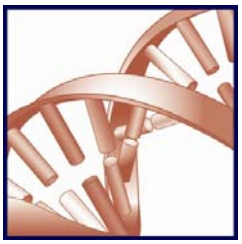
BD GeneOhm™ VanR Testi



REF	441250	48 TEST
	IVD	
REF	441251	200 TEST

İçindekiler

Kullanım Amacı ---------- 3
Testin Özeti ve Açıklaması ---------- 3
İşlemin Prensibi ---------- 3
Ayıraçlar ---------- 3
Önlemler ---------- 4
Sağlanan Materyaller ---------- 4
Saklama, Muamele ve Stabilite ---------- 5
Toplanan Örnekler ---------- 5
Ayıraçlar ---------- 5
Gereken Ama Sağlanmayan Materyaller ---------- 5
Kullanım Talimatı ---------- 6
Örnek Toplama ---------- 6
Örnek Hazırlama ---------- 6
BD GeneOhm™ VanR Test İşlemi ---------- 6
Kalite Kontrolü ---------- 7
Pozitif ve Negatif Kontroller ---------- 7
Örnek İşleme Koyma Kontrolleri ---------- 7
Klinik Örneklerden Kültür Alınması ---------- 7
Streak-Plate Yöntemi ---------- 7
Zenginleştirici Broth ---------- 8
Sonuçların Yorumlanması ---------- 8
Geçersiz Test Çalışması ---------- 9
Çözümlenmemiş Örnek ---------- 9
I-CORE® Modülü Başarısızlığı Nedeniyle Örnek Belirlenmedi ---------- 9
İşlemin Sınırlamaları ---------- 9
Enterferans Yapan Maddeler ---------- 9
Performans Özellikleri ---------- 9
Analitik Özgüllük ---------- 11
Analitik Hassasiyet ---------- 11
Referanslar ---------- 12
Semboller İndeksi ---------- 13

Türkçe

Kullanım Amacı

BD GeneOhm™ VanR Testi perianal ve/veya rektal sürüntülerde doğrudan vankomisine direnç (*van*A ve *vanB*) genlerinin hızlı bir şekilde saptanması için kalitatif bir *in vitro* testtir. BD GeneOhm™ VanR Testi vankomisine dirençli enterokoklarla (vancomycin-resistent enterococci - VRE) ilişkili olabilecek *vanA* ve *vanB* genlerinin varlığını saptar. Test otomatik bir gerçek zamanlı PCR aletinde, VRE kolonizasyonu riski olan bireylerden alınmış perianal ve/veya rektal sürüntülerle yapılır. BD GeneOhm™ VanR Testi sağlık bakımı ortamında vankomisine dirençli kolonizasyonu tanımlamaya, önlemeye ve kontrol etmeye yardımcı olmak üzere kullanılabilir. BD GeneOhm™ VanR Testinin VRE enfeksiyonlarına tanı koyması veya VRE enfeksiyonları konusunda tedaviye rehberlik yapması ya da tedaviyi izlemesi amaçlanmamıştır. Epidemiyolojik tipin belirlenmesi amacıyla organizmaların elde edilmesi veya daha ileri doğrulayıcı tanımlama için eş zamanlı kültürler gereklidir.

Testin Özeti ve Açıklaması

Bir perianal ve/veya rektal sürüntü alınıp laboratuara önerilen taşıma cihazı kullanılarak gönderilir ("Gereken ama Sağlanmayan Materyaller" kısmına bakınız). Eküvyon örnek tamponuna yerleştirilir ve örnek lizise uğratılır. Lizis alikotu, mevcutsa genetik hedefi amplifiye etmek için kullanılan *vanA* ve *vanB*'ye spesifik primerleri içeren PCR ayıraçlarına eklenir. Test ayrıca PCR engelleyici örnekleri saptamak ve test ayıraçlarının doğruluğunu kontrol etmek açısından bir dahili kontrol (IC) içerir. Amplifiye hedefler, sönmüş floroforlar (moleküler işaretler) ile etiketlenmiş hibridizasyon probları ile saptanır. Sinyallerin amplifikasyonu, saptanması ve yorumlanması otomatik olarak Cepheid Smart Cycler® aleti yazılımı ile yapılır. İşleme konan örneklerin sayısına bağlı olarak tüm işlem 60 – 75 dakika sürer. Epidemiyolojik tip belirleme ve tür tanımlama için organizmaların elde edilmesi örnek hazırlama sonrasında veya işleme koymadan sonraki 24 saat içinde uygun kültür ortamı inokülasyonuyla yapılabilir.

Enterokoklar gastrointestinal kanalda yer alırlar ve normal flora kabul edilirler. Son yirmi yıl içinde önemli nozokomiyal patojenler olarak ortaya çıkmaları büyük ölçüde genelde kullanılan birçok antibiyotiğe dirençli olmalarına bağlıdır.[1,2] Çoğu enterokok enfeksiyonu endojen kaynaklara (hastanın normal florası) bağlanmış olsa da personelin kontamine elleri, kontamine hasta bakımı ekipmanı ve/veya çevredeki yüzeylerden bulaşma olur. Özellikle vankomisine dirençli suşların ortaya çıkmasıyla bazı enterokok enfeksiyonlarının tedavisi önemli ölçüde zorlaşmıştır. Vankomisin direncinden (doğuştan veya kazanılmış) birkaç gen sorumlu olsa da *vanA* ve *vanB* genleri Vankomisine Dirençli Enterokoklarda (VRE) temel olarak görülenlerdir[3] ve klinik olarak önemli olanlar sadece bunlardır. Direnç tipinin bilinmesi enfeksiyon kontrolü amacıyla çok önemlidir. *vanA* ve *vanB* genleri aktarılabilir ve organizmadan organizmaya yayılabilir. Aksine, *vanC* genleri aktarılamaz, ciddi enfeksiyonlarla daha az ilişkilendirilmiştir ve salgınlarla ilişkilendirilmemiştir.[2] VRE varlığı sağlık bakımı ortamlarında giderek artmaktadır ve A.B.D. hastanelerinde yoğun bakım ünitelerinde enterokok izolatlarının %28,5'ini temsil eder.[2] A.B.D.'de VRE izolatlarının yaklaşık %70'inde *vanA* fenotipi ve %25'inde *vanB* fenotipi gözlenir.[4] Sağlık bakımı ortamlarında VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonu için risk faktörleri arasında hastanede uzun süreli kalma, yoğun bakım üniteleri ve transplantasyon veya onkoloji koğuşlarına maruz kalma, daha önce antibiyotiklere maruz kalma ve VRE enfeksiyonu veya kolonizasyonu bulunan hastalara yakınlık vardır.[1,2,5] VRE taşıyan hastaların erken dönemde taranarak izolasyon gerektiren hastaların tanımlanması VRE için etkin bir enfeksiyon kontrol programının bir parçası olabilir. VRE saptamak için halen kullanılan onaylı tekniklerin tümünde bir kültür basamağı ve saf kolonilerin izolasyonu vardır ve bunu vankomisin duyarlılık testi veya *vanA* ve *vanB* genlerinin saptanması izler. Bu durum VRE taşıyıcılık durumunun belirlenmesi süresini minimum 48 saate çıkarır ve ortanca süre 72 saatin üzerindedir. VRE'nin özellikle taşıyıcıların sık görüldüğü sağlık bakımı ortamlarında hızla yayılabilmesi nedeniyle hastaneye yatma gününde VRE perianal ve/veya rektal taşıma sonuçlarının temin edilebilmesi enfeksiyon kontrolü programları için kesin bir avantaj sağlamaktadır.

