



BD GeneOhm™ MRSA Assay
Test BD GeneOhm™ MRSA
BD GeneOhm™ MRSA Test
Prueba BD GeneOhm™ MRSA
Saggio BD GeneOhm™ MRSA



REF 441242

IVD

200 Tests / Pruebas / Test

REF 441244

IVD

48 Tests / Pruebas / Test

Table of Contents / Table des Matières / Inhaltstabelle / Índice / Indice

English	5-14
Intended use	5
Summary and explanation of the test	5
Principle of the procedure	5
Reagents	5
Precautions	6
Materials provided	6
Storage, handling and stability	7
Collected specimen	7
Reagents	7
Materials required but not provided	7
Instructions for use	8
Specimen collection	8
Specimen preparation	8
BD GeneOhm™ MRSA assay procedure	8
Quality control	9
Positive and negative controls	9
Specimen processing controls	9
Culturing of clinical specimens	10
Streak-plate method	10
Enrichment broth	10
Interpretation of results	10
Invalid Assay Run	10
Unresolved specimen	11
Specimen not determined due to I-CORE® module failure	11
Limitations of the procedure	11
Interfering substances	11
Expected values	11
Performance characteristics	12
Clinical performance	12
Analytical specificity	13
Analytical sensitivity	13
Reproducibility	14
 Français	 15-24
Indication	15
Résumé et explication du test	15
Principe du test	15
Réactifs	15
Précautions	16
Matériel fourni	17
Entreposage, manutention et stabilité	17
Échantillons prélevés	17
Réactifs	17
Matériel nécessaire mais non fourni	18
Mode d'emploi	18
Prélèvement des échantillons	18
Préparation des échantillons	18
Procédure du test BD GeneOhm™ MRSA	19
Contrôle qualité	20
Contrôles positif et négatif	20
Contrôle du processus de préparation des échantillons	20
Culture des échantillons cliniques	20
Méthode d'étalement sur gélose	20
Bouillon d'enrichissement	21
Interprétation des résultats	21

Série invalidée	21
Échantillons non résolus	21
Échantillons indéterminés en raison d'une défaillance du module I-CORE ^{MD}	21
Limites du test	21
Substances interférentes	22
Valeurs attendues	22
Caractéristiques de rendement	22
Sensibilité et spécificité cliniques	22
Spécificité analytique	24
Sensibilité analytique	24
Reproductibilité	24

Deutsch 25-35

Vorgesehene Anwendung	25
Zusammenfassung und Erklärung des Tests	25
Prinzip der Durchführung	25
Reagenzien	25
Vorsichtsmassnahmen	26
Mitgelieferte Materialien	27
Lagerung, Handhabung und Stabilität	27
Gesammelte Proben	27
Reagenzien	27
Materialien, welche benötigt, aber nicht mitgeliefert werden	28
Gebrauchsanweisungen	28
Probensammlung	28
Probenvorbereitung	28
BD GeneOhm™ MRSA-Testvorgang	29
Qualitätskontrolle	30
Positive und negative Kontrollen	30
Proben-Verarbeitungskontrollen	30
Kultivierung von klinischen Proben	30
Ausstrichmethode	30
Kultivierung im Anreicherungsmedium	31
Interpretierung der Ergebnisse	31
Ungültiger Testlauf	31
Nicht verwertbare Probe	31
Probe wegen Fehler am I-CORE® -Modul nicht verwertbar	31
Einschränkungen des Vorgangs	31
Störsubstanzen	32
Erwartete Werte	32
Leistungscharakteristika	32
Klinische Leistung	32
Analytische Spezifität	34
Analytische Empfindlichkeit	34
Reproduzierbarkeit	34

Español 36-45

Indicaciones de uso	36
Resumen y explicación de la prueba	36
Principio de procedimiento	36
Reactivos	36
Precauciones	37
Material proporcionado	37
Conservación, manejo y estabilidad	38
Muestras obtenidas	38
Reactivos	38
Material necesario pero no suministrado	38
Modo de empleo	39
Obtención de muestras	39

Preparación de muestras	39
Procedimiento de la prueba BD GeneOhm™ MRSA	40
Control de calidad	41
Controles positivo y negativo	41
Controles de procesamiento de las muestras	41
Cultivo de muestras clínicas	41
Método de estría en placa	41
Caldo de enriquecimiento	41
Interpretación de resultados	42
Serie analítica no válida	42
Muestras sin resolver	42
Muestra sin determinar debido a fallo del módulo I-CORE®	42
Limitaciones del procedimiento	42
Sustancias interferentes	43
Valores previstos	43
Eficacia diagnóstica	43
Eficacia clínica	43
Especificidad analítica	45
Sensibilidad analítica	45
Reproducibilidad	45
Italiano	46-55
Uso previsto	46
Riassunto e spiegazione del test	46
Principio della procedura	46
Reagenti	46
Precauzioni	47
Materiali forniti	47
Conservazione, trattamento e stabilità	48
Campioni prelevati	48
Reagenti	48
Materiali necessari, ma non forniti	48
Istruzioni per l'uso	49
Prelievo di campioni	49
Preparazione del campione	49
Procedura di saggio BD GeneOhm™ MRSA	50
Controllo della qualità	51
Controlli positivi e negativi	51
Controlli di trattamento dei campioni	51
Coltivazione di campioni clinici	51
Metodo di coltura a striscia	51
Brodo di arricchimento	51
Interpretazione dei risultati	52
Analisi del saggio non valida	52
Campioni non risolti	52
Campione non determinato a causa di problema del modulo I-CORE®	52
Limiti della procedura	52
Sostanze interferenti	53
Valori attesi	53
Caratteristiche prestazionali	53
Prestazioni cliniche	53
Specificità analitica	55
Sensibilità analitica	55
Riproducibilità	55
References / Références / Referenzen / Referencias / Riferimenti	56
Index of symbols / Table des symboles / Symbol-Verzeichnis / Índice de símbolos / Indice dei simboli	57

English

Intended use

BD GeneOhm™ MRSA assay is a qualitative *in vitro* diagnostic test for the direct detection of nasal colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to aid in the prevention and control of MRSA infections in healthcare settings. The test performed on the SmartCycler® instrument with a nasal swab specimen from patients at risk for colonization, utilizes polymerase chain reaction (PCR) for the amplification of MRSA DNA and fluorogenic target-specific hybridization probes for the detection of the amplified DNA. BD GeneOhm™ MRSA assay is not intended to diagnose MRSA infections nor to guide or monitor treatment for MRSA infections. Concomitant cultures are necessary only to recover organisms for epidemiological typing or for further susceptibility testing.

Summary and explanation of the test

A nasal specimen is collected and transported to the laboratory using the recommended swab with Liquid Stuart Medium (refer to Materials required but not provided). For testing, the swab is placed in sample buffer. The specimen is concentrated and lysed. An aliquot of the lysate is added to PCR reagents which contain the MRSA-specific primers used to amplify the genetic target, if present. The assay also includes an internal control (IC) to detect PCR inhibitory specimens and to confirm the integrity of assay reagents. Amplified targets are detected with hybridization probes labeled with quenched fluorophores (molecular beacons). The amplification, detection and interpretation of the signals are done automatically by the Cepheid SmartCycler® software. The whole procedure takes about 60 to 75 minutes, depending on the number of specimens processed. For the recovery of MRSA for epidemiological typing or for further antibiotic susceptibility testing, appropriate culture media can be inoculated during specimen preparation or up to 24 hours after its preparation.

S. aureus is a major cause of nosocomial infections. Most transmissions occur through the contaminated hands of a person carrying *S. aureus*. While *S. aureus* causes infections with clinical manifestations ranging from pustules to sepsis and death¹, it is commonly found in the nose or on the skin of healthy individuals (asymptomatic carriers). Treatment of *S. aureus* infections has become a real challenge with the emergence of strains resistant to previously effective antimicrobial agents. Methicillin-resistant strains of *S. aureus* are frequently encountered in health-care settings, and represent over 50% of isolates from hospital acquired *S. aureus* in some North American hospitals². Risk factors for infection with MRSA in health-care settings include prolonged hospital stay, proximity to patients infected with MRSA, exposure to multiple and prolonged broad-spectrum antibiotic treatments, and MRSA nasal carriage. Early screening of patients for MRSA nasal carriage to identify those patients that require isolation can be part of an effective infection control program for MRSA. Current techniques used to detect MRSA all require a culture step and the isolation of pure colonies followed by either oxacillin susceptibility testing, detection of the *mecA* gene or detection of the penicillin binding protein (PBP 2a) encoded by the *mecA* gene. This increases the time of resolution of MRSA carrier status to a minimum of 16 hours; with a median time of more than 48 hours. With the rapidity at which *S. aureus* infections can spread, especially in health-care settings where carriers are common, the capability of providing results of MRSA nasal carriage on the day of admission represents a definite advantage for infection control programs.

Principle of the procedure

Following lysis, amplification of the target [sequence near the insertion site of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*)] will occur. Amplification of the IC, a DNA fragment of 335-bp including a 277-bp sequence not found in MRSA, will also take place unless there are PCR inhibitory substances.

The amplified DNA targets are detected with molecular beacons, a hairpin-forming single-stranded oligonucleotides labelled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the absence of target, the fluorescence is quenched. In the presence of target, the hairpin structure opens upon beacon/target hybridization, resulting in emission of fluorescence. For the detection of MRSA amplicons, the molecular beacon contains the fluorophore FAM at the 5' end and the non-fluorescent quencher moiety DABCYL at the opposite end of the oligonucleotide. For the detection of the IC amplicons, the molecular beacon contains the fluorophore TET at the 5' end and the quencher DABCYL at the 3' end. Each beacon-target hybrid fluoresces at a wavelength characteristic of the fluorophore used in the particular molecular beacon. The amount of fluorescence at any given cycle, or following cycling, depends on the amount of specific amplicons present at that time. The SmartCycler® simultaneously monitors the fluorescence emitted by each beacon, interprets all data and at the end of the cycling program provides a final result (see Interpretation of Results).

Reagents

BD GeneOhm™ MRSA Assay	48 Tests	200 Tests
Sample Buffer	60 X 1mL	240 X 1mL
Tris-EDTA buffer		
Lysis tube	50 tubes	200 tubes
Glass beads		
Master Mix (8 reactions each)	8 tubes	34 tubes
< 0.0005 % DNA polymerase complex		
< 0.001% Internal Control - non-infectious DNA containing MRSA-primer binding sequences and a unique sequence for probe hybridization		
< 0.002 % primers		
< 0.002 % molecular probes		
< 0.05 % dATP, dCTP, dGTP, dTTP		
Bovine serum albumin		
Carbohydrate		
MgCl ₂		
< 0.001 % non-infectious <i>Staphylococcus epidermidis</i> genomic DNA (ATCC 14990)		

Control DNA	8 tubes	34 tubes
Tris-EDTA buffer		
Carbohydrate		
< 0.001 % non-infectious genomic MRSA DNA (ATCC 43300)		
Diluent	8 X 700 µL	34 X 700 µL
Tris-HCl buffer		
MgCl ₂		
(NH ₄) ₂ SO ₄		
KCl		

Precautions

This test is for *in vitro* diagnostic use only.

- Do not use the kit if the outer carton safety seal is broken.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or torn upon arrival.
- Close protective pouches of Master Mix and Control DNA quickly with the zip seal after each use.
- Do not use reagents if desiccant is not present inside Master Mix and Control DNA pouches.
- Do not remove desiccant from Master Mix and Control DNA pouches.
- Reagents are not interchangeable between lots.
- Never pool reagents from different tubes even if they are from the same lot.
- Do not use the reagents after their expiration date.
- Do not interchange caps among reagents as contamination may occur and compromise test results.
- Avoid microbial and deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents when removing aliquots from tubes. The use of sterile DNase-free disposable filter-blocked or positive displacement pipettor tips is recommended.
- To avoid contamination of the environment with MRSA amplicons, do not open the reaction tubes post-amplification.
- Use a new tip for each specimen or reagent.
- Performing the assay outside of the time ranges recommended can produce invalid results. Assays not done within specified time ranges should be repeated.
- Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state, provincial and/or federal regulations or accrediting organizations.
- In cases where open-tube PCR tests are also conducted by the laboratory, separated and segregated working areas should be used for specimen preparation and amplification/detection activities. Supplies and equipment should be dedicated to each area and should not be moved from one area to another. Gloves must always be worn and must be changed before going from one area to another. Gloves must be changed before manipulating lyophilized reagents.
- Do not freeze the collection device. Store at room temperature. Unopened, the collection device is stable until the expiration date indicated.
- Always handle specimens as if they are infectious and in accordance with safe laboratory procedures such as those described in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³ and in the CLSI Document M29⁴.
- Wear protective clothing and disposable gloves while handling kit reagents. Wash hands thoroughly after performing the test.
- Do not pipet by mouth.
- Do not smoke, drink, or eat in areas where specimens or kit reagents are being handled.
- Dispose of unused reagents and waste in accordance with country, federal, provincial, state and local regulations.

