchetto protettivo è aperto o danneggiato alla consegna.
- Non togliere l'essiccante dai sacchetti di Master Mix e DNA di controllo.
- Non usare i reagenti se l'essiccante non è presente nei sacchetti di Master Mix e DNA di controllo.
- Dopo l'uso, sigillare con la chiusura a zip i sacchetti protettivi di Master Mix e DNA di controllo.
- I reagenti non sono intercambiabili tra i lotti.
- Non unire reagenti di provette diverse, anche se provengono dallo stesso lotto.
- Non utilizzare i reagenti dopo la relativa data di scadenza.
- Non scambiare i tappi tra i reagenti perché potrebbero provocare fenomeni di contaminazione e compromettere i risultati dei test.
- Evitare la contaminazione da microbi e deossiribonucleasi (DNAsi) dei reagenti nel prelevare le aliquote dalle provette. Si consiglia di utilizzare punte per pipette sterili, monouso, con blocco a filtro, prive di DNAsi.
- Per evitare eventuali contaminazioni ambientali con gli ampliconi *vanA* e *vanB*, non aprire le provette dopo l'amplificazione.
- Utilizzare una nuova punta per ogni campione o reagente.
- L'esecuzione del saggio al di fuori degli intervalli di tempo consigliati può determinare risultati non validi. I saggi che non vengono eseguiti entro i tempi indicati devono essere ripetuti.
- Ulteriori test di controllo possono essere eseguiti in conformità con le indicazioni o le normative vigenti a livello locale, provinciale e/o federale o i requisiti delle organizzazioni competenti.
- Nei casi in cui il laboratorio esegue anche test PCR a provetta aperta nella stessa area del laboratorio, è necessario predisporre zone di lavoro separate e isolate per la preparazione dei campioni e le attività di amplificazione/rilevamento. I materiali e le apparecchiature devono essere collocati nelle zone cui sono destinati e non devono essere spostati da un punto all'altro. Indossare sempre i guanti e cambiarli prima di passare da un'area all'altra. Cambiare i guanti prima di manipolare i reagenti liofilizzati.
- Trattare sempre i campioni come se fossero infetti, attenendosi scrupolosamente alle procedure di sicurezza del laboratorio, quali ad esempio quelle descritte in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*[6] e nel CLSI Document M29[7].
- Prima di maneggiare i reagenti del kit, indossare l'abbigliamento protettivo e i guanti monouso. Una volta eseguito il test, lavarsi accuratamente le mani.
- Non pipettare con la bocca.
- Non fumare, bere o mangiare nelle aree dove vengono manipolati i campioni o i reagenti del kit.
- Eliminare i reagenti inutilizzati e i rifiuti in conformità con le disposizioni vigenti a livello europeo, nazionale, regionale e locale.

Materiali forniti

- Tampone (*Sample buffer*)
- Provetta di lisi (*Lysis tube*)
- Master Mix (*Master Mix)*
- DNA di controllo (*Control DNA*)
- Diluente (*Diluent*)
- Provette di reazione SmartCycler® da 25 µL
- Etichette identificative dei campioni

Modalità di conservazione e stabilità

Campioni prelevati

Conservare i campioni a una temperatura tra 2 e 25 °C durante il trasporto. Non esporre i campioni a temperature eccessivamente basse o alte.

I campioni possono essere conservati fino a 5 giorni a una temperatura di 2-8 °C prima di eseguire i test. I campioni sottoposti a test entro 36 ore possono essere conservati a temperatura ambiente (15-25 °C).

Reagenti

Nota: Le condizioni di conservazione devono rispettare le specifiche indicate su ogni sacchetto.

Componenti del kit		*Master Mix* e *Control DNA* (etichette con strisce **bianche** e **rosse**)	*Lysis tube* (tappo **giallo**)	*Sample Buffer* e *Diluent* (rispettivamente con tappo **blu** ed etichetta con strisce **nere**)
Sacchetto chiuso	**Temperatura**	2-25 °C	2-25 °C	2-25 °C
	Stabilità	Data di scadenza	Data di scadenza	Data di scadenza
Sacchetto aperto	**Temperatura**	2-8 °C[1]	2-25 °C[2]	2-25 °C[2]
	Stabilità	1 mese[3]	Data di scadenza	2 mesi[3]

[1] Una volta rotto il sigillo originale sui sacchetti del *Master Mix* e del *Control DNA*, chiudere accuratamente il sacchetto con la chiusura a zip dopo ogni uso e conservare alla temperatura appropriata.

[2] Sebbene sia questi reagenti possano essere conservati a temperatura ambiente, è opportuno conservarli con i relativi reagenti dello stesso lotto a 2-8 °C.

[3] Purché lil sacchetto venga chiuso correttamene con la cerniera dopo ogni uso.

Componenti del kit fuori dal relativo sacchetto protettivo			*Master Mix* e *Control DNA* (etichette con strisce **bianche** e **rosse**)
Provette non ricostituite		**Temperatura**	15-25 °C
		Stabilità	2 ore
Provette ricostituite[1]	**Contenitore originale**	**Temperatura**	2-8 °C
		Stabilità	3 ore
	Provetta SmartCycler®	**Temperatura**	2-8 °C
		Stabilità	1 ora

[1] Eliminare le provette inutilizzate una volta scaduto il periodo di tempo in cui rimangono stabili.