İşlemin Prensibi

Örnek lizisinden sonra, mevcutsa *vanA* ve *vanB* genetik hedefleri amplifiye olur. VRE'de bulunmayan 254 bp uzunluğunda bir dizi dahil 294 bp DNA fragmanı olan IC'nin amplifikasyonu da PCR engelleyici maddeler mevcut değilse gerçekleşir.

Amplifiye DNA hedefleri bir uçta bir söndürücü ve öteki uçta bir floresan raportör boya (florofor) ile etiketlenmiş, saç tokası şekli oluşturan tek iplikli oligonükleotidler olan moleküler işaret probları tarafından saptanır. Hedef yokluğunda floresans söner. Hedef varlığında toka yapısı işaret/hedef hibridizasyonu durumunda açılıp floresans emisyonu yapar. *vanA* amplikonunun saptanması için moleküler işaret probu, 5' ucunda FAM floroforunu ve oligonükleotidin 3' karşı ucunda floresan olmayan söndürücü kısım DABCYL içerir. *vanB* amplikonunu saptamak için moleküler işaret probunda 5' ucunda Texas Red floroforu ve 3' ucunda söndürücü DABCYL bulunur. IC amplikonunu saptamak için moleküler işaret probunda 5' ucunda TET floroforu ve 3' ucunda söndürücü DABCYL bulunur. Her işaret-hedef hibridi belirli moleküler işaret probunda kullanılan floroforun dalga boyu özelliğine göre floresans yayar. Herhangi bir döngüde veya cycling sonrasında floresans miktarı o anda bulunan belirli amplikonun miktarına bağlıdır. SmartCycler® yazılımı her moleküler işaret probunda yayılan floresansı aynı anda izler, tüm verileri yorumlar ve cycling programı sonunda son bir sonuç verir ("Sonuçların Yorumlanması" kısmına bakın).

Ayıraçlar

BD GeneOhm™ VanR Testi	**48 Test**	**200 Test**
Örnek tamponu (Sample Buffer)	**60 X 1 mL**	**240 X 1 mL**
Tris-EDTA tamponu		
Lizis tüpü (Lysis tube)	**50 tüp**	**200 tüp**
Cam boncuklar		
Ana Karışım (Master Mix)	**8 tüp**	**34 tüp**
< %0,0005 DNA polimeraz kompleksi		
< %0,001 Dahili Kontrol - *vanA* ve *vanB* primer bağlama dizileri içeren enfeksiyöz olmayan DNA prob hibridizasyonu için özgün bir dizi ile		
< %0,002 primerler		
< %0,002 moleküler problar		
< %0,05 dATP, dCTP, dGTP, dTTP		
Sığır serum albümini		
Karbonhidrat		

$MgCl_2$

< %0,001 enfeksiyöz olmayan *Staphylococcus epidermidis* genomik DNA (ATCC 14990)

Kontrol DNA (Control DNA)	**8 tüp**	**34 tüp**
Tris-EDTA tamponu		
Karbonhidrat		
< %0,001 *vanA* taşıyan enfeksiyöz olmayan genomik *Enterococcus faecium* (ATCC 700221) ve *vanB* DNA taşıyan *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299)		
Seyreltici (Diluent)	**8 X 700 µL**	**34 X 700 µL**
Tris-HCl tamponu		
$MgCl_2$		
$(NH_4)_2SO_4$		
KCl		

Önlemler

Sadece *in vitro* diagnostik kullanım içindir

- Dış karton güvenlik mührü bozulmuşsa kiti kullanmayın.
- Koruyucu poşetler geldiklerinde açık veya yırtıksa ayıraçları kullanmayın.
- Ana Karışım ve kontrol DNA poşetlerinden kurutucuyu çıkarmayın.
- Ana Karışım ve kontrol DNA poşetlerinin içinde kurutucu yoksa, ayıraçları kullanmayın.
- Ana Karışım ve kontrol DNA'nın koruyucu poşetlerini her kullanımdan sonra fermuar şeklinde kapanan mühürle çabucak kapatın.
- Ayıraçlar lotlar arasında değiştirilemez.
- Farklı tüplerden ayıraçları, aynı lottan olsalar bile, asla bir araya koymayın.
- Ayıraçları son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
- Ayıraçların kapaklarını birbirleriyle değiştirmeyin çünkü kontaminasyon oluşabilir ve test sonuçlarını tehlikeye atabilir.
- Tüplerden alikotları çıkarırken ayıraçların mikrobiyel ve deoksiribonükleaz (DNAse) kontaminasyonundan kaçının. Steril, DNAse içermeyen tek kullanımlık filtre bloklu veya pozitif displasman pipetör uçlarının kullanılması önerilir.
- Ortamın *vanA* ve *vanB* amplikonlarıyla kontaminasyonunu önlemek için reaksiyon tüplerini amplifikasyon sonrasında açmayın.
- Her örnek veya ayıraç için yeni bir pipetör ucu kullanın.
- Testin süresinin önerilen süre aralığının dışına çıkması geçersiz sonuçlara neden olabilir. Belirtilen süreler içinde yapılmayan testler tekrarlanmalıdır.
- Yerel, bölgesel ve/veya ulusal yönetmelikler veya sertifikasyon sağlayan kurumların gereklilikleri veya kılavuz ilkelere veya göre ek kontroller test edilebilir.
- Laboratuar tarafından açık tüplü PCR testlerinin de aynı genel alanda yapıldığı durumlarda örnek hazırlama ve amplifikasyon/saptama aktiviteleri için ayrılmış çalışma alanları kullanılmalıdır. Malzeme ve ekipman her alan için ayrı olmalı ve bir alandan ötekine götürülmemelidir. Daima eldiven kullanılmalı ve bir alandan ötekine giderken değiştirilmelidir. Liyofilize ayıraçlar kullanılmadan önce eldivenler değiştirilmelidir.
- Örnekleri daima bulaşıcı olabilirlermiş gibi *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*[6] ve CLSI Belgesi M29[7] içinde tanımlandığı gibi güvenli laboratuar işlemlerine göre kullanın.
- Kit ayıraçlarını kullanırken koruyucu giysiler ve tek kullanımlık eldivenler kullanın. Testi yaptıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın.
- Ağzınızla pipetlemeyin.
- Örneklerin veya kit ayıraçlarının kullanıldığı yerlerde sigara içmeyin ve bir şey yemeyin ve içmeyin.
- Kullanılmamış ayıraçları ve atıkları ulusal, bölgesel ve yerel yönetmeliklere göre atın.