Materials provided

- Sample Buffer
- Lysis tube
- Master Mix
- Control DNA
- Diluent
- SmartCycler® reaction tubes, 25 µL
- Specimen identification labels

Storage, handling and stability

Collected specimens

Specimens should be kept between 2°C and 30°C during transport. Protect against freezing or exposure to excessive heat.

Specimens with evidence of potentially interfering substances (e.g. blood, excessive nasal secretions, etc.) should be tested within 24-36 hours. Otherwise, specimens can be stored up to 5 days at 2-8°C before testing. Specimens that can be tested within 36 hours can be kept at room temperature (15-30°C).

Reagents

Note: Storage conditions must follow the specifications written on each pouch. Tubes outside of their protective bag and unused within specified time limit should be discarded.

Kit Component		Master Mix and Control DNA (white and red strip labels)	Lysis tube (yellow cap)	Sample Buffer, and Diluent (blue cap, and black strip label respectively)
Sealed pouch	Temperature	2-25 °C	2-25 °C	2-25 °C
	Stability	Expiration date	Expiration date	Expiration date
Opened pouch	Temperature	2-8 °C ¹	2-25 °C	2-25 °C ²
	Stability	1 month ³	Expiration date	2 months ³

¹ Once the original seal on the pouch is broken, carefully close the pouch with the zip seal after each use and store at appropriate temperature.

² Although these reagents can be stored at room temperature, they should be kept with their accompanying reagents of the same lot at 2-8°C.

³ Provided the bag is properly closed with the zip seal after each use.

Kit Component outside of their protective pouch			Master Mix and Control DNA (white and red strip labels)
Not reconstituted tubes		Temperature	15-25 °C
		Stability	2 hours
Reconstituted tubes ¹	Original container	Temperature	2-8 °C
		Stability	3 hours
	SmartCycler® tube	Temperature	2-8 °C
		Stability	1 hour

¹ Discard unused tubes after expiration of the delay.

Materials required but not provided

- **BBL™ CultureSwab™ Liquid Stuart** (Becton Dickinson catalog no. 220099), **Copan Transystem™ Liquid Stuart** (Copan Italia International catalog no. 141C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Liquid Stuart** (Copan Diagnostics Inc. catalog no. 141C.US), **HealthLink TransPorter™ single Liquid Stuart** (HealthLink catalog no. 4432)
- **BBL™ CHROMagar™ Staph aureus** catalog no. 214982, **Mannitol Salt Agar (MSA)** catalog no. 221773 or 221271 or equivalent media (optional),
- **Vortex** Genie 2 (Fisher) with 1.5 mL microtube holder or equivalent; for processing multiple samples, adapter with multiple holding sites can be used
- **Micropipettors** (accurate range between 1-10 µL, 10-100 µL and 100-1000 µL)
- **Sterile DNase-free** filter-blocked or positive displacement **micropipettor tips**
- **Sterile fine tip transfer pipets** (e.g. VWR catalog nos. 14670-329, 14670-332) or extended-length sterile DNase-free filter-blocked tips of 1250 µL (e.g. MATRIX catalog no. 8255)
- **Scissors**
- **Gauzes**
- Disposable **gloves**, powderless
- **Microcentrifuge** for high (must reach 14 000 x g) and low speed centrifugation
- **Dry heating block** for 1.5 mL tubes or water bath
- Ice or **cooling block** for 1.5 mL tubes
- Cap removal tool (e.g. MATRIX catalog no. 4469) (optional)
- Stopwatch or **timer**
- **SmartCycler® starter system** with **Dx Software** (processing block, user manual, accessory kit, and desktop computer) (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)

Instructions for use

Specimen collection

In order to obtain an adequate specimen, the procedure for specimen collection must be followed closely.

Using the recommended swab with Liquid Stuart Medium (refer to Materials required but not provided), nasal specimens are collected according to the following procedure:

1. Moisten the swab with two drops (about 50 µL) of sterile physiological serum (saline) or use it dry.
2. Carefully insert the swab into the patient's nostril (**the swab tip must be inserted up to 2.5 cm (1 inch) from the edge of the nares**).
3. Roll the swab 5 times.
4. Insert the same swab into the second nostril and repeat sampling as 2 and 3.
5. Place the swab in its container.
6. Label the container.
7. Ship the swab to the laboratory according to hospital standard operating procedures.
8. Refer to the section entitled Storage, handling and stability – Collected specimens for storage and handling.

Specimen preparation

Note: One Sample Buffer tube (**blue cap**) and one lysis tube (**yellow cap**) are required for **each specimen** to be tested. An additional Sample Buffer tube (**blue cap**) is also required for each group of 20 specimens to be tested. Remove the required number of tubes from their protective pouch, **remove the excess air, and close the pouch quickly with the zip seal.**

For culturing clinical specimens (swab) prior to performing the BD GeneOhm™ MRSA assay, refer to section Culturing of clinical specimens - Streak-plate method for details.

1. **Place the collection device (swab) in a Sample Buffer tube (blue cap).**
Identify the Sample Buffer tube on the cap and/or the tube label.
2. **Break the swab stem and close the tube tightly.**
Hold the swab by the stem near the rim of the tube (use gauze to minimize risks of contamination). Lift the swab a few millimeters from the bottom and bend the stem against the edge of the tube to break it. Alternative method: use clean scissors to cut the stem. Make sure the cap will close tightly.
3. **Vortex at high speed for one minute.**
For processing multiple samples, an adapter with multiple holding sites can be used.
4. **Transfer the entire cell suspension to a lysis tube (yellow cap).**
Use a sterile fine tip transfer pipet or a P-1000 micropipettor with an extended-length tip.
For culturing clinical specimens with the remaining swab, refer to section Culturing of clinical specimens - Enrichment broth for details.
5. **Centrifuge at high speed (between 14 000 x g and 21 000 x g) for 5 minutes at room temperature.**
6. **Remove the supernatant and discard it.**
Use a sterile fine tip transfer pipet; take care not to touch the pellet. Use a new transfer pipet for each specimen.
7. **Add 50 µL of sample buffer to the lysis tube; close tightly.**
Use a new pipettor tip for each specimen. Up to 20 specimens can be prepared with one Sample Buffer tube. For more than 20 specimens, use as much Sample Buffer tubes as required (**keep the unused buffer for later steps of the BD GeneOhm™ MRSA assay procedure**).
8. **Vortex for 5 minutes at high speed.**
For processing multiple samples, an adapter with multiple holding sites can be used.
9. **Centrifuge the lysis tube briefly (quick spin).**
At low speed for 2 to 5 seconds; to bring the content at the bottom of the tube.
10. **Heat at 95 ± 2 °C for two (2) minutes.**
Use a dry heating block for 1.5 mL tubes or a water bath.
11. **Keep the lysis tube on ice or on a cooling block.**
Lysates are stable for up to 4 hours at 2-8 °C. If the lysates have not been used at the end of this time frame, store them at -20 ± 5 °C for later use.

BD GeneOhm™ MRSA assay procedure

Note: One reconstituted Master Mix tube (**white label**) will yield enough reagents to run 8 reactions. Allow one SmartCycler® tube per specimen to be tested and 2 additional SmartCycler® tubes for the positive and the negative control. **One (1) positive and one (1) negative control must be included in each BD GeneOhm™ MRSA assay run.** One control DNA (**red strip label**) is required per assay run. One diluent tube (**black strip label**) is required for the reconstitution of up to 3 Master Mix tubes. Remove the required number of tubes from their protective pouch, **remove the excess air, and close the pouch quickly with the zip seal.**

Prepare only enough SmartCycler® tubes to fill available I-CORE® modules on the SmartCycler® instrument.

1. **Place the required number of Master Mix tube(s) on ice or on a cooling block for 1.5 mL tubes.**
2. **Add 225 µL of diluent (black strip label) to each Master Mix tube.**
Insert the micropipettor tip through the septum of the cap of the Master Mix tube. Do not insert the tip too deeply into the cap. Deliver the diluent. Discard the unused diluent afterward.
3. **Vortex the tube(s) for 5-10 seconds.**
4. **Place the required number of SmartCycler® tubes on the SmartCycler® cooling block.**
Allow one SmartCycler® tube per specimen and two more SmartCycler® tubes for the controls. **Avoid touching the optical detection windows at the bottom edges of the tube and the lower diamond-shaped area.**

The following steps MUST be performed within one hour time frame:

5. **Add 25 µL of reconstituted Master Mix to the SmartCycler® tubes.**
Remove the septum cap before pipetting the reagent. Deliver the liquid into the reservoir (upper part) of the SmartCycler® tubes. Identify the SmartCycler® tubes on the cap. Specimen identification labels can be used (provided with the kit). Unused Master Mix **immediately stored at 4-8 °C for a maximum of 3 hours away from light** can be used for immediate retesting of unresolved results if necessary. Discard the unused Master Mix after this period.
6. **Add 2.8 µL of each lysed specimen to a different SmartCycler® tube previously filled; close the tubes.**
Take care not to aspirate beads when pipetting into the lysis tube. After addition of the specimen, pipette up and down 2-3 times in the reservoir to ensure transfer of the complete volume. Use a new micropipettor tip for each specimen.
7. **Place a control DNA tube (red strip label) on ice or on a cooling block for 1.5 mL tubes.**
8. **Add 225 µL of Sample Buffer (blue cap) to the control DNA tube.**
Use the Sample Buffer tube from step 7 of the Specimen Preparation protocol. Insert the micropipettor tip through the septum of the cap of the control DNA tube. Do not insert the tip too deeply into the cap. Deliver the sample buffer.
9. **Vortex the tube for 5-10 seconds.**
10. **Add 2.8 µL of the reconstituted control DNA to the next to last SmartCycler® tube (Positive Control); close the tube.**
After addition of the DNA, pipette up and down 2-3 times in the reservoir to ensure transfer of the complete volume. Identify as the positive control. Unused control DNA **immediately stored at 4-8 °C for a maximum of 3 hours away from light** can be used for the preparation of a new positive control in case of immediate retesting of unresolved results. Discard the unused control DNA after this period.
11. **Add 2.8 µL of Sample Buffer (blue cap) to the last SmartCycler® tube (Negative Control); close the tube.**
Use the Sample Buffer tube from step 7 of the Specimen Preparation protocol. This will monitor for PCR contamination that might occur during the manipulation of the specimens. Identify as the negative control. Discard the unused sample buffer afterward.
12. **Centrifuge all reaction tubes for 5-10 seconds.**
Use the specially adapted microcentrifuge provided with the SmartCycler® instrument.
13. **Keep the tubes at 2-8 °C on the SmartCycler® cooling block before loading on the instrument.**
The remaining lysates should be frozen at -20 ± 5 °C for later use, if necessary.
14. **Create a run with the BD GeneOhm™ MRSA assay protocol.**
Refer to the SmartCycler® Dx Software Operator Manual if needed. You should enter the identification parameters for the specimens before starting the run.
15. **Insert each reaction tube into an I-CORE® module of the SmartCycler® and close the I-CORE® lid.**
Place the positive and negative controls at their appropriate position (see the section entitled "Quality control"). Press down all the tubes firmly into place.
16. **Start the run.**

Quality control

Positive and negative controls

Quality control procedures are designed to monitor assay performance. The positive control is intended to monitor for substantial reagent failure. The negative control is used to detect reagent or environmental contamination (or carry-over) by either MRSA DNA or MRSA amplicons. Positive and negative controls are assay controls (run controls). An invalid control invalidates the run. Finally, an internal control incorporated into each reaction mixture is intended to monitor PCR inhibition in each specimen and reagent integrity.

One positive control and one negative control must be included in each assay run on the SmartCycler®. The software automatically assigns the position of the controls on the instrument (refer to the SmartCycler® Dx Software Operator Manual).

Specimen processing controls

Control strains may be tested according to guidelines or requirements of local, state and/or federal regulations or accreditation organizations. A reference MRSA strain (e.g. American Type Culture Collection, ATCC 43300) or a well characterized MRSA clinical isolate may be used as a specimen processing control while a culture of methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (e.g. ATCC 29213) or of any other non-*Staphylococcus aureus* (e.g. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990) may be used as an external negative control.