Materiali necessari, ma non forniti

- **BBL™ CultureSwab™ Liquid Stuart** (Becton Dickinson n. catalogo 220099), **Copan Transystem™ Liquid Stuart** (Copan Italia International n. catalogo 141C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Liquid Stuart** (Copan Diagnostics Inc. n. catalogo 141C.US) oppure
- **BBL™ CultureSwab™ Liquid Amies** (Becton Dickinson n. catalogo 220093), **Copan Transystem™ Liquid Amies** (Copan Italia International n. catalogo 140C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Liquid Amies** (Copan Diagnostics Inc. n. catalogo 140C.US) oppure
- **BBL™ CultureSwab™ Plus Amies Gel without Charcoal** (Becton Dickinson n. catalogo 220116), **Copan Transystem™ Amies Agar Gel without Charcoal** (Copan Italia International n. catalogo 108C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Amies Agar Gel without Charcoal** (Copan Diagnostics Inc. n. catalogo 108C.US) oppure
- **BBL™ CultureSwab™ Plus Amies Gel with Charcoal** (Becton Dickinson n. catalogo 220121), **Copan Transystem™ Amies Agar Gel with Charcoal** (Copan Italia International n. catalogo 114C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Amies Agar Gel with Charcoal** (Copan Diagnostics Inc. n. catalogo 114C.US)
- **Piastre di agar, bile, esculina e azide con aggiunta di 6 µg/mL di vancomicina**
- **Vortex Genie** 2 (Fisher) con alloggiamento per microprovette da 1,5 mL, o equivalente; se i campioni sono numerosi, è possibile utilizzare un adattatore a più alloggiamenti
- **Micropipette** (intervallo di precisione 1-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL)
- **Punte per micropipette sterili senza DNAsi** volumetriche o con blocco filtro
- **Provette per microcentrifuga senza DNAsi**
- **Forbici**
- **Garze**
- **Guanti** monouso, senza polvere
- **Microcentrifuga** per centrifugazione a bassa velocità
- **Riscaldatore a secco** per provette da 1,5 mL o apparecchio per bagnomaria
- Ghiaccio o **raffreddatore** per provette da 1,5 mL

- Apparecchio per la rimozione dei tappi (ad es. MATRIX n. catalogo 4469) (opzionale)
- Cronometro o **timer**
- **SmartCycler® starter system** con **Dx Software (**blocco di analisi, manuale per l'utente, kit di accessori e computer)

Istruzioni per l'uso

Prelievo dei campioni

Al fine di ottenere un campione idoneo attenersi scrupolosamente alla procedura prevista per il prelievo dei campioni.

Utilizzando il tampone consigliato (cfr. Materiali richiesti, ma non forniti), i campioni perianali e/o rettali vengono prelevati secondo la seguente procedura (le fasi 2, 3, 4 e 5 sono comuni alle tre tecniche di esecuzione dei tamponi):

1. a. Per prelevare un campione perianale, passare il tampone sull'area perianale.

1. b. Per prelevare un campione rettale, inserire il tampone nello sfintere anale per circa 2,5 cm e girarlo 5 volte.

1. c. Per prelevare un campione perianale/rettale, passare il tampone sull'area perianale, quindi inserirlo nello sfintere anale per circa 2,5 cm e girarlo 5 volte.

2. Riporre il tampone nel suo contenitore.

3. Etichettare il contenitore.

4. Trasportare il tampone in laboratorio secondo le normali procedure operative dell'ospedale.

5. Consultare la sezione Modalità di conservazione e stabilità – Campioni prelevati per conservazione e manipolazione.

Preparazione dei campioni

Nota: Per ogni campione da sottoporre al test sono necessarie **una** provetta di *Sample Buffer* (tampone, **tappo blu**) e **una** *Lysis tube* (provetta di lisi, **tappo giallo**). Prelevare il numero richiesto di provette dai sacchetti protettivi, **rimuovere l'aria in eccesso e sigillare subito i sacchetti con la chiusura a zip.**

I campioni di tampone possono essere lasciati in coltura prima di eseguire il saggio BD GeneOhm™ vanR; per ulteriori dettagli consultare la sezione Coltura dei campioni – Metodo dello striscio su piastra.

1. Collocare il dispositivo di prelievo (tampone) in una provetta del tampone campione (tappo blu).

Contrassegnare la provetta del tampone campione sul tappo e/o sull'etichetta della provetta.

2. Rompere lo stelo del tampone e chiudere bene la provetta.

Stringere il tampone dallo stelo vicino al margine della provetta (usare una garza per evitare il rischio di contaminazione). Sollevare di alcuni millimetri il tampone dal fondo e piegare lo stelo sul margine della provetta per spezzarlo. Metodo alternativo: tagliare lo stelo con forbici pulite. Assicurarsi che il tappo sia ben serrato.

3. Agitare con vortex ad alta velocità per 1 minuto.

Per analizzare un numero più elevato di campioni, è possibile utilizzare un adattatore a più alloggiamenti.