Sağlanan Materyaller

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

Saklama, Muamele ve Stabilite

Toplanan Örnekler

Örnekler taşıma sırasında 2°C ile 25°C arasında tutulmalıdır. Donmaya veya aşırı sıcağa maruz kalmaya karşı koruyun.

Örnekler test yapılmasından önce 2 – 8°C'de 5 gün saklanabilir. Testin 36 saat içinde yapılabileceği örnekler oda sıcaklığında (15 – 25°C) saklanabilir.

Ayıraçlar

Not: Saklama koşulları her poşette yazılı spesifikasyonlara uymalıdır.

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

[1] *Master MIx* ve *Control DNA* poşetlerindeki orijinal mühür bozulduktan sonra her poşeti kullanım sonrasında fermuar şeklinde kapanan bir mühürle dikkatle kapatın ve uygun sıcaklıkta saklayın.

[2] Bu ayıraçlar oda sıcaklığında saklanabilse de aynı lottan birlikte gelen ayıraçlarla birlikte 2 – 8°C'de saklanmalıdır.

[3] Sağlanan torbalar her kullanımdan sonra fermuar şeklinde kapanan mühürle uygun şekilde kapatılmalıdır.

Koruyucu Poşeti Dışında Kit Bileşeni			*Master Mix* ve *Control DNA* (**beyaz** ve **kırmızı** Strip Etiketler)
Rekonstitüsyon yapılmamış tüpler		**Sıcaklık**	15 – 25°C
		Stabilite	2 saat
Rekonstitüsyon yapılmış tüpler[1]	**Orijinal kap**	**Sıcaklık**	2 – 8°C
		Stabilite	3 saat
	SmartCycler® tüpü	**Sıcaklık**	2 – 8°C
		Stabilite	1 saat

[1] Belirtilen stabilite sonlandığında kullanılmamış tüpleri atın.

Gereken Ama Sağlanmayan Materyaller

- **BBL™ CultureSwab™ Sıvı Stuart** (Becton Dickinson katalog no. 220099), **Copan Transystem™ Sıvı Stuart** (Copan Italia International katalog no. 141C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Sıvı Stuart** (Copan Diagnostics Inc. katalog no. 141C.US), veya
- **BBL™ CultureSwab™ Sıvı Amies** (Becton Dickinson katalog no. 220093), **Copan Transystem™ Sıvı Amies** (Copan Italia International katalog no. 140C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Sıvı Amies** (Copan Diagnostics Inc. katalog no. 140C.US), veya
- **BBL™ CultureSwab™ Plus Amies Jeli, Kömürsüz** (Becton Dickinson katalog no. 220116), **Copan Transystem™ Amies Agar Jel, Kömürsüz** (Copan Italia International katalog no. 108C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Amies Agar Jel, Kömürsüz** (Copan Diagnostics Inc. katalog no. 108C.US), veya
- **BBL™ CultureSwab™ Plus Amies Jel, Kömürlü** (Becton Dickinson katalog no. 220121), **Copan Transystem™ Amies Agar Jel, Kömürlü** (Copan Italia International katalog no. 114C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Amies Agar Jel, Kömürlü** (Copan Diagnostics Inc. katalog no. 114C.US).
- **6 µg/mL vankomisin eklenmiş Safra Eskülin Azit agar plakaları**
- **Vortex** Genie 2 (Fisher) 1,5 mL mikrotüp tutucu veya eşdeğeri ile; çok sayıda örneğin işleme konması için çok sayıda tüp tutabilen bir adaptör kullanılabilir
- **Mikropipetörler** (hassas aralık 1 – 10 µL, 10 – 100 µL ve 100 – 1000 µL arasında)
- **Steril, DNAse içermeyen** filtre bloklu veya pozitif displasman **mikropipetör uçları**
- **DNAse içermeyen mikrosantrifüj tüpleri**
- **Makas**
- **Gazlı bez**
- Tek kullanımlık **eldivenler**, pudrasız
- **Mikrosantrifüj**, düşük hızda santrifügasyon için
- **Kuru ısıtma bloğu**, 1,5 mL tüplere özel, veya su banyosu
- Buz veya **soğutma bloğu**, 1,5 mL tüplere özel
- Kapak çıkarma aracı (örn. MATRIX katalog no. 4469) (isteğe bağlı)
- Kronometre veya **süre ölçer**
- **SmartCycler® başlangıç sistemi**, **Dx Yazılımı** ile (işleme koyma bloğu, kullanıcı kılavuzu, aksesuar kiti ve bilgisayar)

Kullanım Talimatı

Örnek Toplama

Yeterli bir örnek almak için örnek toplama işlemi yakından izlenmelidir.

Önerilen eküvyonu kullanarak ("Gereken ama sağlanmayan materyaller" kısmına bakın), perianal ve/veya rektal örnekler aşağıdaki işleme göre alınır (Basamak 2, 3, 4 ve 5 üç süründü alma tekniği için aynıdır):

1. a. Bir perianal örnek almak için: Perianal bölgeden sürüntü alın.

1. b. Bir rektal örnek almak için: Eküvyonu anal sfinkterin yaklaşık 2,5 cm ilerisine yerleştirin ve eküvyonu 5 kez yuvarlayın.

1. c. Bir perianal/rektal örnek almak için: Perianal bölgeden sürüntü alın ve eküvyonu anal sfinkterin yaklaşık 2,5 cm ilerisine yerleştirin ve eküvyonu 5 kez yuvarlayın.

2. Eküvyonu kabına yerleştirin.

3. Kabı etiketleyin.

4. Eküvyonu laboratuara hastanenin standart çalışma işlemlerine göre gönderin.

5. "Saklama ve muamele için Saklama, Muamele ve Stabilite – Toplanan Örnekler" kısmına bakın.

Örnek Hazırlama

Not: **Test yapılacak** her örnek için **bir** *Sample Buffer* tüpü (örnek tamponu, **mavi kapak**) ve **bir** *Lysis tube* (lizis tüpü, **sarı kapak**) **gerekir. Gerekli sayıda tüpü koruyucu poşetlerden çıkarın,** fazla havayı giderin ve poşeti hemen fermuar şeklinde kapanan mühürle kapatın.