Resuspend isolated colonies from an 18- to 24-h 5% sheep blood agar plate (eg. BBL™ Trypticase Soy Agar (TSA II) with 5% Sheep Blood, BD catalog no. 221239 or 221261) in saline to a turbidity of 0.5 McFarland ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL). Dilute with saline to obtain a suspension of $\sim 10^6$ CFU/mL. Dip the recommended swab with Liquid Stuart Medium (refer to Materials required but not provided) into the bacterial suspension, press out the excess fluid, place the swab in its container (to allow contact with the transport medium), and let stand at room temperature for 5 minutes. Process and test as a clinical specimen (refer to the sections entitled "Specimen preparation" and "BD GeneOhm™ MRSA" assay procedure"), including controls. All specimens and controls should yield valid results (no invalid positive or negative control and no failed internal control).

For general QC guidance, the user may wish to refer to CLSI MM3⁵ and C24⁶.

Culturing of clinical specimens

To perform antimicrobial susceptibility testing or epidemiological typing, clinical specimens can be cultured at two different steps of the BD GeneOhm™ MRSA assay procedure. It can be done from the collection device (swab) before conducting the analysis with BD GeneOhm™ MRSA using the streak-plate method or it can be done with the swab following the sample preparation procedure using an enrichment step.

Streak-plate method

This culture method can be performed prior to the specimen preparation procedure for BD GeneOhm™ MRSA.

1. Remove the collection device (swab) from its container.
2. Inoculate a mannitol salt agar (MSA) plate by streaking onto the first quadrant of the plate.
3. Return the swab in its container or break it in a Sample Buffer tube (blue cap) of BD GeneOhm™ MRSA and continue according to instructions in section "Specimen preparation".
4. With a loop needle, streak the inoculum into the remaining quadrants of the MSA plate.
5. Incubate the MSA plate for 24-48 hours at 35 °C.
6. Identify and confirm *S. aureus* colonies and test for methicillin resistance according to standard methods.

Enrichment broth

This culture method can be performed with swabs left behind in the Sample Buffer tube following the transfer of the cell suspension into the lysis tube. Swabs can be stored at 2-8°C in closed Sample Buffer tube for up to 24 hours before culturing; recovery may not be successful with clinical specimens with low amounts of MRSA.

1. Add 1.0 mL of enrichment broth to Sample Buffer tubes containing the swab.
TSB (tryptic soy broth) supplemented with 6.5% NaCl is suggested.
2. Incubate for 24-48 hours at 35 °C.
3. Subculture on an appropriate solid media for 24-48 hours at 35 °C.
5% sheep blood agar plate is suggested.
4. Identify and confirm *S. aureus* colonies and test for methicillin resistance according to standard methods.

Interpretation of results

The decisional algorithm for BD GeneOhm™ MRSA assay is embedded in the SmartCycler® software. The interpretation of assay results is done according to the following criteria:

Assay result reported	IC result reported	Interpretation of result ¹
NEG	PASS	No MRSA DNA detected, MRSA nasal colonization unlikely
POS	NA	MRSA DNA detected, MRSA nasal colonization
Unresolved	FAIL	Unresolved—inhibitory specimen or reagent failure
ND	ND	Not determined due to I-CORE® Module failure (with Warning or Error Codes ²)

IC - Internal Control; NA – not applicable; ND – not determined

¹BD GeneOhm™ MRSA results may be used to guide isolation and level of precautions in accordance with institutional programs and practices.

² Refer to the SmartCycler® Dx Software Operator Manual for interpretation of warning and error codes.

An invalid positive or negative control invalidates the assay run. In such cases, assay results obtained for that run are invalid and must not be reported. Invalid assay run or instrument error codes or warnings are flagged on-screen and on reports. Before reporting MRSA results, always verify that the assay run is valid.

Refer to the SmartCycler® Dx Software Operator Manual for printing of results.

Invalid Assay Run

Using frozen lysate(s), prepare new reaction tubes for all clinical specimens within that assay run along with new control tubes.

Unresolved specimen

Repeat testing with the corresponding specimen frozen lysate. The effect of the freeze-thaw cycle has been shown to reduce PCR inhibitory substances.

Specimen not determined due to I-CORE® module failure

Repeat testing with the corresponding specimen frozen lysate. For the interpretation of warning or error code messages, refer to the SmartCycler® Dx Software Operator Manual.

Limitations of the procedure

- Performance of this test has been established with the SmartCycler® instrument, with nasal specimens obtained from hospitalized patients or from patients at admission and with specimens collected using the Copan Venturi Transystem® with Liquid Stuart Medium. Therefore, this product can only be used with the SmartCycler®; moreover, the use of specimen collection and transport system other than those listed in the Material required but not provided section is not recommended. Other clinical sources have not been assessed and performance characteristics of this test are unknown on other specimen types or patient populations.
- Negative test results may also occur from improper specimen collection, handling or storage, presence of inhibitor, technical error, sample mix-up or because the number of organisms in the specimen is below the analytical sensitivity of the test. Careful compliance to the instructions given in this insert and in the SmartCycler® Dx Software Operator Manual is necessary to avoid erroneous results. Use of this test should be limited to personnel trained on the procedure and on the use of the SmartCycler®.
- Although there is no need for reagent preparation and the main technical operation is pipetting, good laboratory technique is essential to the proper performance of this assay. Due to the high analytical sensitivity of this test, extreme care should be taken to preserve the purity of all reagents, especially in cases where multiple aliquots are taken from a tube.
- Screening determines the colonization status at a given time and could vary depending on patient treatment (e.g. decolonization regime), patient status (e.g. not actively shedding MRSA) or exposure to high risk environments (e.g. contact with MRSA carrier, prolonged hospitalization). Monitoring colonization status should be done according to hospital policies.
- Results from BD GeneOhm™ MRSA assay should be used as an adjunct to nosocomial infection control efforts to identify patients needing enhanced precautions. The test is not intended to identify patients with staphylococcal infection. Results should not be used to guide or monitor treatment for MRSA infections.
- A BD GeneOhm™ MRSA positive result does not necessarily indicate treatment eradication failure since DNA may persist. A negative result following a previous positive test result may indicate treatment eradication success or may occur due to intermittent shedding.
- BD GeneOhm™ MRSA assay results may sometimes be unresolved or invalidated due to an invalid control, and require retesting that can result in a delay for obtaining the results.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. It is however presumptive for the presence of MRSA as BD GeneOhm™ MRSA detects simultaneously the *SCCmec* cassette (carrying the *mecA* gene) and a *S. aureus* specific sequence located within the *orfX* gene. The BD GeneOhm™ MRSA does not detect the *mecA* gene directly nor the penicillin binding protein (PBP 2a) encoded by this gene.
- BD GeneOhm™ MRSA was shown to detect various types of MRSA that have been associated with hospital acquired and community acquired infections; evaluations did not assess phenotypic or genotypic traits of MRSA isolates to identify strains that may be more virulent in the hospital environment.
- Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown MRSA variants resulting in a false negative result with the BD GeneOhm™ MRSA assay.

Interfering substances

Potentially interfering substances include, but are not limited to the following: blood, excessive nasal secretions/mucus, decongestant and substances occasionally used to relieve nasal dryness and/or irritation. The presence of excessive nasal secretions and blood may inhibit PCR and give unresolved results.

In an investigational study conducted on 786 nasal specimens, potentially interfering substances were reported for 43% of collected specimens. In total, there were 35 (4.5%) unresolved specimens. Of these 35 specimens, there was no potentially interfering substance reported for 24 of them, nasal secretions for 10 specimens and a combination of substances for one specimen. Twenty-seven (27) were resolved following a freeze-thaw cycle. For the 8 specimens that could not be resolved, no potentially interfering substance was observed for 4 specimens, nasal secretions was observed on three specimens and a combination of substances on one specimen.

Expected values

Humans are a natural reservoir for *S. aureus*. Colonization may be transient or persistent and can last for years. *S. aureus* nasal carriage rates of 25 to 30% have been reported for the general population and rates of 10 to 40% have been reported for outpatient population or on admission⁷. Methicillin-resistant *S. aureus* now represent over 50% of isolates from hospital acquired *S. aureus* in some North American hospitals².

In the investigational study for BD GeneOhm™ MRSA assay, the overall *S. aureus* nasal carriage rate determined by culture (*S. aureus* isolated in specimens by either culture technique) was 36.1% with a range of 33-40%. Fifty one percent (51%) of *S. aureus* isolates were methicillin resistant by the oxacillin screen agar method [Mueller-Hinton agar plate supplemented with oxacillin (6 µg/mL) and NaCl (4% w/v)] for an overall MRSA nasal carriage rate of 18.6%. With BD GeneOhm™ MRSA assay, the overall MRSA nasal carriage rate was 20.3%.

Performance characteristics

Clinical performance

Performance characteristics of BD GeneOhm™ MRSA assay were determined in a multi-site prospective investigational study: 4 medical centers, two in Canada and two in the U.S with MRSA culture-based screening programs in place. To be enrolled in the study, patients had to provide written consent and be eligible for MRSA screening according to hospital policies and not have received antibiotic therapy towards MRSA. Screening criteria included but were not necessarily limited to: systematic screening of all patients at admission, prior MRSA infection or carriage, transfer from another institution, prolonged hospital stay or history of prolonged hospitalization and contact with an MRSA carrier.

The reference method consisted of an initial analysis with the oxacillin screen agar test after selective growth on mannitol salt agar. Specimens negative for MRSA were subjected to an additional analysis consisting of an enrichment step in trypticase soy broth (TSB) containing 6.5% NaCl followed by the oxacillin screen agar test. An MRSA culture-positive specimen was defined as a specimen positive for MRSA by either culture technique. An MRSA culture-negative specimen was defined as a specimen negative for MRSA by both culture techniques.

For the screening method with selective growth on mannitol salt agar (MSA), plates were directly inoculated with nasal swab specimens followed by incubation at 35°C for 24 to 48 hours. When necessary, presumptive colonies of *S. aureus* were subcultured to 5% sheep blood agar plates and incubated for 24-48 hours at 35°C. Otherwise isolated colonies were tested directly from MSA plates. Presumptive staphylococcal colonies were confirmed with a latex agglutination assay or by a tube coagulase test. Confirmed *S. aureus* colonies were tested on Mueller-Hinton agar plate supplemented with oxacillin (6 µg/mL) and NaCl (4% w/v) incubated at 33 to 35°C (not exceeding 35°C) for a full 24 hours. MRSA screening with an enrichment step in tryptic soy broth (TSB) containing 6.5% NaCl was also performed in cases where a negative result for MRSA was obtained with the MSA screening method. For this purpose, TSB broths were inoculated after direct plating onto MSA, incubated overnight at 35°C, subcultured to 5% sheep blood agar plates for 24-48 hours at 35°C and the plates stored at 2-8°C for testing if needed. Confirmation of presumptive colonies and determination of methicillin resistance were done as described above. In one investigational site, every specimen was tested using both culture screening methods.

In total, 786 nasal specimens collected with the recommended swab with Liquid Stuart Medium (refer to Materials required but not provided) were screened for MRSA with the culture method of reference described above and with BD GeneOhm™ MRSA assay. Compared to the culture method of reference, the BD GeneOhm™ MRSA identified 92.5% of the specimens positive for MRSA by either culture techniques and 96.4% of the specimens negative by both culture techniques (Tables 1 and 2). For the population tested, this results in a negative predictive value of 98.2% and a positive predictive value of 85.4%.

Table 1. Results obtained with BD GeneOhm™ MRSA assay in comparison to the reference method¹.

		BD GeneOhm™ MRSA		Total
		Positive	Negative	
Culture techniques	Positive	135	11	146
	Negative	23	609	632
	Total	158	620	778

¹ Eight (8) specimens that gave initially unresolved results remained unresolved upon retesting with BD GeneOhm™ MRSA assay and are not included in the table. All 8 were culture negative.

Fourteen (14) of the 23 culture-negative specimens but BD GeneOhm™ MRSA positive were found to be MRSA culture-positive upon further investigation, resulting in a total of 149 culture-positive and BD GeneOhm™ MRSA positive specimens out of a total of 160 culture positive specimens. For 2 of the culture-positive specimens but BD GeneOhm™ MRSA negative, none of the isolates that exhibited methicillin resistance on oxacillin agar plates could be shown to carry the *mecA* gene when tested with the *mecA*-specific PCR assay described by Martineau *et al.*⁸.