4. Trasferire 50 µL di sospensione cellulare in una provetta di lisi (tappo giallo).

Per ulteriori informazioni sulla coltura dei campioni con quanto rimane della sospensione cellulare e tampone, consultare la sezione Coltura dei campioni – Brodo di arricchimento.

5. Agitare la provetta di lisi con vortex ad alta velocità per 5 minuti.

Per analizzare un numero più elevato di campioni, è possibile utilizzare un adattatore a più alloggiamenti.

6. Centrifugare brevemente (quick spin) la provetta di lisi.

Far girare a bassa velocità per 2-5 secondi per far depositare il contenuto solido sul fondo della provetta.

7. Riscaldare a 95 ± 2 ºC per 2 minuti.

Utilizzare un blocco di riscaldamento a secco per provette da 1,5 mL o un apparecchio per bagnomaria.

8. Tenere la provetta di lisi in ghiaccio o su raffreddatore.

I lisati si mantengono stabili per un massimo di 4 ore a 2-8 °C.

Procedura del saggio BD GeneOhm™ VanR

Nota: **Una** provetta ricostituita di *Master Mix* (Master Mix, **etichetta bianca**) fornisce reagenti sufficienti **a eseguire 8 reazioni.** Predisporre una provetta SmartCycler® per ciascun campione da analizzare e 2 ulteriori provette SmartCycler® per i controlli positivo e negativo. **Per ogni seduta con BD GeneOhm™ vanR, predisporre 1 controllo positivo e 1 negativo.** Per ogni seduta (Controllo positivo) è necessario **1** *Control DNA* (DNA di controllo, **etichetta a strisce rosse**). Per ricostituire un massimo di 3 provette di Master Mix è necessaria **1** provetta di *Diluent* (diluente **etichetta a strisce nere**). Prelevare il numero richiesto di provette dai sacchetti protettivi, **rimuovere l'aria in eccesso e sigillare subito i sacchetti con la chiusura a zip**.

Preparare solo un numero di provette SmartCycler® corrispondenti ai moduli I-CORE® disponibili sullo SmartCycler®.

1. Porre il numero richiesto di provette di Master Mix su ghiaccio o su un blocco di raffreddamento per provette da 1,5 mL.

2. Aggiungere 225 µL di diluente (etichetta a strisce nere) a ogni provetta di Master Mix.

Spingere la punta della micropipetta attraverso la membrana del tappo della provetta di Master Mix. Non inserire la punta troppo in profondità nel tappo. Erogare il diluente. Successivamente eliminare il diluente inutilizzato.

3. **Agitare con vortex le provette per 5-10 secondi.**

   Porre la provetta su ghiaccio o su un blocco di raffreddamento per provette da 1,5 mL fino all'uso. Le provette ricostituite di Master Mix rimangono stabili per 3 ore su ghiaccio o su un blocco di raffreddamento.

4. **Mettere una provetta con DNA di controllo (etichetta a strisce rosse) su ghiaccio o su un blocco di raffreddamento per provette da 1,5 mL.**

5. **Aggiungere 225 µL di tampone (tappo blu) alla provetta con DNA di controllo.**

   Spingere la punta della micropipetta attraverso la membrana del tappo della provetta con DNA di controllo. Non inserire la punta troppo in profondità nel tappo. Erogare il tampone campione.

6. **Agitare con vortex la provetta per 5-10 secondi.**

   Porre la provetta su ghiaccio o su un blocco di raffreddamento per provette da 1,5 mL fino all'uso.

7. **Collocare il numero richiesto di provette SmartCycler® sul blocco di raffreddamento SmarCycler®.**

   Predisporre una provetta SmartCycler® per ciascun campione e altre due provette SmartCycler® per i controlli. **Evitare di toccare le finestre di rilevazione ottica sul fondo della provetta e l'area inferiore a forma di rombo.**

COMPLETARE le seguenti fasi entro UN'ORA

8. **Aggiungere 25 µL di Master Mix ricostituita alle provette SmartCycler®.**

   Togliere il tappo prima di pipettare il reagente. Erogare il liquido nel serbatoio (parte superiore) delle provette SmartCycler®. Contrassegnare le provette SmartCycler® sul tappo. Si possono usare le etichette identificative dei campioni (in dotazione con il kit). Eliminare la Master Mix inutilizzata.

9. **Aggiungere 3,0 µL di ogni campione lisato a una diversa provetta SmartCycler® precedentemente riempita con Master Mix ricostituita e chiudere con i tappi le provette.**

   Fare attenzione a non aspirare le microsfere nel pipettare nella provetta di lisi. Una volta aggiunto il campione alla provetta SmartCycler®, pipettare nei due sensi 2-3 volte nel serbatoio per trasferire tutto il contenuto. Utilizzare una nuova punta della micropipetta per ogni campione.

10. **Aggiungere 3,0 µL del DNA di controllo ricostituito alla penultima provetta di SmartCyler® (Controllo positivo) e chiudere la provetta.**

    Una volta aggiunto il DNA, pipettare nei due sensi 2-3 volte nel serbatoio per trasferire tutto il contenuto. Contrassegnare come controllo positivo. Eliminare il DNA di controllo inutilizzato.