Sürüntü örneklerinden BD GeneOhm™ VanR Testi yapılmadan önce kültür yapılabilir; ayrıntılar için "Örneklerden kültür alma – **Tek koloni ekim** yöntemi" kısmına bakınız.

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

Örnek tamponu tüpünün tanımını kapak ve/veya tüp etiketi üzerinde yapın.

2. Eküvyon sapını kırın ve tüpü sıkıca kapatın.

Eküvyonu tüp kenarına yakın olarak sapından tutun (kontaminasyon riskini en aza indirmek için gazlı bez kullanın). Eküvyonu en dipten birkaç milimetre kaldırın ve kırmak için sapı tüpün kenarına doğru bükün. Alternatif yöntem: sapı kesmek için temiz makas kullanın. Kapağın sıkıca kapanacağından emin olun.

3. Yüksek hızda 1 dakika vorteksleyin.

Çok sayıda örneği işleme koymak için çok sayıda tüp tutabilen bir adaptör kullanılabilir.

4. Bir lizis tüpüne (sarı kapak) 50 µL hücre süspansiyonu aktarın.

Kalan hücre süspansiyonu ve eküvyon ile örneklerden kültür hazırlanması ayrıntıları için "Örneklerden kültür alma - Zenginleştirici Broth" kısmına bakınız.

5. Lizis tüpünü yüksek hızda 5 dakika vorteksleyin.

Çok sayıda örneği işleme koymak için çok sayıda tüp tutabilen bir adaptör kullanılabilir.

6. Lizis tüpünü kısa süre santrifüje edin (hızlı çevirme).

Katı içeriği tüpün dip kısmına getirmek için 2 – 5 saniye düşük hızda çevirin.

7. İki dakika boyunca 95 ± 2°C'de ısıtın.

1,5 mL tüplere özgü bir kuru ısıtma bloğu veya su banyosu kullanın.

8. Lizis tüpünü buz üzerinde veya bir soğutma bloğunda tutun.

Lizatlar 2 – 8°C'de 4 saate kadar stabildir.

BD GeneOhm™ VanR Test İşlemi

Not **Bir** rekonstitüsyon yapılmış *Master Mix* tüpü (Ana Karışım, **beyaz etiket**) **8 reaksiyon yapmaya** yeterli ayıraç sağlar. Test edilecek örnek başına bir SmartCycler® tüpü ve pozitif ve negatif kontroller için 2 ek SmartCycler® tüpü ayırın. **Her BD GeneOhm™ VanR Testi çalışmasına bir (1) pozitif ve bir (1) negatif kontrol dahil edilmelidir.** Her test çalışması için **bir** *Control DNA* (kontrol DNA, **kırmızı strip etiket**) gereklidir (Pozitif Kontrol). Üç (3) adede kadar Ana Karışım tüpünün rekonstitüsyonu için **bir (1)** ***Diluent*** **tüpü (seyreltme, siyah strip etiket)** gereklidir. Gerekli sayıda tüpü koruyucu poşetlerinden çıkarın, **fazla havayı giderin ve poşetleri hemen fermuar şeklinde kapanan mühürle kapatın.**

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

1. Gerekli sayıda Ana Karışım tüpünü/tüplerini 1,5 mL tüplere özel soğutma bloğuna veya buza koyun.

2. Her Ana Karışım tüpüne 225 µL seyreltici (siyah strip etiket) ekleyin.

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

3. Tüpü/tüpleri 5 – 10 saniye vorteksleyin.

Kullanıma hazır olana kadar tüpü 1,5 mL tüplere özel soğutma bloğuna veya buza koyun. Rekonstitüsyon yapılmış Ana Karışım tüpleri buz veya soğutma bloğu üzerinde 3 saat stabildir.

4. Bir kontrol DNA tüpünü (kırmızı strip etiket) 1,5 mL tüplere özel soğutma bloğuna veya buza koyun.

5. Kontrol DNA tüpüne 225 µL örnek tamponu (mavi kapak) ekleyin.

Mikropipetör ucunu kapak septumu içinden kontrol DNA tüpüne yerleştirin. Ucu kapak içine fazla derin yerleştirmeyin. Örnek tamponunu koyun.

6. **Tüpü 5 – 10 saniye vorteksleyin.**

   Kullanıma hazır olana kadar tüpü 1,5 mL tüplere özel soğutma bloğuna veya buza koyun.

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

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

Aşağıdaki basamaklar MUTLAKA BİR SAATLİK zaman çerçevesi içinde yapılmalıdır:

8. **Smart Cycler® tüplerine 25 µL rekonstitüsyon yapılmış Ana Karışım ekleyin.**

   Ayıracın pipetlenmesinden önce kapağı çıkarın. Sıvıyı SmartCycler® tüplerinin rezervuarına (üst kısım) koyun. SmartCycler® tüplerini kapakta tanımlayın. Örnek tanımlama etiketleri (kitle sağlanır) kullanılabilir. Kullanılmamış Ana Karışımı atın.

9. **Her lizise uğratılmış örnekten 3,0 µL miktarını önceden rekonstitüsyon yapılmış Ana Karışımla doldurulmuş farklı bir SmartCycler® tüpüne koyun; tüpleri kapatın.**

   Lizis tüpü içinden pipetleme yaparken boncukları aspire etmemeye dikkat edin. Örneğin SmartCycler® tüpüne eklenmesinden sonra tüm hacmin aktarıldığından emin olmak açısından rezervuar içinde 2 – 3 kez yukarı aşağı pipetleme yapın. Her örnek için yeni bir mikropipetör ucu kullanın.

10. **Rekonstitüsyon yapılmış kontrol DNA'sından 3,0 µL miktarını en sondan bir önceki SmartCycler® tüpüne ekleyin (Pozitif Kontrol); tüpü kapatın.**

    DNA eklendikten sonra tüm hacmin aktarıldığından emin olmak açısından rezervuar içinde 2 – 3 kez yukarı aşağı pipetleme yapın. Pozitif kontrol olarak tanımlayın. Kullanılmamış kontrol DNA'yı atın.

11. **Son SmartCycler® tüpüne 3,0 µL örnek tamponu (mavi kapak) ekleyin (Negatif Kontrol); tüpü kapatın.**

    Adım 5'te elde edilen örnek tamponu tüpünü kullanın. Bu işlem örneklerin kullanımı sırasında olabilecek PCR kontaminasyonu izleme açısından kontrol gerçekleştirecektir. Negatif kontrol olarak tanımlayın. Sonra kullanılmamış örnek tamponunu atın.