Table 2. Performance of BD GeneOhm™ MRSA assay obtained by the investigational sites when compared to the reference method

	Sensitivity (95% CI) ¹	Specificity (95% CI) ¹	No. of unresolved specimens ²	Invalid/ total no. of runs
Site 1	86.8% (n=38) (71.9-95.6%)	99.6% (n=261) (97.9-100%)	6	0/26
Site 2	100% (n=30) (88.4-100%)	98.0% (n=102) (93.1-99.8%)	16	0/21
Site 3	89.3% (n=28) (71.8-97.7%)	90.8% (n=119) (84.1-95.3%)	11	1/15
Site 4	94.0% (n=50) (83.5-98.7%)	94.0% (n=150) (88.9-97.2%)	2	2/27
Total	92.5% (n=146) (86.9-96.2%)	96.4% (n=632) (94.6-97.27%)	35	3/89

¹ Binomial 95% confidence intervals.

² All specimens were unresolved due to failed internal controls indicative of inhibition or reagent failure. Twenty-seven (27) of the 35 were resolved upon re-testing.

SCCmec typing of MRSA culture-positive specimens according to Oliveira and de Lencastre⁹ revealed specimens of types I, II and IV. There were no SCCmec type III specimens isolated from the study. However, in a separate study, reference strains and other clinical isolates of all SCCmec types were tested and detected with BD GeneOhm™ MRSA assay.

Performances obtained by the investigational sites for BD GeneOhm™ MRSA, and the individual culture techniques as compared to the culture reference method (both culture techniques) are presented in Tables 3 and 4.

Table 3. Results obtained for BD GeneOhm™ MRSA assay and each culture screening technique with specimens positive for MRSA by the culture reference method.

Site	MRSA prevalence ¹	Sensitivity (95% CI) ²		
		BD GeneOhm™ MRSA	OxaMSA ³	OxaTSB ⁴
Site 1	12.7% (38/300)	86.8% (71.9-95.6%)	81.6% (65.7-92.3%)	ND
Site 2	21.7% (30/138)	100% (88.4-100%)	93.3% (77.9-99.2%)	ND
Site 3	18.9% (28/148)	89.3% (71.8-97.7%)	64.3% (44.1-81.4%)	ND
Site 4	25.0% (50/200)	94.0% (83.5-98.7%)	80.0% (66.3-90.0%)	78.0% (64.0-88.5%)
Total	18.6% (146/786)	92.5% (86.9-96.2%)	80.1% (72.7-86.3%)	ND

¹ Determined from results obtained with the culture reference method (combination of OxaMSA and OxaTSB)² Binomial 95% confidence intervals.³ Oxacillin screen agar test after selective growth on MSA.⁴ Oxacillin screen agar test after enrichment in TSB with 6.5% NaCl. Site 4 tested all specimens with both culture techniques while the remaining sites tested only specimens negative with the OxaMSA culture method.**Table 4.** Results obtained for BD GeneOhm™ MRSA assay and each culture screening technique with specimens negative for MRSA by the culture reference method.

Site	MSSA ¹	Specificity (95% CI) ²		
		BD GeneOhm™ MRSA	OxaMSA ³	OxaTSB ⁴
Site 1	73/262	99.6% (97.9-100%)	100% (98.6-100%)	ND
Site 2	25/108	98.0% (93.2-99.8%)	100% (96.4-100%)	ND
Site 3	24/120	90.8% (84.1-95.3%)	100% (96.9-100%)	ND
Site 4	16/150	94.0% (88.9-97.2%)	100% (97.6-100%)	100% (97.6-100%)
Total	138/640	96.4% (94.6-97.7%)	100% (99.4-100%)	ND

¹ Number of MSSA in total MRSA culture-negative population² Binomial 95% confidence intervals.³ Oxacillin screen agar test after selective growth on MSA.⁴ Oxacillin screen agar test after enrichment in TSB with 6.5% NaCl. Site 4 tested all specimens with both culture techniques while the remaining sites tested only specimens negative with the OxaMSA culture method.**Analytical specificity**

Genomic DNA from 37 ATCC strains representing species phylogenetically related to *S. aureus* and members of the nasal commensal flora, 27 strains (15 reference strains and 12 clinical isolates) of methicillin-sensitive coagulase negative staphylococci and 44 strains (two reference strains and 42 clinical isolates) of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci were tested. The specificity was 100%.

As indicated in Table 4, 138 specimens analyzed with culture techniques were deemed by investigational sites to contain methicillin-sensitive *S. aureus*. Seven (7) yielded positive results with BD GeneOhm™ MRSA assay. Upon further investigation with more enhanced culture techniques, 4 were shown to actually contain MRSA.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity (limit of detection or LOD) of BD GeneOhm™ MRSA assay was determined with 7 strains of MRSA. Quantitated culture and purified genomic DNA diluted in the Sample Buffer of BD GeneOhm™ MRSA assay were tested in 5 replicates. The LOD is defined as the smallest concentration at which at least 92.5% of all replicates test positive.

The LOD of BD GeneOhm™ MRSA assay is 15 genome copies per reaction. The LOD in CFU is 5 CFU/reaction. Taking into account the dilution factor due to specimen processing, this translates into approximately 325 CFU/swab.

Reproducibility

A panel of 10 simulated specimens with varying concentrations of MRSA and the two controls (positive and negative) of the BD GeneOhm™ MRSA assay were tested in triplicate on three different days at each of 3 sites (10 specimens plus two controls tested X 3 X 3 days X 3 sites). This was repeated with three lots of reagents.

Table 5. Cumulative data of reproducibility study.

Specimen ID	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Total agreement	Total % agreement
Negative	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Negative	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Weak positive ¹	19/27	18/27	16/27	53/81	65%
Strong positive	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Strong positive	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Weak positive ¹	14/27	13/27	18/27	45/81	56%
Positive	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positive	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Weak positive	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positive	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positive control	26/27	27/27	27/27	80/81	99%
Negative control	26/27	27/27	27/27	80/81	99%
Total agreement	301/324	301/324	304/324	906/972	93%
Total % agreement	93%	93%	94%	93%	

¹ Specimens with CFUs below the limit of detection of the assay.

Français

Indication

Le test BD GeneOhm™ MRSA est un test qualitatif de diagnostic *in vitro* pour la détection directe de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) dans des prélèvements nasaux afin de prévenir et de contrôler les infections à SARM dans les établissements de soins de santé. Le test, réalisé sur le SmartCycler® à partir de l'écouvillon nasal d'un patient à risque pour cette colonisation, exploite la réaction de polymérisation en chaîne (PCR : *Polymerase Chain Reaction*) pour amplifier l'ADN de SARM et l'hybridation de sondes fluorogéniques spécifiques des séquences d'ADN amplifiées afin de détecter les produits d'amplification. Le test BD GeneOhm™ MRSA n'est pas indiqué pour le diagnostic des infections aux SARM ni pour guider le traitement contre de telles infections ou encore pour en faire le suivi. Des cultures simultanées sont nécessaires uniquement dans le but d'obtenir des micro-organismes pour faire de la caractérisation épidémiologique ou des études complémentaires de sensibilité aux antibiotiques.

Résumé et explication du test

Un échantillon nasal est prélevé à l'aide d'un écouvillon recommandé avec milieu Stuart liquide (voir Matériel nécessaire mais non fourni) et acheminé au laboratoire. Pour l'analyse, l'écouvillon est placé dans le tampon d'échantillon. Le spécimen est alors concentré, puis lysé. Une aliquote de ce lysat est ajoutée au mélange réactionnel de PCR, contenant notamment les amorces spécifiques de SARM, afin d'amplifier la cible génétique, si elle est présente. Le test contient également un contrôle interne (CI). Ce dernier permet de déceler la présence d'inhibiteurs de la PCR et de garantir l'intégrité des réactifs du test. Les cibles amplifiées sont détectées à l'aide de sondes moléculaires de type *beacon*. L'amplification, la détection et l'interprétation des signaux de fluorescence sont faites automatiquement par le SmartCycler® de Cepheid. La procédure complète nécessite de 60 à 75 minutes, dépendamment du nombre d'échantillons à tester. La récupération des cellules de SARM afin d'en faire la caractérisation épidémiologique ou pour une étude complémentaire de sensibilité aux antibiotiques est possible, grâce à l'inoculation de milieux de cultures appropriés. Celle-ci peut se faire au cours de la préparation des échantillons ou dans les 24 heures suivantes.

Le *S. aureus* est une cause majeure d'infections nosocomiales. La plupart des transmissions sont occasionnées par les mains contaminées d'une personne porteuse de la bactérie. Bien que le *S. aureus* soit la cause d'infections dont les manifestations cliniques s'étendent de simples pustules à la septicémie, voire la mort¹, il est communément retrouvé dans les voies nasales ou sur l'épiderme d'individus sains (porteurs asymptomatiques). Le traitement des infections à *S. aureus* est devenu un réel défi suite à l'émergence de souches résistantes à des agents antimicrobiens autrefois efficaces. Ainsi, des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline sont fréquemment retrouvées dans les établissements de soins de santé et représentent plus de 50% des isolats de *S. aureus* acquis en milieu hospitalier dans certains hôpitaux de l'Amérique du Nord². Les facteurs de risques pour les infections à SARM dans les établissements de soins de santé comprennent les séjours prolongés à l'hôpital, la proximité de patients infectés à SARM, l'exposition à des traitements multiples et prolongés utilisant des antibiotiques à large spectre et la colonisation nasale par le SARM. Le dépistage précoce de patients porteurs de SARM nasaux, permettant l'identification de ceux qui requièrent une isolation, peut faire partie d'un programme de contrôle efficace des infections à SARM. Les méthodologies actuelles utilisées pour détecter les SARM nécessitent toutes une étape de culture et l'isolation de colonies pures, en plus d'un test de sensibilité à l'oxacilline, ou de la détection du gène *mecA* ou encore de la protéine liant la pénicilline (PBP 2a) pour laquelle il code. Il en résulte un accroissement du temps de résolution du statut de porteur de SARM à un minimum de 16 heures, la durée moyenne étant de plus de 48 heures. Compte tenu de la rapidité avec laquelle se propagent les infections à SARM, particulièrement dans les établissements de soins de santé où les porteurs sont fréquents, la capacité de fournir des résultats de colonisation nasale par des SARM le jour même de l'admission représente un avantage crucial pour les programmes de contrôle des infections.

Principe du test

Après la lyse du spécimen, une amplification de la cible [séquence proche du site d'insertion de la Cassette Chromosomique *mec* des Staphylocoques (SCC*mec*)] est effectuée. L'amplification du CI, un fragment d'ADN de 335-pb comprenant une séquence de 277-pb inexistante dans les SARM se produit également, à moins que des substances inhibitrices de la PCR ne soient présentes.

Les cibles d'ADN amplifiées sont détectées à l'aide de *beacons* moléculaires, de courts oligonucléotides simple brin adoptant une conformation en épingle à cheveux et marqués par une molécule absorbante (*quencher*) à une extrémité et par une molécule fluorescente (fluorophore) à l'autre. En absence de la cible, le fluorophore est éteint par le *quencher*. En présence de la cible toutefois, la structure en épingle à cheveux s'ouvre suite à son appariement avec l'amplicon, permettant l'émission de fluorescence par le fluorophore. Pour la détection des amplicons du SARM, le *beacon* moléculaire est marqué par le fluorophore FAM à son extrémité 5' et par le DABCYL, une molécule absorbante non fluorescente, à son extrémité 3'. Les amplicons du contrôle interne sont détectés par un *beacon* marqué avec le fluorophore TET à l'extrémité 5' et le DABCYL à l'extrémité 3'. Chaque hybride *beacon*-cible fluoresce à une longueur d'onde caractéristique du fluorophore utilisé pour marquer le *beacon*. La quantité de fluorescence émise à chaque cycle, ou à la fin du PCR, est représentative de la quantité d'amplicons spécifiques présents au même moment. Le SmartCycler® mesure simultanément la fluorescence émise par chaque *beacon* et interprète les données générées afin de fournir un résultat final à la fin du programme PCR (se référer à la section Interprétation des résultats).