11. **Aggiungere 3,0 µL di tampone (tappo blu) all'ultima provetta di SmartCycler® (Controllo negativo) e chiudere la provetta.**

    Utilizzare la provetta del tampone campione al punto 5. Ciò consente di verificare se vi è stata contaminazione della PCR durante la manipolazione dei campioni. Contrassegnare come controllo negativo. Successivamente eliminare il tampone campione inutilizzato.

12. **Centrifugare tutte le provette per 5-10 secondi.**

    Utilizzare la microcentrifuga specificamente adattata in dotazione con lo SmartCycler®.

13. **Tenere le provette a 2-8 °C sul blocco di raffreddamento SmarCycler® prima di caricarle nello strumento.**

    All'occorrenza, congelare i lisati rimanenti a -20 ± 5 °C per usarli successivamente.

14. **Avviare un ciclo utilizzando il protocollo del saggio BD GeneOhm™ vanR.**

    Consultare il Manuale dell'utente dello SmartCycler® Dx Software.

15. **Inserire ogni provetta in un modulo I-CORE® dello SmartCycler® e chiudere il coperchio dell'I-CORE®.**

    Mettere i controlli positivo e negativo nelle posizioni appropriate (cfr. la sezione Controllo di qualità). Premere saldamente sulle provette per collocarle in posizione.

16. **Avviare il ciclo.**

Controllo di qualità

Controlli positivo e negativo

Le procedure per il controllo di qualità consentono di monitorare le prestazioni del saggio. Il controllo positivo permette di individuare problemi legati ai reagenti. Il controllo negativo consente di rilevare la contaminazione (residua) del reagente o dell'ambiente dovuta alla presenza del DNA contenente i geni *vanA* o *vanB* o dell'amplicone. I controlli positivo e negativo sono controlli del saggio (controlli delle analisi). Se un controllo non è valido, la seduta viene annullata. Il controllo interno incorporato in ogni miscela reagente consente di monitorare sia l'inibizione della PCR nei singoli campioni negativi, sia l'integrità dei reagenti. Tutti i controlli devono fornire risultati validi (nessun controllo positivo o negativo nullo).

Per ogni seduta con lo SmartCycler®, predisporre 1 controllo positivo e 1 controllo negativo. Il software assegna automaticamente la posizione dei controlli sullo strumento (consultare il Manuale dell'utente dello SmartCycler® Dx Software).

Controlli per l'analisi dei campioni

I ceppi utilizzati per i controlli devono essere testati secondo le linee guida o le direttive vigenti a livello locale, nazionale e/o europeo, o approvate dalle organizzazioni competenti. Per l'analisi dei campioni positivi si possono utilizzare ceppi di riferimento per VRE (ad es. American Type Culture Collection, ATCC 51299) o isolati clinici di VRE ben caratterizzati come controlli, mentre le colture di enterococchi vancomicina-sensibili (ad es. ATCC 29212) o di altri VRE non-*vanA/B* (ad es. *Enterococcus gallinarum* ATCC 700425) possono essere usate come controllo negativo esterno.

Le colonie isolate dopo 18-24 ore da piastra agar e sangue di montone 5% vanno risospese in fisiologica a 0,5 McFarland (~1,5 X 10^8 CFU/mL). Diluire la fisiologica per ottenere una sospensione di ~10^6 CFU/mL. Immergere il tampone consigliato (consultare Materiali necessari, ma non forniti) nella sospensione batterica ed eliminare il liquido in eccesso. Analizzare e sottoporre a test come per i campioni clinici (consultare le sezioni Preparazione dei campioni e Procedura per il saggio

BD GeneOhm™ vanR). I controlli per l'analisi dei campioni devono fornire risultati validi.

Per una guida generale sul Controllo di qualità, è possibile consultare i documenti CLSI MM3[8] e C24[9].

Coltura di campioni clinici

Per eseguire un test di identificazione, suscettibilità antimicrobica o tipizzazione epidemiologica, i campioni clinici possono essere coltivati in due fasi diverse della procedura di saggio BD GeneOhm™ MRSA.. La coltivazione può essere eseguita dal dispositivo di prelievo (tampone) prima di condurre l'analisi con BD GeneOhm™ vanR, utilizzando il metodo dello striscio su piastra, o dalla sospensione cellulare (previa sospensione delle cellule nel tampone campione durante la preparazione del campione) utilizzando un processo di arricchimento.

Metodo dello striscio su piastra

Adottare questa metodica colturale prima della procedura di preparazione del campione per BD GeneOhm™ vanR.

1. Inoculare una piastra di isolamento primario per VRE, strisciando il tampone di prelievo sul primo quadrante della piastra.

   Si consiglia di utilizzare piastre di agar, bile, esculina e azide con 6 µg/mL di vancomicina (BEAV).
2. Riporre il tampone nel suo contenitore o spezzarlo in una provetta di tampone campione (tappo blu), seguendo le istruzioni contenute nella sezione Preparazione del campione.
3. Servendosi di un'ansa sterile, strisciare l'inoculo sugli altri quadranti della piastra.
4. Lasciare in incubazione la piastra per 24-72 ore a 35 °C.
5. Identificare e confermare le colonie di enterococchi ed eseguire il test per la resistenza alla vancomicina secondo le normali metodiche.