12. **Tüm reaksiyon tüplerini 5 – 10 saniye santrifüje edin.**

    SmartCycler® aleti ile sağlanan özel olarak uyarlanmış mikrosantrifüjü kullanın.

13. **Tüpleri alete yüklemeden önce SmartCycler® soğutma bloğu üzerinde 2 – 8°C'de tutun.**

    Kalan lizatlar gerekirse daha sonra kullanım için -20 ± 5°C'de dondurulmalıdır.

14. **BD GeneOhm™ VanR Test protokolü ile bir çalışma hazırlayın.**

    SmartCycler® Dx Yazılımı Kullanım Kılavuzuna bakın.

15. **Her reaksiyon tüpünü SmartCycler® aletinin I-CORE® modülüne yerleştirin ve I-CORE® kapağını kapatın.**

    Pozitif ve negatif kontrolleri uygun pozisyonlarına yerleştirin ("Kalite kontrolü" kısmına bakınız). Tüm tüpleri sıkıca yerlerine aşağıya doğru itin.

16. **Çalışmayı başlatın.**

Kalite Kontrolü

Pozitif ve Negatif Kontroller

Kalite kontrol işlemleri test performansını izlemek üzere tasarlanmıştır. Pozitif kontrol, önemli ayıraç hatalarını izlemek üzere tasarlanmıştır. Negatif kontrol, DNA içeren *vanA* veya *vanB* genleri veya amplikon tarafından ayıraç veya çevresel kontaminasyonu (veya taşımayı) saptamak üzere tasarlanmıştır. Pozitif ve negatif kontroller test kontrolleridir (çalışma kontrolleri). Geçersiz bir test kontrolü çalışmayı geçersiz hale getirir. Her reaksiyon karışımına dahil edilen bir dahili kontrolün her negatif örnekte PCR engellemesini ve ayıraç bütünlüğünü izlemesi amaçlanmıştır. Tüm kontroller geçerli sonuçlar vermelidir (geçersiz pozitif veya negatif kontrol yok).

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

Örnek İşleme Koyma Kontrolleri

Kontrol suşları yerel, bölgesel ve/veya ulusal yönetmelikler veya sertifikasyon sağlayan kurumların gereklilikleri veya kılavuz ilkelerine göre test edilebilir. Pozitif bir örnek işleme koyma kontrolü olarak bir referans VRE suşu (örn. American Type Culture Collection, ATCC 51299) veya iyi karakterize bir VRE klinik izolatı kullanılabilirken negatif örnek işleme koyma kontrolü olarak vankomisine duyarlı enterokok kültürü (örn. ATCC 29212) veya başka herhangi bir non-*vanA/B* VRE (örn. *Enterococcus gallinarum* ATCC 700425) kullanılabilir.

İzole edilmiş kolonileri %5 koyun kanlı agar plakasında içinde salinde 0,5 McFarland (~1,5 X 10^8 CFU/mL) türbiditeye kadar 18 – 24 saat tekrar süspansiyon haline getirin. ~10^6 CFU/mL süspansiyon elde edecek şekilde salin ile seyreltin. Önerilen eküvyonu ("Gereken ama Sağlanmayan Materyaller" kısmına bakınız) bakteriyel süspansiyona batırın ve fazla sıvıyı bastırarak giderin. Bir klinik örnek gibi işleme koyun ve test edin ("Örnek Hazırlama" ve " BD GeneOhm™ VanR Test İşlemi" kısımlarına bakınız). Örnek işleme koyma kontrollerinin geçerli sonuçlar vermesi gerekir.

Genel kalite kontrolü rehberliği için, CLSI MM3[8] ve C24[9] belgelerine bakabilirsiniz.

Klinik Örneklerden Kültür Alınması

Tür tanımlaması, antimikrobiyel duyarlılık testi veya epidemiyolojik tipleme yapmak için klinik örneklerden BD GeneOhm™ VanR Test işleminde iki farklı basamakta kültür alınabilir. Kültür alma işlemi BD GeneOhm™ VanR Testi yapılmadan önce toplama cihazı (eküvyon) ile streak-plate yöntemi kullanılarak veya bir zenginleştirme basamağı kullanılarak hücre süspansiyonundan yapılabilir (örnek hazırlama işleminde örnek tamponunda hücrelerin süspansiyonunu takiben).

Streak-Plate Yöntemi

Bu kültür yöntemi BD GeneOhm™ VanR örnek hazırlama işleminden önce yapılmalıdır.

1. Toplanan sürüntüyü her plakanın birinci çeyreğine yayarak bir primer izolasyon plakasını VRE için inoküle edin.

   6 µg/mL vankomisin içeren bir Safra Eskülin Azit plakası (Bile Esculin Azide agar with Vancomycin - BEAV) önerilir.

2. Eküvyonu kabına geri koyun veya bir örnek tampon tüpünde (mavi kapak) kırıp "Örnek Hazırlama" kısmındaki talimata göre devam edin.

3. Steril bir inokülasyon özesiyle, inokulumu plakaların kalan çeyreklerine yayın.
4. Plakayı 35°C'de 24 – 72 saat inkübe edin.
5. Standart yöntemlere göre enterokok kolonilerini tanımlayın ve doğrulayın ve vankomisin direnci testi yapın.

Zenginleştirici Broth

Bu kültür yöntemi 50 µL hücre süspansiyonunun lizis tüpüne aktarılmasından sonra örnek tamponu tüpünde kalan hücre suspansiyonuyla yapılabilir. Hücre süspansiyonu kültür yapılmasından önce kapalı örnek tamponu tüpünde 2 – 8°C'de 24 saate kadar saklanabilir; ancak klinik örnekler az miktarda VRE içerdiğinde organizmanın elde edilmesi başarılı olmayabilir.

1. 5 mL zenginleştirici broth içine 300 µL hücre süspansiyonu aktarın.

   Safra Eskülin Azit broth önerilir.
2. 2 – 5 saniye vorteksleyin.
3. 35°C'de 24-48 saat inkübe edin.
4. Uygun katı ortamda 24 – 72 saat 35°C'de **pasaj** yapın.

   BEAV plakası önerilir.
5. Standart yöntemlere göre enterokok kolonilerini tanımlayın ve doğrulayın ve vankomisin direnci testi yapın.