Réactifs

Test BD GeneOhm™ MRSA	48 Tests	200 Tests
Tampon d'échantillon (SampleBuffer)	60 X 1 mL	240 X 1mL
Tampon Tris-EDTA		
Tube de lyse (Lysis tube)	50 tubes	200 tubes
Billes de verre		
Mélange réactionnel (Master Mix)	8 tubes	34 tubes
Complexe ADN polymérase < 0.0005 %		
Contrôle interne < 0.001% - ADN non infectieux contenant les séquences complémentaires des amorces de SARM et une séquence unique pour la sonde d'hybridation		
Amorces < 0.002 %		
Sondes d'hybridation < 0.002 %		

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

Albumine bovine

Hydrate de carbone

MgCl₂

ADN génomique non infectieux de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) < 0,001 %

ADN Contrôle (Control DNA)

8 tubes

34 tubes

Tampon Tris-EDTA

Hydrate de carbone

ADN génomique non infectieux de SARM (ATCC 43300) < 0,001 %

Diluant (Diluent)

8 X 700 µL

34 X 700 µL

Tampon Tris-HCl

MgCl₂

(NH₄)₂SO₄

KCl

Précautions

Test aux fins de diagnostic *in vitro* seulement

- Ne pas utiliser la trousse si le sceau de sécurité sur la boîte extérieure a été brisé.
- Ne pas utiliser les réactifs si la pochette de protection est ouverte ou endommagée lors de sa réception.
- Refermer rapidement, après chaque emploi, les pochettes protectrices du mélange réactionnel et de l'ADN contrôle au moyen de la fermeture à glissière.
- Ne pas utiliser le mélange réactionnel ou l'ADN contrôle si les pochettes ne contiennent pas de dessiccant.
- **Ne pas retirer les dessiccants des pochettes de mélange réactionnel et d'ADN contrôle**
- Les lots de réactifs ne sont pas interchangeables.
- Ne jamais mélanger les réactifs de différents tubes même s'ils proviennent du même lot.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ne pas échanger les capuchons des réactifs entre eux étant donné qu'ils peuvent être contaminés et fausser les résultats du test.
- Éviter la contamination microbienne des réactifs ou la contamination par la désoxyribonucléase (DNase) lors du prélèvement d'aliquotes dans les tubes. Il est recommandé d'utiliser des micropipettes munies d'embouts à filtre à déplacement direct, stériles, jetables, exempts de DNase.
- Pour éviter la contamination de l'environnement par des amplicons, ne pas ouvrir les tubes réactionnels après l'amplification.
- Utiliser un nouvel embout pour chaque échantillon ou réactif.
- La réalisation du test en dehors des délais recommandés peut se solder par des résultats non valables. Les tests qui ne respectent pas les plages de temps indiquées devraient être repris.
- Des contrôles supplémentaires peuvent être effectués suivant les directives ou les exigences des organismes fédéraux, provinciaux ou locaux de réglementation ou des organismes d'accréditation.
- Lorsque des réactions de PCR en tubes ouverts sont également effectuées dans le laboratoire, la préparation des échantillons ainsi que les activités d'amplification et de détection devraient se faire dans des zones distinctes de travail. Les fournitures et le matériel devraient être exclusifs à chaque zone et ne devraient pas passer d'une zone à l'autre. Il faut toujours porter des gants et les changer avant de passer dans une autre zone ou avant de manipuler les réactifs lyophilisés.
- Ne pas congeler l'écouvillon. Entreposer à la température de la pièce. Non ouvert, l'écouvillon est stable jusqu'à la date de péremption indiquée.
- Toujours manipuler les échantillons comme s'ils étaient infectieux et appliquer les précautions d'usage comme celles décrites dans *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³ et dans le document M29 du CLSI⁴.
- Porter des vêtements de protection et des gants jetables pour la manipulation des réactifs. Se laver soigneusement les mains après avoir effectué le test.
- Ne pas pipeter avec la bouche.
- Ne pas fumer, boire ou manger dans les zones de manipulation des échantillons et des réactifs.
- Jeter les réactifs non utilisés et les déchets conformément à la réglementation nationale, fédérale, provinciale ou locale.

Matériel fourni

- Tampon d'échantillon (*Sample Buffer*)
- Tube de lyse (*Lysis tube*)
- Mélange réactionnel (*Master Mix*)
- ADN contrôle (*Control DNA*)
- Diluant (*Diluent*)
- Tubes SmartCycler®, 25 µL
- Étiquettes d'identification des échantillons

Entreposage, manutention et stabilité

Échantillons prélevés

Les échantillons doivent être conservés entre 2°C et 30°C durant le transport et doivent être protégés du gel et de la chaleur excessive.

Les échantillons sur lesquels on retrouve des substances potentiellement interférentes (p. ex. sang, sécrétions nasales abondantes, etc.) devraient être testés à l'intérieur de 24-36 heures. Dans le cas contraire, les échantillons peuvent être conservés jusqu'à 5 jours à 2-8°C avant d'être testés. Les échantillons pouvant être testés à l'intérieur de 36 heures peuvent être conservés à température ambiante (15-30°C).

Réactifs

Note: Entreposer les réactifs tels que précisés sur chaque pochette. Hors de leur pochette protectrice, les tubes non utilisés à l'intérieur des délais prescrits doivent être jetés.

Composante de la trousse		Master Mix et Control DNA (étiquette blanche et étiquette à bande rouge respectivement)	Lysis Tube (capuchon jaune)	Sample Buffer, et Diluent (capuchon bleu et étiquette à bande noire , respectivement)
Pochette scellée	Température	2-25 °C	2-25 °C	2-25 °C
	Stabilité	Date de péremption	Date de péremption	Date de péremption
Pochette ouverte	Température	2-8 °C ¹	2-25 °C ²	2-25 °C ²
	Stabilité	1 mois ³	Date de péremption	2 mois ³

¹ Une fois le scellement original brisé, refermer la pochette au moyen de la fermeture à glissière après chaque utilisation et conserver le produit à une température de 2-8°C.

² Même si ces réactifs peuvent être conservés à la température de la pièce, il est recommandé de les conserver avec les réactifs du même lot à 2-8°C.

³ À condition que le sac soit bien refermé au moyen de la fermeture à glissière après chaque utilisation.

Composantes de la trousse à l'extérieur de leur pochette protectrice			Master Mix et Control DNA (étiquettes blanche et à bande rouge , respectivement)
Tubes non reconstitués	Température		15-25 °C
	Stabilité		2 heures
Tubes reconstitués ¹	Contenant original	Température	2-8 °C
		Stabilité	3 heures
	Tube SmartCycler®	Température	2-8 °C
		Stabilité	1 heure

¹ Jeter les tubes non utilisés à la fin du délai.

Matériel nécessaire mais non fourni

- **BBL^{MC} CultureSwab^{MC} Liquid Stuart** (n° 220099 au catalogue Becton Dickinson), **Écouvillons Copan Transystem^{MC} Liquid Stuart** (n° 141C.USE au catalogue Copan Italia International), **Copan Venturi Transystem^{MC} Liquid Stuart** (n° 141C.US au catalogue Copan Diagnostics Inc.), **HealthLink TransPorter^{MC} single Liquid Stuart** (n° 4432 au catalogue HealthLink)
- BBL^{MC} CHROMagar^{MC} Staph aureus, catalogue no. 214982, **géloses Mannitol-Sel** (Mannitol Salt Agar (MSA)) catalogue no. 221773 ou 221271 ou milieu équivalent (optionnel),
- **Vortex** Genie 2 (Fisher) muni d'un portoir pour microtubes de 1,5 mL ou matériel équivalent; pour le traitement de plusieurs échantillons, un adaptateur à positions multiples peut être utilisé
- **Micropipettes** (plage de précision 1-10 µL, 10-100 µL et 100-1000 µL)
- **Embouts** à filtre ou à déplacement direct, **stériles, exempts de DNase**
- **Pipettes de transfert stériles à pointe fine** (p. ex. n° au catalogue VWR 14670-329, 14670-332) ou embouts à filtre effilés de 1250 µL, stériles, exempts de DNase (p. ex. n° au catalogue MATRIX : 8255)
- **Ciseaux**
- **Gazes**
- **Gants** jetables, sans poudre
- **Microcentrifugeuse** à haute (doit atteindre 14 000 x g) et faible vitesse
- **Bloc chauffant à sec** pour des tubes de 1,5 mL ou bain-marie
- **Glace ou bloc réfrigérant** pour tubes de 1,5 mL
- **Décapsuleur** (p. ex. n° au catalogue MATRIX : 4469) (facultatif)
- **Chronomètre** ou minuterie
- **Système SmartCycler® de démarrage (starter system) avec logiciel Dx (Diagnostic)** (bloc analyseur, manuel d'utilisation, trousse d'accessoires et ordinateur) (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)

Mode d'emploi

Prélèvement des échantillons

Afin d'obtenir des échantillons convenables, les instructions de prélèvement ci-dessous doivent être suivies avec soin.

En se servant de l'écouvillon recommandé avec milieu Stuart liquide (voir Matériel nécessaire mais non fourni), **procéder au prélèvement de l'échantillon nasal comme suit :**

1. Humidifier l'écouvillon avec deux gouttes (environ 50 µL) de sérum physiologique stérile (saline) ou l'utiliser sec.
2. Insérer soigneusement l'écouvillon dans une narine du patient (**le bout de l'écouvillon doit être inséré jusqu'à 2,5 cm (1 pouce) à partir du bord des narines**).
3. Faire rouler la tige de l'écouvillon 5 fois entre les doigts.
4. Insérer ce même écouvillon dans la deuxième narine et répéter l'écouvillonnage selon 2 et 3.
5. Placer l'écouvillon dans sa gaine protectrice.
6. Identifier l'échantillon.
7. Acheminer les échantillons au laboratoire suivant les méthodes d'opérations normalisées de l'hôpital.
8. Se référer à la section intitulée Entreposage, manutention et stabilité – Échantillons prélevés pour l'entreposage et la manutention.

Préparation des échantillons

Note: Il faut, **pour chaque échantillon** à analyser, un tube de *Sample Buffer* (**tampon d'échantillon, capuchon bleu**) et un *Lysis tube* (**tube de lyse, capuchon jaune**). Il faut également un tube de *Sample Buffer* additionnel pour chaque groupe de 20 échantillons à tester. Retirer le nombre nécessaire de tubes de leur pochette de protection, **enlever le surplus d'air et refermer rapidement les pochettes au moyen de la fermeture à glissière**.

Pour cultiver les échantillons cliniques (écouvillons) avant de les préparer pour le test BD GeneOhm™MRSA, se référer à la section Culture des échantillons cliniques - Méthode d'étalement sur gélose.

1. **Placer l'écouvillon dans un tube de tampon d'échantillon (capuchon bleu).**
Identifier le tube contenant le tampon d'échantillon sur le capuchon et/ou sur l'étiquette du tube.
2. **Casser la tige de l'écouvillon et bien refermer le tube.**
Tenir la tige de l'écouvillon près du bord du tube (une gaze peut être utilisée pour se protéger des risques potentiels de contamination). Soulever l'écouvillon de quelques millimètres (mm) par rapport au fond du tube et plier la tige contre le bord du tube pour la casser. Méthode alternative : utiliser des ciseaux propres pour couper la tige. S'assurer que le capuchon se refermera complètement.
3. **Vortexer à grande vitesse pendant 1 minute.**
Pour le traitement de plusieurs échantillons, un adaptateur à positions multiples peut être utilisé.

4. Transférer tout le volume de suspension cellulaire au tube de lyse (capuchon jaune).

Utiliser une pipette de transfert stérile à pointe fine ou une micropipette de 1000 µL avec un embout effilé.

Pour cultiver les échantillons cliniques à partir de l'écouvillon restant dans le tube de tampon d'échantillon, se référer à la section Culture des échantillons cliniques - Milieu d'enrichissement.

5. Centrifuger à haute vitesse (entre 14 000 x g et 21 000 x g) pendant 5 minutes à température ambiante.**6. Retirer le surnageant et le jeter.**

Utiliser une pipette de transfert stérile à pointe fine pour retirer le surnageant du *Lysis tube*, en prenant soin de ne pas toucher au culot. Utiliser une nouvelle pipette de transfert pour chaque échantillon.

7. Ajouter 50 µL de tampon d'échantillon au tube de lyse. Bien refermer le tube.

Utiliser un nouvel embout pour chaque échantillon. Un tube de tampon d'échantillon est suffisant pour préparer jusqu'à 20 échantillons. Pour plus de 20 échantillons, utiliser autant de tubes de tampon d'échantillon que nécessaire (**conserver le tampon non utilisé pour la suite de la procédure du test BD GeneOhm™ MRSA**).

8. Vortexer à grande vitesse pendant 5 minutes.

Pour le traitement de plusieurs échantillons, un adaptateur à positions multiples peut être utilisé.

9. Centrifuger le tube de lyse brièvement.

À faible vitesse durant 2 à 5 secondes pour faire descendre le liquide au fond du tube.

10. Chauffer à 95 ± 2°C pendant 2 minutes.

Utiliser un bloc chauffant à sec ou un bain-marie.

11. Placer le tube de lyse sur la glace ou sur un bloc réfrigérant.

Les lysats sont stables jusqu'à 4 heures lorsque conservés à 2-8°C. Si les lysats ne sont pas utilisés à l'intérieur de ce délai, les conserver à -20 ± 5 °C pour utilisation ultérieure.