Brodo di arricchimento

Questa tecnica di coltura può essere applicata utilizzando la sospensione cellulare rimasta nella provetta del tampone campione dopo il trasferimento di 50 µL di sospensione cellulare nella provetta di lisi. La sospensione cellulare può essere conservata a 2-8 °C in provetta chiusa con tampone campione per massimo 24 ore prima di eseguire la coltura; il recupero potrebbe non riuscire con campioni clinici che contengono basse quantità di VRE.

1. Trasferire 300 µL di sospensione cellulare in 5 mL di brodo di arricchimento.

   Si consiglia di usare brodo di bile, esculina e azide.
2. Agitare con vortex per 2-5 secondi.
3. Lasciare in incubazione per 24-48 ore a 35 °C.
4. Trasferire su un terreno solido appropriato per 24-72 ore a 35 °C.

   Si consiglia di usare piastre BEAV.
5. Identificare e confermare le colonie di enterococchi ed eseguire il test per la resistenza alla vancomicina secondo le normali metodiche.

Interpretazione dei risultati

L'algoritmo decisionale del saggio BD GeneOhm™ vanR è incluso nel software SmartCycler®. I risultati del saggio vengono interpretati in base ai seguenti criteri:

Tipo di campione	Risultato del saggio secondo lo strumento[1]	Risultato del CI secondo lo strumento[1]	Interpretazione dei risultati da parte dell'utente
Campione clinico	NEG (NEGATIVO)	PASS (SUPERATO)	DNA *vanA* o *vanB* non rilevati
	POS (POSITIVO)	NA (NA)	Rilevato DNA del gene per la resistenza *vanA* (*vanB* assente); probabili enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE).
	Presumptive POS (Presunto POS)	NA (NA)	Rilevato DNA del gene per la resistenza *vanB* [2] (*vanA* assente); probabili enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE), gene per la resistenza *vanB* forse da un altro organismo.
	Positive (Positivo)	NA (NA)	Rilevato DNA dei geni per la resistenza *vanA* e *vanB*; probabili enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE).[3]
	Unresolved (Irrisolto)	FAIL (NON RIUSCITO)	Incerto; inibizione da parte del campione o inattività del reagente.
	ND (ND)	ND (ND)	Non determinato a causa di problemi al modulo I-CORE® (con Avvertenza o Codice di errore[1]).
Controllo positivo	Valid (Valido)	NA (NA)	Controllo positivo valido; seduta valida quando anche il Controllo negativo è valido.
	Invalid (Invalido)	NA (NA)	Controllo positivo Nullo; seduta nulla.[4] I risultati del saggio sono nulli e non devono essere refertati.
Controllo negativo	Valid (Valido)	PASS (SUPERATO)	Controllo negativo valido; seduta valida quando è valido anche il Controllo positivo.
	Invalid (Invalido)	FAIL (Non Riuscito)	Controllo negativo nullo; seduta nulla.[4] I risultati del saggio sono nulli e non devono essere refertati.

CI: Controllo Interno; NA: Non Applicabile; ND: Non Determinato

NOTE: [1] Per l'interpretazione di avvertenze e codici di errore consultare il Manuale dell'utente dello SmartCycler® Dx Software.
[2] Tenere in coltura i campioni *vanB*-positivi e *vanA*-negativi, per confermare la presenza di enterococchi resistenti alla vancomicina.
[3] Se per ragioni epidemiologiche è necessaria una verifica del gene *vanB*, predisporre la coltura ed eseguire il test di conferma.

[4] Le sedute nulle, i codici di errore dello strumento e le avvertenze sono riportati sullo schermo o nel referto. Prima di refertare i risultati relativi a *vanA* e *vanB*, verificare sempre se la seduta è valida.
Se sottoposti a test, i risultati della coltura devono essere interpretati dall'utente.

Seduta non valida

Utilizzando lisati congelati, preparare nuove provette per tutti i campioni clinici della seduta interessata, utilizzando nuove provette di controllo.

Campioni incerti

Ripetere il test con il corrispondente lisato congelato del campione. È dimostrato che il ciclo congelamento-scongelamento riduce le sostanze inibitrici della PCR.

Campioni non determinati a causa di problemi al modulo I-CORE®

Ripetere il test con il corrispondente lisato congelato del campione. Per l'interpretazione dei messggi di avvertenza e di codici di errore, consultare il Manuale dell'utente dello SmartCycler® Dx Software.