Sonuçların Yorumlanması

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

Örnek Tipi	Aletin Bildirdiği Test Sonucu[1]	Aletin Bildirdiği IC Sonucu[1]	Sonuçların Kullanıcı Tarafından Yorumlanması
Klinik Örnek	NEG (NEG)	PASS (GEÇTİ)	*vanA* veya *vanB* saptanmadı.
	POS (POZ)	NA (Uygulanamaz)	*vanA* direnç geninden DNA saptandı (*vanB* saptanmadı); muhtemelen vankomisine dirençli enterokok (VRE).
	Presumptive POS (Varsayılan POZ)	NA (Uygulanamaz)	*vanB* direnç geninden DNA saptandı[2] (*vanA* saptanmadı); varsayılan vankomisine dirençli enterokok (VRE), *vanB* direnç geni başka bir organizmadan olabilir.
	Positive (Pozitif)	NA (Uygulanamaz)	*vanA* ve *vanB* direnç genlerinden DNA saptandı; muhtemelen vankomisine dirençli enterokok (VRE).[3]
	Unresolved (Çözümlenmemiş)	FAIL (BAŞARISIZ)	Çözümlenmemiş; engelleyici örnek veya ayıraç başarısızlığı.
	ND (Belirlenmedi)	ND (Belirlenmedi)	I-CORE® Modülü başarısızlığı nedeniyle saptanmadı (Uyarı veya Hata Kodu[1] ile).
Pozitif Kontrol	Valid (Geçerli)	NA (Uygulanamaz)	Geçerli Pozitif Kontrol; geçerli çalışma Negatif Kontrol de geçerliyken.
	Invalid (Geçersiz)	NA (Uygulanamaz)	Geçersiz Pozitif Kontrol; geçersiz çalışma.[4] Test sonuçları geçersizdir ve bildirilmemelidir.
Negatif Kontrol	Valid (Geçerli)	PASS (GEÇTİ)	Geçerli Negatif Kontrol; geçerli çalışma Pozitif Kontrol de geçerliyken.
	Invalid (Geçersiz)	FAIL (BAŞARISIZ)	Geçersiz Negatif Kontrol; geçersiz çalışma.[4] Test sonuçları geçersizdir ve bildirilmemelidir.

IC - Dahili Kontrol

NOTLAR: [1] Uyarı ve hata kodlarının yorumlanması için SmartCycler® Dx Yazılımı Kullanım Kılavuzuna bakınız.

[2] *vanB* için pozitif ama *vanA* için negatif olan örneklerden vankomisine dirençli enterokokların varlığını doğrulamak için kültür yapılmalıdır.

[3] *vanB* geninin epidemiyolojik amaçlarla doğrulanması gerekiyorsa önce kültür yapın ve sonra *vanB* doğrulama testlerini yapın.

[4] Geçersiz bir test çalışması veya alet hata kodları veya uyarıları ekran üzerinde ve raporlarda işaretlenir. *vanA* ve *vanB* sonuçlarını bildirmeden önce test çalışmasının geçerli olduğundan daima emin olun.

Test edilirse SPC sonucu yorumlanması kullanıcı tarafından yapılmalıdır.

Geçersiz Test Çalışması

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

Çözümlenmemiş Örnek

Testi ilgili örneğin donmuş lizat(lar)ı ile tekrarlayın. Dondurma-çözme döngüsünün PCR engelleyici maddeleri azalttığı gösterilmiştir.

I-CORE® Modülü Başarısızlığı Nedeniyle Örnek Belirlenmedi

Testi ilgili örneğin donmuş lizat(lar)ı ile tekrarlayın. Uyarı veya hata kodu mesajlarının yorumlanması için SmartCycler® Dx Yazılımı Kullanım Kılavuzuna bakınız.

İşlemin Sınırlamaları

- **Bu ürünün SmartCycler® dışında bir otomatik gerçek zamanlı PCR aletiyle kullanılması veya "Gereken ama Sağlanmayan Materyaller" kısmında listesi verilen örnek toplama veya nakil sistemlerinin kullanılması performans özellikleri belirlenmemiş olduğundan önerilmez.**
- **Bu ürünün performans özellikleri diğer klinik örnek tipleriyle belirlenmemiştir.**
- Negatif test sonuçlarının nedeni uygunsuz örnek toplama, muamele veya saklama, engelleyici varlığı, teknik hatalar, örnek karışması veya örnekteki organizma sayısının testin analitik duyarlılığının altında olması olabilir. Bu prospektüste ve SmartCycler® Dx Yazılımı Kullanım Kılavuzundaki talimata dikkatle uyulması hatalı sonuçların önlenmesi için gereklidir. Bu testin kullanımı işlem ve SmartCycler® aleti kullanımı konusunda eğitim almış personelle sınırlı olmalıdır.
- BD GeneOhm™ VanR Test sonuçları bazen Çözümlenemeyebilir, Belirlenmeyebilir (I-Core® hatası nedeniyle) veya Geçersiz (geçersiz kontrol nedeniyle) olabilir ve tekrar test edilmesi gerekebilir.
- Pozitif bir test sonucu mutlaka canlı organizmaların bulunduğu anlamına gelmez; eş zamanlı antibiyotik tedavisinden de etkilenebilir. Ancak pozitif bir sonuç *vanA* ve *vanB* genlerinin saptanması temelinde VRE varlığını düşündürür. Test enterokokları saptamaz. Test enterokok olmayan mikroorganizmaların taşıdığı *vanA* ve *vanB* genlerini saptayabilir.
- Primer veya prob bağlayıcı bölgelerdeki mutasyonlar veya polimorfizmler yeni veya bilinmeyen VRE varyantlarının saptanmasını etkileyebilir ve test ile yalancı negatif bir sonuç verebilir.
- Ayıraç hazırlamaya gerek olmamasına ve ana teknik işlemin pipetleme olmasına rağmen bu testin doğru yapılması için iyi laboratuar tekniği şarttır. Testin yüksek analitik hassasiyeti nedeniyle özellikle çok sayıda alikotun tüpten alındığı durumlarda tüm reaktiflerin saflığını korumak için büyük dikkat gösterilmelidir.
- Tarama testi belirli bir zamanda kolonizasyon durumunu gösterir ve sonuçlar hastanın aldığı tedavi, hastanın durumu ve yüksek riskli ortamlara maruz kalma (örn. VRE taşıyıcısıyla temas, uzun süreli hastanede yatma) gibi durumlarla değişebilir. Kolonizasyon durumunun izlenmesi hastane politikalarına göre yapılmalıdır.
- *vanA* yokluğunda *vanB* için pozitif BD GeneOhm™ VanR sonuçları VRE dışındaki organizmalara bağlı olabilir. Bu organizmalarda kültür ile doğrulama yapılması önerilir.
- Yayınlarda tanımlandığı şekilde *vanB* genini içeren bazı anaerobik bakteriler bulunabilir[10,11,12] ve bu test ile saptanabilir ancak bu tür bulguların klinik önemi bilinmemektedir. *vanB* geni için pozitif anaerobik bakterilerin vankomisine direnç belirleyicileri için bir rezervuar oluşturduğu iddia edilmiştir[2] ama bu hipotez henüz ispatlanmamıştır.
- Bazı hastalarda vanA vankomisine direnç genini içeren vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus* suşları saptanmıştır[13] ve bu test ile pozitif bulunabilirler.
- *vanA* hedefinin düşük sayıda kopyaları *vanB* hedefinin çok büyük sayıda kopyaları bulunduğunda saptanamayabilir (≥ 10^5 DNA kopyası, PCR başına).