Procédure du test BD GeneOhm™ MRSA

Note: Un tube de *Master mix* reconstitué (mélange réactionnel, **étiquette blanche**) contient assez de réactifs pour effectuer **8 réactions** PCR. Prévoir un tube SmartCycler® par échantillon à analyser et 2 tubes SmartCycler® supplémentaires pour les contrôles positif et négatif. **Un (1) contrôle positif et un (1) contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série de tests BD GeneOhm™ MRSA.** Un tube de *Control DNA* (ADN contrôle, **étiquette à bande rouge**) est requis par série de tests. Un tube de *Diluent* (diluant, **étiquette à bande noire**) permet de reconstituer jusqu'à 3 tubes de *Master mix*. Retirer le nombre nécessaire de tubes de leur pochette de protection, **enlever le surplus d'air et refermer rapidement les pochettes au moyen de la fermeture à glissière.**

Préparer le nombre de tubes de SmartCycler® en fonction du nombre de modules I-CORE^{MD} disponibles sur le SmartCycler®, sans excédant.

1. Placer le nombre requis de tubes de mélange réactionnel (étiquette blanche) sur la glace ou sur un bloc réfrigérant pour tubes de 1,5 mL.**2. Ajouter 225 µL de diluant (étiquette à bande noire) à chaque tube de mélange réactionnel.**

Insérer l'embout de la micropipette à travers le septum du capuchon du tube de mélange réactionnel. Ne pas insérer l'embout trop profondément dans le capuchon. Délivrer le diluant. Jeter les tubes de diluant entamés.

3. Vortexer le(s) tube(s) pendant 5-10 secondes.**4. Placer le nombre de tubes SmartCycler® requis sur le bloc réfrigérant adapté.**

Prévoir un tube SmartCycler® par échantillon à analyser et 2 tubes SmartCycler® supplémentaires pour les contrôles. **Éviter de toucher aux fenêtres de détection optique se trouvant sur les bords inférieurs du tube et à la partie inférieure en forme de diamant.**

Les étapes suivantes DOIVENT être réalisées dans un délai d'une heure:**5. Ajouter 25 µL du mélange réactionnel reconstitué à chaque tube SmartCycler®.**

Retirer le bouchon du tube avant de prélever le réactif. Distribuer le liquide dans le réservoir (partie supérieure) des tubes SmartCycler®. Identifier les tubes SmartCycler® sur le capuchon. Les étiquettes d'identification fournies avec la trousse peuvent être utilisées. Le mélange réactionnel non utilisé **placé immédiatement à 4-8 °C à l'abri de la lumière pendant un maximum de 3 heures** peut être utilisé pour la reprise de tests sur des échantillons non résolus, si nécessaire. Jeter le mélange réactionnel non utilisé après ce délai.

6. Ajouter 2,8 µL de chacun des échantillons lysés à un tube SmartCycler® différent rempli préalablement; fermer les tubes.

Prendre soin de ne pas aspirer de billes lors du pipetage dans le tube de lyse. Après le dépôt de l'échantillon, rincer l'embout 2 à 3 fois avec le mélange réactionnel reconstitué contenu dans le réservoir pour assurer le transfert complet de l'échantillon. Utiliser un nouvel embout pour chaque échantillon.

7. Placer un tube d'ADN contrôle (étiquette à bande rouge) sur la glace ou sur un bloc réfrigérant pour tubes de 1,5 mL.**8. Ajouter 225 µL de tampon d'échantillon (capuchon bleu) au tube d'ADN contrôle.**

Prendre le tampon d'échantillon utilisé lors de l'étape 7 du protocole de préparation des échantillons. Insérer l'embout de la micropipette à travers le septum du capuchon du tube d'ADN contrôle. Ne pas insérer l'embout trop profondément dans le capuchon. Délivrer le tampon d'échantillon.

9. Vortexer le tube pendant 5 à 10 secondes.

10. Ajouter 2,8 µL de l'ADN contrôle reconstitué à l'avant-dernier tube SmartCycler® (contrôle positif); fermer le tube.

Après le dépôt de l'ADN, rincer l'embout 2 à 3 fois avec le mélange réactionnel reconstitué contenu dans le réservoir pour assurer le transfert complet du volume. Identifier le tube comme étant le contrôle positif. L'ADN contrôle non utilisé **placé immédiatement à 4-8 °C à l'abri de la lumière pendant un maximum de 3 heures** peut être utilisé pour la préparation de nouveaux contrôles positifs lors de la reprise de tests sur des échantillons non résolus, si nécessaire. Jeter le l'ADN contrôle non utilisé après ce délai.

11. Ajouter 2,8 µL de tampon d'échantillon (capuchon bleu) au dernier tube SmartCycler® (contrôle négatif); fermer le tube.

Prendre le tampon d'échantillon utilisé lors de l'étape 7 du protocole de préparation des échantillons. Cette étape vise à détecter les contaminations de la PCR qui pourraient survenir pendant la manipulation des échantillons. Identifier le tube comme étant le contrôle négatif, puis, jeter le tampon d'échantillon non utilisé.

12. Centrifuger tous les tubes SmartCycler® pendant 5 à 10 secondes.

Utiliser la microcentrifugeuse spécialement adaptée fournie avec le SmartCycler®.

13. Garder les tubes sur le bloc réfrigérant SmartCycler® (2 - 8°C) jusqu'à leur chargement sur l'instrument.

Congeler le reste des lysats à une température de -20 ± 5°C pour utilisation ultérieure, si besoin.

14. Créer une série de tests avec le programme PCR du test BD GeneOhm™MRSA..

Se référer au Manuel d'utilisation du logiciel SmartCycler® Dx si nécessaire. Les paramètres d'identification des échantillons devraient être entrés avant de commencer la série de tests.

15. Insérer chaque tube de réaction dans un module I-CORE^{MD} du SmartCycler®; refermer le couvercle du I-CORE^{MD}.

Placer les contrôles positif et négatif aux positions assignées par le logiciel (voir la section intitulée Contrôle qualité). Bien enfoncer les tubes dans les I-CORE^{MD}.

16. Démarrer le programme PCR.

Contrôle qualité

Contrôles positif et négatif

Les mesures de contrôle qualité visent à vérifier l'efficacité du test. Le contrôle positif vérifie la qualité des réactifs en détectant toute défaillance importante. Le contrôle négatif détecte la contamination des réactifs ou de l'environnement (ou la contamination croisée) par le SARM ou par des amplicons de SARM. Les contrôles positif et négatif sont des contrôles de série. Un contrôle invalidé annule toute la série. Finalement, un contrôle interne intégré dans chaque mélange réactionnel détecte l'inhibition de la PCR dans chaque échantillon et valide l'intégrité des réactifs.

Chaque série de tests effectuée avec le SmartCycler® doit comprendre un contrôle positif et un contrôle négatif. Le logiciel SmartCycler® attribue la position des contrôles par défaut (consulter le manuel d'utilisation du logiciel SmartCycler® Dx).

Contrôle du processus de préparation des échantillons

Des souches contrôles peuvent être testées selon les directives ou les exigences des organismes fédéraux, provinciaux ou locaux de réglementation ou des organismes d'accréditation. Une souche de référence de SARM (p. ex. *American Type Culture Collection* ATCC 43300), ou un isolat clinique bien caractérisé de SARM peut servir de contrôle de préparation des échantillons, tandis qu'une culture de *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline (p. ex. ATCC 29213) ou de tout autre staphylocoque autre que *Staphylococcus aureus* (p. ex. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990) peut servir de contrôle négatif externe.

Resuspendre dans de la saline des colonies isolées provenant d'une culture de 18 à 24 h réalisée sur gélose au sang de mouton (ex. BBL^{MC} Trypticase Soy Agar (TSA II) avec 5 % de sang de mouton, n° de catalogue BD 221239 ou 221261) afin d'obtenir une turbidité équivalente à un McFarland 0,5 (~1.5 X 10⁸ UFC/mL, UFC signifiant unités formatrices de colonies). Diluer avec de la saline afin d'obtenir une suspension d'environ 10⁶ UFC/mL. Tremper l'écouvillon recommandé avec milieu Stuart liquide (voir Matériel nécessaire mais non fourni) dans la suspension bactérienne, presser pour enlever l'excès de liquide et placer l'écouvillon dans sa gaine protectrice (pour permettre un contact avec le milieu de transport); laisser reposer durant 5 minutes. Traiter et analyser le contrôle comme s'il s'agissait d'un échantillon clinique (cf. Préparation des échantillons et Procédure du test BD GeneOhm™MRSA.), y compris les contrôles. Tous les échantillons et tous les contrôles devraient donner des résultats valides (aucun contrôle positif ou négatif invalidé, aucun contrôle interne rejeté).

Pour en savoir davantage sur les contrôles qualité, consultez les documents MM3⁵ et C24 du CLSI⁶.

Culture des échantillons cliniques

Pour procéder à l'étude de sensibilité aux antibiotiques ou à la caractérisation épidémiologique, les échantillons cliniques peuvent être cultivés à deux étapes différentes de la procédure du test BD GeneOhm™MRSA.. La culture peut être effectuée directement à partir de l'écouvillon, avant de procéder à la préparation des échantillons pour le test BD GeneOhm™MRSA. en utilisant la méthode d'étalement sur gélose ou à partir de l'écouvillon après la procédure de préparation des échantillons en utilisant une étape d'enrichissement.

Méthode d'étalement sur gélose

Cette méthode de culture peut être réalisée avant la préparation des échantillons pour le test BD GeneOhm™MRSA..

1. Retirer l'écouvillon de sa gaine protectrice.
2. Inoculer une gélose mannitol-sel (MSA-mannitol salt agar) en striant le premier quadrant de la gélose.
3. Replacer l'écouvillon dans sa gaine protectrice ou en casser la tige dans un tube de tampon d'échantillon (capuchon bleu) du test BD GeneOhm™MRSA. et continuer la procédure décrite à la section Préparation des échantillons.
4. Avec un fil à boucle, strier l'inoculum dans les quadrants restants de la gélose mannitol-sel.
5. Incuber la gélose MSA pendant 24 à 48 heures à 35 °C.
6. Identifier et confirmer les colonies de *S. aureus* puis tester pour la résistance à la méthicilline selon les méthodes standard.

Bouillon d'enrichissement

Cette méthode de culture peut être effectuée à partir de l'écouvillon laissé dans le tube de tampon d'échantillon après le transfert de la suspension bactérienne au tube de lyse. Les écouvillons peuvent être conservés entre 2 à 8 °C à l'intérieur des tubes de tampon d'échantillon jusqu'à 24 heures avant d'être mis en culture; la récupération peut ne pas être fructueuse avec des échantillons cliniques contenant peu de SARM.

1. Ajouter 1,0 mL de bouillon d'enrichissement aux tubes de tampon d'échantillon contenant l'écouvillon.
Le bouillon tryptone soya (TSB) supplémenté avec 6,5% NaCl est suggéré.
2. Incuber pendant 24 à 48 heures à 35 °C.
3. Repiquer sur un milieu solide approprié et faire croître pendant 24 à 48 heures à 35 °C.
Une gélose contenant 5% de sang de mouton est suggérée.
4. Identifier et confirmer les colonies de *S. aureus* puis tester pour la résistance à la méthicilline selon les méthodes standard.

Interprétation des résultats

L'algorithme décisionnel relatif au test BD GeneOhm™MRSA, est intégré dans le logiciel SmartCycler®. L'interprétation des résultats se fait selon les critères suivants :

Résultat de l'échantillon	Résultat du CI	Interprétation des résultats ¹
NEG (Négatif)	PASS (Accepté)	Aucun ADN de SARM détecté, colonisation nasale avec le SARM peu probable
POS (Positif)	NA (Non applicable)	ADN de SARM détecté, colonisation nasale avec le SARM
Unresolved (Non résolu)	FAIL (Rejeté)	Non résolu - échantillon inhibiteur ou défaillance du réactif
ND (Indéterminé)	ND (Indéterminé)	Indéterminé en raison d'une défaillance du module I-CORE ^{MD} (codes d'erreur ou d'avertissement affichés ²)

CI : contrôle interne

¹ Les résultats du test BD GeneOhm™MRSA, peuvent être utilisés pour guider l'isolation et les niveaux de précautions suivant les pratiques et les programmes institutionnels.

² Consulter le manuel d'utilisation du logiciel SmartCycler® Dx pour l'interprétation des codes d'erreur ou d'avertissement.

Un contrôle positif ou négatif invalide annule toute la série. Dans ces cas, les résultats obtenus dans cette série sont nuls et ne doivent pas être consignés. Les séries invalidées et les codes d'erreur ou d'avertissement de l'appareil sont marqués à l'écran et sur les rapports. Avant de consigner les résultats du test, toujours s'assurer de la validité de la série.