Limiti della procedura

- **Si sconsiglia di usare il prodotto con strumenti automatici per la real time PCR diversi dallo SmartCycler®, o con sistemi di prelievo e trasporto dei campioni diversi da quelli elencati nella sezione Materiali necessari, ma non forniti, in quanto le loro prestazioni metodologiche non sono state determinate.**
- **Le prestazioni metodologiche di questo prodotto non sono state determinate con altri tipi di campioni clinici.**
- Possono verificarsi risultati negativi per l'inadeguatezza delle procedure di prelievo, trattamento o conservazione dei campioni, per la presenza di inibitori, per errori tecnici, per lo scambio dei campioni, o perché il numero di organismi nel campione è inferiore al valore di sensibilità analitica del test. Per evitare errori nei risultati, attenersi scrupolosamente alle istruzioni fornite nell'inserto e nel Manuale dell'utente dello SmartCycler® Dx Software. Questo test deve essere eseguito esclusivamente dal personale addestrato alla procedura e all'uso dello SmartCycler®.
- A volte il saggio BD GeneOhm™ vanR fornisce risultati Incerti, Non Determinati (a causa di problemi al modulo I-Core®) o Nulli (a causa di un controllo non valido) che richiedono la ripetizione del test.
- La positività del test non indica necessariamente la presenza di organismi vitali, in quanto i risultati potrebbe essere influenzati dalla concomitante terapia antibiotica. Un risultato positivo è comunque presuntivo per la presenza di VRE in base al rilevamento dei geni *vanA* e *vanB*. Il saggio non consente di rilevare la presenza degli enterococchi. Il saggio permette di individuare i geni *vanA* e *vanB* portati dai non-enterococchi.
- Le mutazioni o i polimorfismi a livello del primer o nelle regioni leganti le sonde possono influenzare il rilevamento di varianti nuove o sconosciute di VRE, determinando un risultato falso negativo nel saggio.
- Anche se i reagenti sono già pronti all'uso e la metodica prevede solo l'impiego di pipette, la padronanza delle tecniche di laboratorio è essenziale per una corretta esecuzione di questo saggio. A causa dell'elevata sensibilità analitica del test, prestare massima attenzione per preservare la purezza di tutti i reagenti, particolarmente nei casi in cui più aliquote vengono prelevate da una stessa provetta.
- I risultati dello screening rispecchiano lo stato di colonizzazione in un dato momento e variano in funzione del trattamento o delle condizioni del paziente e dell'esposizione ad ambienti a elevato rischio (ad es. contatto con portatori di VRE o lunga degenza). Il monitoraggio dello stato di colonizzazione deve essere condotto in conformità con le procedure adottate a livello ospedaliero.
- La positività dei risultati del BD GeneOhm™ vanR per *vanB* in assenza di *vanA* può essere dovuta a organismi diversi dai VRE. Si consiglia di confermare la presenza di tali organismi con metodi colturali.
- Secondo quanto riportato in letteratura, il saggio può rilevare e individuare alcuni batteri anaerobi contenenti il gene *vanB*[10,11,12], sebbene la rilevanza clinica di tale scoperta non sia ancora chiara. I batteri anaerobi positivi al gene *vanB* potrebbero costituire un serbatoio per la resistenza alla vancomicina[2], ma tale ipotesi non è stata ancora dimostrata.
- Nei pazienti sono stati individuati ceppi di *Staphylococcus aureus* vancomicina-resistenti contenenti il gene *vanA* della resistenza alla vancomicina[13], che potrebbero fornire risultati positivi con questo saggio.
- Un ridotto numero di copie del target *vanA* potrebbe non essere rilevabile in presenza di un numero molto elevato di copie del target *vanB* ($\geq 10^5$ copie di DNA per PCR).

Sostanze che interferiscono

Le sostanze potenzialmente interferenti comprendono, a titolo esemplificativo: sangue, feci, muco, lubrificanti e sostanze utilizzate per lenire i dolori emorroidali.

Prestazioni metodologiche

Prestazioni cliniche

Le prestazioni metodologiche del saggio BD GeneOhm™ vanR sono state determinate con una ricerca prospettica multicentrica. Tre centri hanno partecipato allo studio. Per essere inseriti nello studio, i campioni dovevano provenire da pazienti per i quali era stata prescritta la coltura in accordo alle procedure ospedaliere.

Il metodo di riferimento consisteva in un'analisi iniziale condotta su piastra di agar, bile, esculina e aziende con 6 μg/mL di vancomicina(BEAV). Le colonie di enterococchi confermate sono state sottoposte ai test per la resistenza alla vancomicina. I campioni negativi per VRE sono stati sottoposti a un'ulteriore analisi che prevedeva una fase di arricchimento in brodo di bile, esculina e azide con 6 μg/mL di vancomicina (BEAV). Per l'identificazione fenotipica di *vanA* e *vanB* è stato utilizzato il test per la concentrazione minima inibente (MIC) di vancomicina e teicoplanina. Un campione di VRE coltura-positivo per *vanA* e/o *vanB* è definito un campione positivo per *vanA* e/o *vanB* in base ai risultati della tecniche di coltura e alla MIC. Un campione di VRE coltura-negativo per *vanA* e/o *vanB* è definito un campione negativo per *vanA* e/o *vanB* in base sia al metodo iniziale sia alla coltura arricchita.