Enterferans Yapan Maddeler

Olası enterferans yapan maddeler arasında verilenlerle sınırlı olmamak üzere şunlar vardır: kan, gaita, mukus, lubrikanlar ve hemoroid rahatsızlığını azaltmak için kullanılan maddeler.

Performans Özellikleri

Klinik Performans

BD GeneOhm™ VanR Testinin performans özellikleri çok merkezli bir prospektif araştırma çalışmasında belirlenmiştir. Çalışmaya üç tıp merkezi katıldı. Çalışmaya kaydolmak için örneklerin kültürlerin kurumsal politikalara göre endike olduğu ve/veya istendiği bireylerden olması gerekiyordu.

Referans yöntemi, 6 µg/mL vankomisinli bir Safra Eskülin Azit agar plakasında (BEAV) başlangıç analizinden oluştu. Vankomisin direnci için doğrulanmış enterokok kolonileri test edilmiştir. VRE için negatif örnekler 6 µg/mL vankomisin içeren Safra Eskülin Azit broth (BEAV) içinde bir zenginleştirme basamağından oluşan ek bir analizden geçti. VanA ve VanB fenotipik tanımlaması vankomisin ve teikoplanin minimum inhibe edici konsantrasyonu (minimum inhibitory concentration - MIC) testi yapılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bir VanA ve/veya VanB VRE pozitif örnek kültür yöntemleriyle ve MIC sonuçları ile VanA ve/veya VanB için pozitif bir örnek olarak tanımlandı. Bir VanA ve/veya VanB VRE negatif örnek başlangıçtaki ve zenginleştirilmiş kültür yöntemleriyle VanA ve VanB için negatif bir örnek olarak tanımlandı.

BEAV üzerinde selektif üreme ile tarama yöntemi için plakalar doğrudan nazal sürüntü örnekleriyle inoküle edildi ve sonrasında 24 – 48 saat boyunca 35°C'de inkübasyon yapıldı. *Enterococcus* olduğu düşünülen koloniler %5 koyun kanlı agar plakalarına **pasaj**yapıldı ve 35°C'de 18 – 24 saat inkübe edildi. *Enterococcus* genusundan olduğu varsayılan kolonilere pirolidonil arimalidaz (pyrrolidonyl arymalidase - PYR) testi yapıldı. PYR testi pozitif ise enterokok türü tanımlaması uygun ticari testler kullanılarak yapıldı. Doğrulanmış enterokoklar için vankomisin ve teikoplanin direnci bir MIC yöntemi kullanılarak belirlendi. BEAV plaka tarama yöntemiyle VRE için duyarlı veya orta bir sonucun alındığı vakalarda BEAV broth (vankomisin 6 µg/mL) içinde bir zenginleştirme basamağı ile VRE taraması da yapıldı. Bu amaçla BEAV broth'lara BEAV plakaları üzerine doğrudan plakalama sonrasında inokülasyon yapıldı ve 35°C'de 24 – 48 saat boyunca inkübe edildi. Siyah üreme gösteren BEAV broth'larından BEAV plakalarına (vankomisin 6 µg/mL) **pasaj** yapıldı ve 35°C'de 24 – 48 saat inkübe edildi. *Enterococcus* olduğu düşünülen kolonilerden %5 koyun kanlı agar plakalarına pasaj yapıldı ve 35°C'de 18 – 24 saat inkübe edildi. Varsayılan kolonilerin doğrulanması ve vankomisin/teikoplanin direnci belirlenmesi yukarıda tanımlandığı şekilde yapıldı. Doğrulanmış vankomisin direnci olan enterokoklar pozitif kabul edildi.

Tablo 1 BD GeneOhm™ VanR Testinin **uyumlu** ve **uyumsuz** son sonuçlarını (823) Referans yöntemine göre göstermektedir. Seksen dokuz (89) örnek kültür negatif ama sadece PCR ile *vanB* için pozitifti ve *vanB* genini taşıyan enterokok olmayan mikroorganizmaları temsil edebilirler.

Toplam olarak 836 perianal veya rektal örnek toplandı ve yukarıda tanımlanan Referans yöntemi ve BD GeneOhm™ VanR Testi ile vankomisine dirençli enterokokların varlığı açısından tarandı (Tablo 2). Referans yöntemiyle karşılaştırıldığında BD GeneOhm™ VanR testi pozitif örneklerin %92,3'ünü ve negatif

örneklerin %83,5'ini tanımladı.

Referans yöntemiyle karşılaştırıldığında BD GeneOhm™ VanR testi perianal ve rektal pozitif örneklerin sırasıyla %94,5 ve %90,0'ını ve perianal ve rektal negatif örneklerin sırasıyla %88,0 ve %76,1'ini tanımladı (Tablo 3).

Elli dört (54) örnek %6,5 oranına karşılık gelecek şekilde başlangıçta Çözümlenmemiş sonuç (yani dahili kontrol başarısızlığı) verdi. Tekrar test edildiğinde örneklerin 41'i bildirilebilir bir sonuç sağlarken sadece 13 örnek Çözümlenmemiş olarak kaldı ve böylece son Çözümlenmemiş oranı %1,6 oldu (Tablo 4).

Toplam 87 çalışma içinden üç (3) çalışma Geçersiz bir sonuç verdi (yani pozitif ve/veya negatif çalışma kontrollerinin başarısızlığı) ve böylece genel oran %3,4 oldu (Tablo 5).

Tablo 1. BD GeneOhm™ VanR Testiyle Elde Edilen Sonuçların Referans Yöntemiyle Karşılaştırılması

		Kültür Sonuçları			**Total**
		VanA	**VanB**	**Negatif**	
BD GeneOhm™ VanR Sonuçları	***vanA***	96	0	18	114
	vanA* ve *vanB	23	2	5	30
	vanB	6	5	89	100
	Negatif	10	1	568	579
	Toplam	135	8	680	823

Tablo 2. BD GeneOhm™ VanR Testi ile **Çalışma Yerine Spesifik ve Genel** Klinik Performansın Referans Yöntemiyle Elde Edilenle Karşılaştırılması.