Consulter le manuel d'utilisation du logiciel SmartCycler® Dx pour l'impression des résultats.

Série invalidée

En utilisant les lysats congelés, préparer de nouveaux tubes de réaction pour tous les échantillons cliniques de cette série. Préparer aussi de nouveaux contrôles.

Échantillons non résolus

Reprendre le test avec le lysat congelé de l'échantillon non résolu. Un cycle de congélation/décongélation diminue l'effet des substances inhibitrices de la PCR.

Échantillons indéterminés en raison d'une défaillance du module I-CORE^{MD}

Reprendre le test avec les lysats congelés d'échantillon correspondants. Consulter le manuel d'utilisation du logiciel SmartCycler® Dx pour l'interprétation des codes d'erreur ou d'avertissement.

Limites du test

- L'efficacité du test a été établie avec le SmartCycler® à partir d'échantillons nasaux obtenus de patients hospitalisés ou de patients à l'admission. Les échantillons ont été prélevés en utilisant des écouvillons simples Copan Venturi Transystem^{MD} avec milieu Stuart liquide. Ainsi, ce test peut être utilisé uniquement avec le SmartCycler®. L'utilisation de systèmes de prélèvement et de transport des échantillons autres que ceux indiqués à la section Matériel requis mais non fourni n'est pas recommandé. Aucune autre source de prélèvements cliniques n'a fait l'objet d'évaluation; les caractéristiques d'efficacité du test pour d'autres types d'échantillons ou populations ne sont donc pas connues.
- Des techniques inadéquates de prélèvement d'échantillons, de manutention et d'entreposage, la présence de substances inhibitrices, des erreurs techniques, un mélange d'échantillons ou un nombre de micro-organismes dans l'échantillon inférieur à la sensibilité analytique du test peuvent donner lieu à des résultats négatifs. Pour éviter des résultats erronés, il est essentiel de respecter scrupuleusement les consignes données dans la présente notice et dans le manuel d'utilisation du logiciel SmartCycler® Dx. Le test ne devrait être effectué que par du personnel formé à la technique ainsi qu'à l'analyse sur le SmartCycler®.
- Même s'il n'est pas nécessaire de préparer des réactifs et que les principales opérations techniques font appel au pipetage, le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel à l'efficacité du test. Compte tenu de la grande sensibilité analytique du test, il est essentiel de prendre grand soin de conserver la pureté des réactifs, surtout lorsque plusieurs aliquotes sont prélevées dans un même tube.
- Le dépistage détermine le statut de colonisation à un temps donné et celui-ci peut varier selon le traitement donné au patient (p. ex. décolonisation), le statut du patient (p. ex. patient qui ne répand pas activement du SARM) ou l'exposition à des environnements à haut risque (p. ex. contact avec un porteur de SARM, hospitalisation prolongée). Le suivi du statut de colonisation devrait être réalisé selon les politiques hospitalières en place.

- Les résultats du test BD GeneOhm™MRSA devraient servir de complément aux efforts de contrôle des infections nosocomiales pour identifier les patients qui nécessitent des précautions accrues. Le test n'a pas été conçu pour identifier les personnes atteintes d'une infection à staphylocoque. Les résultats ne devraient pas être utilisés pour suivre de près un traitement contre des infections causées par le SARM.
- Un test BD GeneOhm™MRSA positif n'est pas nécessairement indicatif de l'échec d'un traitement puisque l'ADN peut persister. Un résultat négatif obtenu suite à un résultat positif antérieur peut indiquer la réussite du traitement d'éradication ou peut être attribuable à un phénomène de colonisation intermittente.
- Le test BD GeneOhm™MRSA donne parfois des résultats non résolus ou invalides en raison d'un contrôle rejeté, ce qui nécessite une reprise du test et entraîne des retards dans la disponibilité des résultats.
- Un résultat positif n'indique pas nécessairement la présence de micro-organismes viables. Il est toutefois présomptif de la présence de SARM puisque le test BD GeneOhm™MRSA détecte simultanément la cassette SCCmec (porteuse du gène mecA) et une séquence spécifique à *S. aureus* se situant à l'intérieur du gène *orfX*. Le test BD GeneOhm™MRSA ne détecte pas directement le gène mecA ni la protéine liant la pénicilline (penicillin binding protein - PBP 2a) pour laquelle il code.
- Il a été démontré que le test BD GeneOhm™MRSA pouvait détecter plusieurs types de SARM associés à des infections acquises en milieu hospitalier ou dans la communauté. L'évaluation du test n'a pas permis de déterminer les caractéristiques phénotypiques ou génotypiques des isolats de SARM permettant l'identification de souches pouvant être plus virulentes en environnement hospitalier.
- La présence de mutations dans les régions d'hybridation des sondes ou des amorces peut affecter la détection de nouvelles variantes ou de variantes inconnues de SARM occasionnant un résultat faux négatif avec le test BD GeneOhm™MRSA.

Substances interférentes

La liste non exhaustive des substances potentiellement interférentes est la suivante : le sang, l'excès de sécrétions nasales / mucus nasal, les décongestionnants et autres substances utilisées occasionnellement contre l'irritation ou la sécheresse nasale. La présence d'excès de sécrétions nasales ou le sang peut occasionner l'inhibition de la réaction PCR et générer des résultats non résolus.

Dans une étude d'investigation menée sur 786 échantillons nasaux, des substances potentiellement interférentes ont été rapportées dans 43% des cas. Au total, 35 résultats non résolus (4,5%) ont été obtenus. Parmi ces 35 échantillons, 24 ne présentaient pas de substances potentiellement interférentes, 10 étaient riches en sécrétions nasales et 1 comportait une combinaison de substances. Vingt-sept (27) d'entre eux ont été résolus à la suite d'un cycle de congélation/décongélation. Quant aux 8 échantillons demeurés non résolus, aucune substance potentiellement interférente n'a été observée pour 4 d'entre eux, 3 étaient riches en sécrétions nasales et 1 présentait une combinaison de substances.

Valeurs attendues

Les humains représentent un réservoir naturel pour *S. aureus*. La colonisation peut être transitoire ou permanente et peut durer pendant des années. Des taux de colonisation nasale par le SARM de l'ordre de 25 à 30% ont été rapportés pour la population générale alors que des taux de 10 à 40% ont été rapportés pour des patients en consultation externe ou à l'admission¹. *S. aureus* résistant à la méthicilline représente aujourd'hui plus de 50% des isolats de *S. aureus* acquis en milieux hospitaliers dans certains hôpitaux de l'Amérique du Nord².

Lors de l'étude d'investigation réalisée pour le test BD GeneOhm™MRSA, le taux global de colonisation nasale par le *S. aureus* déterminé par culture (*S. aureus* isolé des échantillons par l'une ou l'autre des techniques de culture) était de 36,1% avec un intervalle de 33 à 40%. Cinquante et un pour cent (51%) des *S. aureus* isolés étaient résistants à la méthicilline d'après la méthode de dépistage sur gélose à l'oxacilline [gélose Mueller-Hinton enrichie d'oxacilline (6 µg/mL) et de NaCl (4% M/V)] correspondant à un taux global de colonisation nasal par le SARM de 18,6%. Avec le test BD GeneOhm™MRSA, le taux global de colonisation nasale par des SARM était de 20,3%.

Caractéristiques de rendement

Sensibilité et spécificité cliniques

Les caractéristiques de performance du test BD GeneOhm™MRSA ont été déterminées lors d'une étude prospective d'investigation dans plusieurs sites : 4 centres médicaux, 2 situés au Canada et 2 aux États-Unis, où étaient déjà implantés des programmes de dépistage de SARM basés sur la culture. Pour être enrôlés dans l'étude, les patients devaient fournir un consentement écrit et être éligibles pour le dépistage de SARM selon les politiques hospitalières, en plus de ne pas avoir reçu une antibiothérapie contre le SARM. Les critères de sélection pour le dépistage étaient entre autres : le dépistage systématique de tous les patients lors de leur admission, l'existence d'antécédents d'infection ou de colonisation par le SARM, le transfert depuis une autre institution de santé, le séjour prolongé en milieu hospitalier ou un historique d'hospitalisation prolongée et la suspicion de contact avec des porteurs de SARM.

La méthode de référence comprenait tout d'abord une analyse de la croissance sur gélose à l'oxacilline succédant à une croissance sélective sur gélose mannitol-sel. Les échantillons négatifs pour SARM ont été soumis à une analyse additionnelle correspondant à une étape d'enrichissement dans un bouillon tryptone soya contenant 6,5% NaCl, suivie par le test de dépistage sur gélose à l'oxacilline. Un échantillon était considéré comme SARM positif en culture s'il était trouvé SARM positif par l'une ou l'autre des techniques de culture. Un échantillon était considéré comme SARM négatif en culture s'il était trouvé SARM négatif pour les deux techniques de culture.

Pour la méthode de dépistage sur gélose mannitol-sel, les géloses ont été inoculées directement avec l'écouvillon nasal avant d'être incubées à 35°C durant 24 à 48 heures. Lorsque nécessaire, les colonies présumées de *S. aureus* ont été repiquées sur des géloses contenant 5% de sang de mouton et incubées 24 à 48 heures à 35°C. Autrement, les colonies isolées ont été analysées directement à partir des géloses mannitol-sel. Les colonies présumées de staphylocoques ont été confirmées à l'aide d'un test d'agglutination au latex ou du test de coagulase en tube. Les colonies de *S. aureus* confirmées ont ensuite été testées sur des géloses Mueller-Hinton enrichies d'oxacilline (6 µg/mL) et de NaCl (4% M/V) et incubées à 33-35°C (sans excéder 35°C) pour 24 heures. Le dépistage de SARM avec une étape d'enrichissement dans un bouillon tryptone soya contenant 6,5% NaCl a également été mené dans les cas où un résultat SARM négatif avait été obtenu avec la méthode de dépistage sur gélose mannitol-sel. Dans ces situations, des bouillons tryptone soya ont été inoculés après l'étalement direct sur gélose mannitol-sel, incubés toute une nuit à 35°C, repiqués sur des géloses contenant 5% de sang de mouton et incubées 24-48 heures à 35°C avant d'être entreposées à 2-8°C pour des analyses ultérieures, si nécessaire. La confirmation des colonies présumées et la détermination de la résistance à la méthicilline ont été réalisées comme décrites précédemment. Dans un site d'investigation, chaque échantillon a été testé avec les deux méthodes de dépistage par culture.

Au total, 786 échantillons nasaux récoltés à l'aide d'écouvillons recommandés avec milieu Stuart liquide (voir Matériel nécessaire mais non fourni) ont été analysés à la fois par la méthode de culture de référence décrite plus haut et par le test BD GeneOhm™MRSA. Comparativement à la méthode de culture de référence, le test BD GeneOhm™MRSA a identifié 92,5% des échantillons trouvés SARM positif par l'une ou l'autre des méthodes de culture et 96,4% des échantillons trouvés SARM négatif par l'une et l'autre des méthodes de culture (Tableaux 1 et 2). Pour la population testée, ces résultats représentent une valeur prédictive négative 98,2% et une valeur prédictive positive de 85,4%.

Tableau 1. Résultats obtenus avec le test BD GeneOhm™MRSA comparativement à la méthode de référence¹.

		BD GeneOhm™MRSA		Total
		Positif	Négatif	
Méthodes de culture	Positif	135	11	146
	Négatif	23	609	632
	Total	158	620	778

¹ Huit (8) échantillons ayant généré un résultat initial non résolu avec BD GeneOhm™MRSA sont demeurés non résolus après reprise du test et n'ont pas été inclus dans ce tableau. Ces 8 échantillons étaient tous négatifs en culture.

Quatorze (14) des 23 échantillons trouvés négatifs en culture mais positifs avec BD GeneOhm™MRSA ont finalement été identifiés comme positifs en culture après une investigation plus poussée, portant le nombre total d'échantillons positifs à la fois en culture et avec BD GeneOhm™MRSA à 149 sur un total d'échantillons positifs en culture de 160. Pour 2 des échantillons positifs en culture et négatifs avec BD GeneOhm™MRSA, aucun des isolats présentant une résistance à la méthicilline sur des géloses Mueller-Hinton enrichies d'oxacilline n'ont pu démontrer la présence du gène *mecA* lorsque analysés avec un test PCR spécifique à *mecA* décrit par Martineau *et al.*⁸.

Tableau 2. Performance du test BD GeneOhm™MRSA obtenue par les sites d'investigation comparativement à la méthode de référence.