Per il metodo di screening con crescita selettiva su BEAV, le piastre sono stata inoculate direttamente dai tamponi e quindi tenute in incubazione a 35 °C per 24-48 ore. Le presunte colonie di *Enterococcus* sono state trasferite (sottocoltura) su piastre di agar sangue di montone al 5% e tenute in incubazione per 18-24 ore a 35 °C. Le colonie che presumibilmente contenevamo il gene dell'*Enterococcus* sono state sottoposte al test dell'arimalidasi pirrolidonilica (PYR). In caso di test PYR positivo, l'identificazione della specie di enterococchi è stata eseguita utilizzando gli idonei test disponibili in commercio. Per gli enterococchi confermati la resistenza a vancomicina e teicoplanina è stata determinata con il metodo della MIC. È stato condotto anche lo screening dei VRE con arricchimento in brodo di

BEAV (6 μg/mL di vancomicina) nei casi in cui si è ottenuto un risultato sensibile o intermedio per i VRE con il metodo di screening su piastre di BEAV. Per questa ragione, i brodi di BEAV sono stati inoculati dopo piastratura diretta su BEAV e tenuti in incubazione per 24-48 ore a 35 °C. I brodi di BEAV che mostravano una crescita di colore nero sono stati trasferiti su piastre di BEAV (6 μg/mL di vancomicina) e lasciati in incubazione per 24-48 ore a 35 °C. Le presunte colonie di *Enterococcus* sono state trasferite (sottocoltura) su piastre contenenti agar con sangue di montone 5% e tenute in incubazione per 18-24 ore a 35 °C. La conferma delle presunte colonie e la determinazione della resistenza a vancomcina/teicoplanina sono state effettuate come descritto in precedenza. Sono stati considerati positivi i campioni per i quali è stata confermata la presenza di enterococchi resistenti alla vancomicina.

La Tavola 1 mostra i risultati finali (823) concordanti e discordanti del saggio BD GeneOhm™ vanR rispetto al metodo di riferimento. Ottantanove (89) campioni sono risultati negativi con il metodo colturale e positivi con la PCR solo per *vanB*, questi potrebbero rappresentare organismi non-enterococchi portatori del gene *vanB*.

In totale, 836 campioni perianali o rettali sono stati prelevati e analizzati per accertare la presenza di enterococchi resistenti alla vancomicina, utilizzando il metodo di riferimento descritto in precedenza e il saggio BD GeneOhm™ vanR (Tavola 2). Rispetto al metodo di riferimento, il saggio BD GeneOhm™ vanR ha permesso di individuare il 92,3% dei campioni positivi e l'83,5% dei campioni negativi.

Rispetto al metodo di riferimento, il saggio BD GeneOhm™ vanR ha permesso di individuare il 94,5% e il 90,0% dei campioni positivi perianali e rettali, rispettivamente, e l'88,0% e il 76,1% dei campioni negativi perianali e rettali, rispettivamente (Tavola 3).

Cinquantaquattro (54) campioni hanno fornito un risultato iniziale incerto (ad es. per un problema del controllo interno), corrispondenti a un tasso del 6,5%. Ripetendo il testo, 41 di questi campioni hanno generato risultati validi, mentre solo 13 campioni sono rimasti incerti, equivalenti a un tasso finale dell'1,6% (Tavola 4).

Tre (3) sedute su un totale di 87 hanno fornito risultati non validi (ad es. per un problema dei controlli positivo e/o negativo), equivalenti a un tasso complessivo del 3,4% (Tavola 5).

Tavola 1. Risultati ottenuti con il saggio BD GeneOhm™ vanR rispetto al metodo di riferimento.

		Risultati della coltura			**Totale**
		VanA	***VanB***	**Negativi**	
Risultati del BD GeneOhm™ vanR	***VanA***	96	0	18	114
	vanA* e *vanB	23	2	5	30
	vanB	6	5	89	100
	Negativi	10	1	568	579
	Totale	135	8	680	823

Tavola 2. Prestazioni cliniche della ricerca specifiche per sito e complessive ottenute con il saggio BD GeneOhm™ vanR rispetto al metodo di riferimento.

Sito di ricerca	**Prevalenza di VRE**	**Sensibilità del BD GeneOhm™ vanR con IC 95%[1]**	**Specificità del BD GeneOhm™ vanR con IC 95%[1]**
Sito 1	17,1% (55/322)	98,2% (54/55) (90,3% - 100,0%)	83,8% (218/260) (78,8% - 88,1%)
Sito 2	10,9% (26/239)	88,5% (23/26) (69,8% - 97,6%)	90,1% (192/213) (85,3% - 93,8%)
Sito 3	23,6% (65/275)	88,7% (55/62) (78,1% - 95,3%)	76,3% (158/207) (69,9% - 81,9%)
Studio complessivo	17,5% (146/836)	92,3% (132/143) (86,7% - 96,1%)	83,5% (568/680) (80,5% - 86,2%)

Il Sito 1 ha prelevato solo tamponi perianali, il Sito 3 solo tamponi rettali e il Sito 2 ha prelevato sia tamponi perianali che rettali.
[1] Intervalli di confidenza binomiale del 95%.

Tavola 3. Prestazioni cliniche ottenute con il saggio BD GeneOhm™ vanR, sia complessive che per tipo di campione, rispetto al metodo di riferimento.

Tipo di campione	**Sensibilità del BD GeneOhm™ vanR con IC 95%**	**Specificità del BD GeneOhm™ vanR con IC 95%**
Perianale	94,5% (69/73) (86,6% - 98,5%)	88,0% (374/425) (84,5% - 90,9%)
Rettale	90,0% (63/70) (80,5% - 95,9%)	76,1% (194/255) (70,4% - 81,2%)
Studio complessivo	92,3% (132/143) (86,7% - 96,1%)	83,5% (568/680) (80,5% - 86,2%)

Tavola 4. Percentuale di incerti iniziali e ripetuti del saggio BD GeneOhm™ vanR.