Çalışma Yeri	**VRE Prevalansı**	**BD GeneOhm™ VanR Hassasiyeti %95 GA ile[1]**	**BD GeneOhm™ VanR Özgüllüğü %95 GA ile[1]**
Çalışma yeri 1	%17,1 (55/322)	%98,2 (54/55) (%90,3 – %100,0)	%83,8 (218/260) (%78,8 – %88,1)
Çalışma yeri 2	%10,9 (26/239)	%88,5 (23/26) (%69,8 – %97,6)	%90,1 (192/213) (%85,3 – %93,8)
Çalışma yeri 3	%23,6 (65/275)	%88,7 (55/62) (%78,1 – %95,3)	%76,3 (158/207) (%69,9 – %81,9)
Genel çalışma	%17,5 (146/836)	%92,3 (132/143) (%86,7 – %96,1)	%83,5 (568/680) (%80,5 – %86,2)

Çalışma yeri 1 sadece perianal sürüntü aldı, Çalışma yeri 3 sadece rektal sürüntü aldı ve Çalışma yeri 2 perianal ve rektal sürüntü kombinasyonu aldı

[1] Binomiyel %95 kesin güven aralıkları.

Tablo 3. BD GeneOhm™ VanR Testi ile Örnek Tipine göre ve Genel Klinik Performansın Referans Yöntemiyle Elde Edilenle Karşılaştırılması

Örnek Tip	**BD GeneOhm™ VanR Hassasiyeti %95 GA ile**	**BD GeneOhm™ VanR Özgüllüğü %95 GA ile**
Perianal	%94,5 (69/73) (%86,6 – %98,5)	%88,0 (374/425) (%84,5 – %90,9)
Rektal	%90,0 (63/70) (%80,5 – %95,9)	%76,1 (194/255) (%70,4 – %81,2)
Genel çalışma	%92,3 (132/143) (%86,7 – %96,1)	%83,5 (568/680) (%80,5 – %86,2)

Tablo 4. BD GeneOhm™ VanR Testinde Başlangıç ve Tekrarlanan Çözümlenmemiş Oranları

Çalışma Yerleri	**%95 GA ile başlangıçta çözümlenemeyen oran**	**%95 GA ile tekrar sonrasında çözümlenmemiş oranı**
Çalışma yeri 1	%14,6 (47/322) (%10,9 – %18,9)	%2,2 (7/322) (%0,9 – %4,4)
Çalışma yeri 2	%0,0 (0/239) (%0,0 – %1,5)	%0,0 (0/239) (%0,0 – %1,5)
Çalışma yeri 3	%2,5 (7/275) (%1,0 – %5,2)	%2,2 (6/275) (%0,8 – %4,7)
Genel çalışma	%6,5 (54/836) (%4,9 – %8,3)	%1,6 (13/836) (%0,8 – %2,6)

Tablo 5. BD GeneOhm™ VanR Testinde Geçersiz Oranlar

Çalışma yeri	%95 GA ile geçersiz çalışma oranları
Çalışma yeri 1	%7,1 (2/28) (%0,9 – %23,5)
Çalışma yeri 2	%4,5 (1/22) (%0,1 – %22,8)
Çalışma yeri 3	%0,0 (0/37) (%0,0 – %9,5)
Genel çalışma	%3,4 (3/87) (%0,7 – %9,7)

Analitik Özgüllük

Yakından ilişkili organizmalar, normal ve patojenik perianal ve/veya rektal flora, insan DNA ve eksojen DNA, 28 vankomisine duyarlı enterokok veya *vanA*/*vanB* dışında vankomisine dirençli enterokok suşu (17 referans suşu ve 11 klinik izolat) olmak üzere 129 suştan genomik DNA test edildi. Örneklerin hiçbiri pozitif test edilmedi ve bu nedenle analitik özgüllük %100'dü.

Analitik Hassasiyet

Analitik hassasiyet (saptama limiti veya LOD) *vanA* vankomisine dirençli enterokoklardan (*E. faecium*) 1 ATCC suşu (700221) ve *vanB* vankomisine dirençli enterokoklardan (*E. faecalis*) 1 ATCC suşu (51299) ile saptanmıştır. Kantifiye edilmiş kültür ve purifiye genomik DNA'sı BD GeneOhm™ VanR Testi örnek tamponunda seyreltilip beş (5) replikatta test edildi. LOD, beş replikat arasında beşinin pozitif bulunduğu, reaksiyon başına DNA kopya numarası ve reaksiyon başına CFU açısından en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır.

BD GeneOhm™ VanR Testi LOD değeri hem *vanA* hem *vanB* vankomisine dirençli enterokoklar için reaksiyon başına 10 genom kopyasıdır (veya reaksiyon başına 2 CFU). Örneğin işleme konması nedeniyle seyreltme faktörü dikkate alındığında LOD yaklaşık olarak 1600 CFU/sürüntü anlamına gelir.

Referanslar

[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 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.

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

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

Bu ürün, Molecular Probes, Inc. ve Geneohm Sciences, Inc. arasındaki bir anlaşmaya tabidir ve bu ürünün üretimi, kullanımı, satışı veya ithalatı Molecular Probes, Inc. şirketinin (bütünüyle Invitrogen Corporation şirketinin bir yan kuruluşu olan) sahibi olduğu bir veya birçok A.B.D. patentine, bekleyen uygulamaya ve ilgili yabancı eşdeğerlerine tabi olabilir. Bu ürünün satın alınması satın alan kişiye, ürünün ve ürünün bileşenlerinin satın alınan miktarını, insan diagnostiğinde mikroorganizmaları tanımlamak amacıyla nükleik asit saptamasına yönelik testlerde kullanmak için devredilemez bir hak verir. Satın alan kişi, bu ürünü veya bileşenlerini üretim amacıyla veya terapötik veya profilaktik amaçla kullanamaz veya bu ürünü veya bileşenlerini satamaz veya üçüncü bir tarafa başka şekillerde devredemez veya insan diagnostiği dışındaki amaçlarla kullanamaz. Bu ürün için insan diagnostiği dışındaki kullanım amaçları için bir lisans satın alınması hakkında bilgi için, Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402, A.B.D. adresinden veya aşağıdaki numaralardan bağlantı kurun: Tel: 1. 541.465.8300, Faks: 1.-541.335.0504.

Semboller İndeksi

SEMBOL	ANLAMI	SEMBOL	ANLAMI
	Üretici	LOT	**Parti kodu**
REF	**Katalog numarası**		**Sıcaklık sınırlaması**
IVD	***In Vitro* Diagnostik Kullanım**		**Işık ve nemden koruyun**
EC REP	**Yetkili Avrupa Temsilcisi**		**Kullandıktan sonra poşetleri tekrar mühürleyin**
	Son kullanma tarihi		**Kullanım talimatına bakınız**
Σ	**İçindekiler «n» test için yeterlidir**	Xi R36/38	**Gözler ve cilt için tahriş edici**
1/3	**Nadrażuje oči i kožu**		

Helping all people live healthy lives

Müşteri Servisi: 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.