Siti di ricerca	Percentuale incerti iniziali con IC 95%	Percentuale incerti dopo ripetizione con IC 95%
Sito 1	14,6% (47/322) (10,9% - 18,9%)	2,2% (7/322) (0,9% - 4,4%)
Sito 2	0,0% (0/239) (0,0% - 1,5%)	0,0% (0/239) (0,0% - 1,5%)
Sito 3	2,5% (7/275) (1,0% - 5,2%)	2,2% (6/275) (0,8% - 4,7%)
Studio complessivo	6,5% (54/836) (4,9% - 8,3%)	1,6% (13/836) (0,8% - 2,6%)

Tavola 5. Risultati nulli dei saggi BD GeneOhm™ vanR.

Sito di ricerca	Sedute nulle con intervallo di confidenza 95%
Sito 1	7,1% (2/28) (0,9% - 23,5%)
Sito 2	4,5% (1/22) (0,1% - 22,8%)
Sito 3	0,0% (0/37) (0,0% - 9,5%)
Studio complessivo	3,4% (3/87) (0,7% - 9,7%)

Specificità analitica

I test sono stati eseguiti su DNA genomico proveniente da 129 ceppi rappresentativi di organismi strettamente correlati, flora perianale e/o rettale normale e patogena, DNA umano o esogeno, 28 ceppi (17 ceppi di riferimento e 11 isolati clinici) di enterococchi vancomicina-sensibili o vancomicina-resistenti diversi da *vanA/vanB*. Nessuno dei campioni è risultato positivo ai test; pertanto, la specificità analitica è stata pari al 100%.

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica o soglia di rivelazione (*limit of detection*, LOD) è stata determinata con 1 ceppo ATCC (700221) di enterococchi *vanA* vancomicina-resistenti (*E. faecium*) e con 1 ceppo ATCC (51299) di enterococchi vancomicina-resistenti *vanB* (*E. faecalis*). Il DNA genomico purificato e quantificato in coltura, diluito nel tampone campione del saggio BD GeneOhm™ vanR è stato testato in 5 replicazioni. Il LOD è stato definito come la concentrazione minima, espressa in numero di copie di DNA e CFU per razione, a cui cinque replicazioni su cinque sono risultate positive.

Il LOD del saggio BD GeneOhm™ vanR è di 10 copie genomiche per reazione (o 2 CFU per reazione) per entrambi gli enterococchi vancomicina-resistenti *vanA* e *vanB*. Tenendo conto del fattore di diluizione dovuto all'analisi del campione, il LOD equivale a circa 1.600 CFU/tampone.

Riferimenti

[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. Recommandations for Preventing the Spread of Vancomycin Resistance – Recommandations 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 C24 (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 *vanB*2 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.

Questo kit viene commercializzato su licenza del Public Health Research Institute of the City of New York, Inc. (PHRI), e può essere utilizzato in conformità con i brevetti detenuti dal PHRI esclusivamente per scopi clinici nella diagnostica umana *in vitro*.

L'acquirente può utilizzare il presente prodotto per le procedure di amplificazione e rilevazione delle sequenze di acido nucleico nella diagnostica umana *in vitro*. Con la presente non viene concesso alcun brevetto generale né altra licenza di alcun tipo, fatto salvo il diritto d'uso derivante dall'acquisto del prodotto.

Questo prodotto è regolamentato da un accordo tra Molecular Probes, Inc. e Geneohm Sciences, Inc., e la produzione, l'uso, la vendita o l'importazione del prodotto possono essere disciplinati da uno o più brevetti statunitensi, richieste di brevetti e iniziative corrispondenti all'estero, facenti capo a Molecular Probes, Inc. (consociata interamente controllata di Invitrogen Corporation). Con l'acquisto del prodotto, l'acquirente può esercitare il diritto non trasferibile di usare il quantitativo acquistato di prodotto e i relativi componenti nei saggi per l'individuazione dell'acido nucleico al fine di individuare i microrganismi nella diagnostica umana. L'acquirente non può utilizzare il prodotto o i suoi componenti per fini industriali o per ragioni terapeutiche o profilattiche, né vendere o cedere il prodotto o i suoi componenti a terzi, né farne uso per fini diversi da quelli previsti per la diagnostica umana. Per informazioni sull'acquisto di una licenza del prodotto per fini diversi da quelli di diagnostica umana, contattare Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, oppure 97402, USA, Tel: +1 (541) 465-8300. Fax: +1 (541) 335-0504.

Indice dei simboli

SIMBOLO	SIGNIFICATO	SIMBOLO	SIGNIFICATO
	Produttore	LOT	**Numero di lotto**
REF	**Numero di catalogo**		**Limiti di Temperatura**
IVD	**Per uso diagnostico *in vitro***		**Tenere al riparo da luce e umidità**
EC REP	**Rappresentante europeo autorizzato**		**Chiudere la confezione dopo l'uso**
	Scadenza		**Consultare le istruzioni per l'uso**
Σ	**Contenuto sufficiente per "n" test**	Xi R36/38	**Irritante per gli occhi e la pelle**
1/3	**Contenitore 1 di 3**		

BD
Helping all people live healthy lives

Servizio Assistenza: 1.888.436.3646

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

CE

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.