	Sensibilité (IC 95%) ¹	Spécificité (IC 95%) ¹	Nombre d'échantillons non résolus ²	Nombre d'analyses invalides/nombre total d'analyses
Site 1	86.8% (n=38) (71.9-95.6%)	99.6% (n=261) (97.9-100%)	6	0/26
Site 2	100% (n=30) (88.4-100%)	98.0% (n=102) (93.1-99.8%)	16	0/21
Site 3	89.3% (n=28) (71.8-97.7%)	90.8% (n=119) (84.1-95.3%)	11	1/15
Site 4	94.0% (n=50) (83.5-98.7%)	94.0% (n=150) (88.9-97.2%)	2	2/27
Total	92.5% (n=146) (86.9-96.2%)	96.4% (n=632) (94.6-97.27%)	35	3/89

¹ Intervalles de confiance binomiaux à 95%.

² Tous les échantillons non résolus l'ont été en raison de la défaillance du contrôle interne, révélateur d'une inhibition de la réaction ou d'une défaillance du réactif. Vingt-sept (27) sur 35 ont été résolus après reprise du test.

La caractérisation de la cassette *SCCmec* des échantillons SARM positifs en culture conformément au protocole proposé par Olivier et de Lencastre⁹ a révélé des échantillons de type I, II et IV. Aucun *SCCmec* de type III n'a été isolé dans cette étude. Cependant, dans une étude connexe, des souches de référence et d'autres isolats cliniques de tous les types ont été testés et détectés avec le test BD GeneOhm™MRSA.

Les performances obtenues par les sites d'investigation pour le test BD GeneOhm™MRSA et pour les techniques de cultures prises individuellement ont été comparées à la méthode de culture de référence (les deux techniques de culture prises ensemble). Ces résultats sont présentés dans les tableaux 3 et 4.

Tableau 3. Résultats obtenus avec le test BD GeneOhm™MRSA et pour chaque technique de dépistage par culture à partir des échantillons trouvés positifs pour SARM par la méthode de culture de référence.

Site	Prévalence de SARM ¹	Sensibilité (IC 95%) ²		
		BD GeneOhm™MRSA	OxaMSA ³	OxaTSB ⁴
Site 1	12.7% (38/300)	86.8% (71.9-95.6%)	81.6% (65.7-92.3%)	ND
Site 2	21.7% (30/138)	100% (88.4-100%)	93.3% (77.9-99.2%)	ND
Site 3	18.9% (28/148)	89.3% (71.8-97.7%)	64.3% (44.1-81.4%)	ND
Site 4	25.0% (50/200)	94.0% (83.5-98.7%)	80.0% (66.3-90.0%)	78.0% (64.0-88.5%)
Total	18.6% (146/786)	92.5% (86.9-96.2%)	80.1% (72.7-86.3%)	ND

¹ Déterminée d'après les résultats obtenus avec la méthode de culture de référence (combinaison de oxaMSA (gélose mannitol-sel avec oxacilline) et oxaTSB (bouillon tryptone soya)).

² Intervalles de confiance binomiaux à 95%.

³ Test de dépistage sur gélose à l'oxacilline après une croissance sélective sur gélose mannitol-sel (MSA).

⁴ Test de dépistage sur gélose à l'oxacilline après un enrichissement en bouillon tryptone soya (TSB) contenant 6,5% NaCl. Le site 4 a testé tous les échantillons avec les deux techniques de culture alors que les autres sites n'ont testé que les échantillons négatifs par la méthode de culture OxaMSA.

Tableau 4. Résultats obtenus avec le test BD GeneOhm™MRSA et pour chaque technique de dépistage par culture à partir des échantillons trouvés négatifs pour SARM par la méthode de culture de référence.

Site	MSSA ¹	Spécificité (IC 95%) ²		
		BD GeneOhm™MRSA	OxaMSA ³	OxaTSB ⁴
Site 1	73/262	99.6% (97.9-100%)	100% (98.6-100%)	ND
Site 2	25/108	98.0% (93.2-99.8%)	100% (96.4-100%)	ND
Site 3	24/120	90.8% (84.1-95.3%)	100% (96.9-100%)	ND
Site 4	16/150	94.0% (88.9-97.2%)	100% (97.6-100%)	100% (97.6-100%)
Total	138/640	96.4% (94.6-97.7%)	100% (99.4-100%)	ND

¹ Nombre de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méthicilline (SASM) dans la population totale de SARM négatifs en culture.

² Intervalles de confiance binomiaux à 95%.

³ Test de dépistage sur gélose à l'oxacilline après une croissance sélective sur gélose mannitol-sel (MSA).

⁴ Test de dépistage sur gélose à l'oxacilline après un enrichissement bouillon tryptone soya (TSB) contenant 6,5% NaCl. Le site 4 a testé tous les échantillons avec les deux techniques de culture alors que les autres sites n'ont testé que les échantillons négatifs par la méthode de culture OxaMSA.

Spécificité analytique

L'ADN génomique de 37 souches enregistrées à l'ATCC représentant des espèces liées phylogénétiquement à *S. aureus* et membres de la flore commensale nasale, de 27 souches (15 souches de référence et 12 isolats cliniques) de staphylocoques coagulase-négative et sensibles à la méthicilline et de 44 souches (2 souches de référence et 42 isolats cliniques) de staphylocoques coagulase-négative et résistants à la méthicilline a été testé. La spécificité a été de 100%.

Tel qu'indiqué dans le tableau 4, 138 échantillons analysés avec les techniques de culture ont été considérés par les sites d'investigation comme contenant des *S. aureus* sensibles à la méthicilline. Sept (7) ont donné des résultats positifs avec le test BD GeneOhm™MRSA. Après une investigation plus poussée à l'aide de techniques plus élaborées, 4 se sont avérés contenir des SARM.

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique (limite de détection) du test BD GeneOhm™MRSA a été déterminée à partir de 7 souches de SARM. Des cultures bactériennes quantifiées et de l'ADN génomique purifié, dilués dans le tampon d'échantillon du test BD GeneOhm™MRSA ont été testés en 5 réplicats. La limite de détection se définit comme étant la plus faible concentration à laquelle au moins 92.5% des réplicats sont positifs.

La limite de détection du test BD GeneOhm™MRSA est de 15 copies de génome par réaction. La limite de détection en terme d'unités formatrices de colonies (UFC) est de 5 UFC/réaction. Si on considère le facteur de dilution lié au traitement préalable de l'échantillon, cette limite de détection correspond approximativement à 325 UFC/écouvillon.

Reproductibilité

Un panel de 10 échantillons simulés contenant des concentrations variables de SARM ainsi que les deux contrôles (positif et négatif) du test BD GeneOhm™MRSA ont été testés en triple, pendant 3 journées différentes en 3 lieux différents (10 échantillons et 2 contrôles testés X 3 X 3 jours X 3 sites). Ces expériences ont été répétées avec 3 lots différents.

Tableau 5. Données cumulées de l'étude de reproductibilité

Échantillon	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Concordance totale	Concordance (%)
Négatif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Négatif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positif faible ¹	19/27	18/27	16/27	53/81	65%
Positif fort	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positif fort	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positif faible ¹	14/27	13/27	18/27	45/81	56%
Positif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positif faible	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Contrôle positif	26/27	27/27	27/27	80/81	99%
Contrôle négatif	26/27	27/27	27/27	80/81	99%
Concordance totale	301/324	301/324	304/324	906/972	93%
Concordance (%)	93%	93%	94%	93%	

¹ Échantillons contenant un nombre d'UFC en dessous de la limite de détection du test.

Deutsch

Vorgesehene Anwendung

Der BD GeneOhm™ MRSA-Test ist ein diagnostischer *In-Vitro*-Test zur direkten qualitativen Detektion einer Kolonisierung durch Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) in der Nase und somit hilfreich bei der Vorbeugung und Kontrolle von MRSA-Infektionen im Gesundheitswesen. Der Test wird an einem Nasenabstrich von potentiell kolonisierten Patienten mit dem SmartCycler® -Instrument durchgeführt. Dabei wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Vervielfachung von MRSA DNA und fluorogenen sequenzspezifischen Hybridisierungs sonden zur Detektion der vervielfachten DNA. verwendet. Der BD GeneOhm™ MRSA-Test ist weder zum Diagnostizieren von MRSA-Infektionen noch als Entscheidungshilfe oder Überwachungsmethode für die Therapie von MRSA-Infektionen vorgesehen. Begleitkulturen sind nur dann notwendig, wenn Organismen für epidemiologische Typenfeststellungen oder weitere Anfälligkeitstests benötigt werden.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Eine Nasenprobe wird mit dem empfohlenen Tupfer mit flüssigem Stuart-Medium genommen und ins Labor gebracht (siehe Erforderliche Materialien die nicht mitgeliefert werden). Zum Testen wird der Tupfer in den Probenpuffer gegeben. Die Probe wird konzentriert und lysiert. Ein Aliquot des Lysats wird zu PCR-Reagenzien hinzugegeben, welche die MRSA-spezifischen Primer enthalten, wodurch die Zielsequenz, falls anwesend, vervielfältigt wird. Der Test beinhaltet auch eine interne Kontrolle (IK) zur Detektion von PCR-hemmenden Proben und zur Funktionskontrolle der Testreagenzien. Amplifizierte Zielsequenzen werden mit Hybridisierungs sonden (Molekular-Beacons) identifiziert die mit emissionsunterdrückten Fluorophoren markiert sind. Die Amplifikation, Detektion und Interpretation der Signale wird automatisch von der Cepheid SmartCycler®-Software ausgeführt. Der gesamte Vorgang dauert etwa 60 bis 75 Minuten, je nach der Anzahl der behandelten Proben. Zur Gewinnung von MRSA für eine epidemiologische Typenfeststellung oder für weitere Antibiotika-Anfälligkeitstests können entsprechende Kulturmedien während der Probenvorbereitung oder bis zu 24 Stunden nach der Vorbereitung angeimpft werden.

S. aureus ist eine Hauptursache von nosokomialen Infektionen. Die meisten Übertragungen finden durch die kontaminierten Hände einer Person statt, welche *S. aureus* trägt. Während *S. aureus* normalerweise in der Nase oder auf der Haut von gesunden Individuen gefunden wird (asymptomatische Träger). Kann es auch Infektionen mit klinischen Anzeichen von Pusteln bis zu Sepsis und Tod hervorrufen¹. Die Behandlung von *S. aureus*-Infektionen ist seit der Erscheinung von Stämmen, welche gegen die bislang wirksamen antimikrobiellen Medikamente resistent sind, zu einer großen Herausforderung geworden. Methicillin-resistente Stämme von *S. aureus* werden oft in medizinischen Einrichtungen gefunden und stellen in einigen nordamerikanischen Krankenhäusern mehr als 50% der Isolate von im Krankenhaus erworbenen *S. aureus* dar². Risikofaktoren für Infektionen durch MRSA in medizinischen Einrichtungen schließen folgendes ein: längere Krankenhaus-Aufenthalte, Nähe zu MRSA infiziert Patienten mit nasalen MRSA Kolonien, um die zu isolierenden Patienten zu identifizieren, kann ein Bestandteil eines wirksamen Programms zur Infektionskontrolle von MRSA darstellen. Die Techniken, welche zurzeit verwendet werden, um MRSA festzustellen, benötigen alle einen Kulturschritt und die Isolierung von reinen Kolonien, gefolgt entweder von Oxacillin-Anfälligkeitstests, der Detektion des *mecA*-Gens, oder der Penicillin-Bindungsproteins (PBP 2a), welches durch das *mecA*-Gen kodiert wird. Mindestens 16 Stunden ist damit die Mindestdauer bis zur Identifizierung eines MRSA-Trägers die Durchschnittszeit beträgt mehr als 48 Stunden. Da sich *S. aureus*-Infektionen sehr rasch ausbreiten können, und zwar besonders in medizinischen Einrichtungen, wo es viele Träger gibt, ist die Möglichkeit, die Ergebnisse über Patienten mit nasalen MRSA Kolonien am Tag der Aufnahme zu erhalten, ein klarer Vorteil für Programme zur Infektionskontrolle.

Prinzip der Durchführung

Nach der Lyse findet die Amplifikation der DANN-Zielsequenz [DNA-Sequenz nahe der Insertionsstelle der Staphylococcus-Kassetten *mec* (SCC*mec*)] statt. Die Amplifikation der internen Kontrolle, eines DNA-Fragments von 335-bp einschließlich einer 277-bp-Sequenz, die in MRSA nicht vorkommt, findet ebenfalls statt, es sei denn, dass PCR-hemmende Substanzen anwesend sind.

Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Molekular-Beacons detektiert; d.h., mit haarnadel förmigen einzelsträngigen Oligonukleotiden, welche an einem Ende mit einem Emissionsunterdrücker (Quencher) und am anderen Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (Fluorophor) markiert sind. Wenn Zielsequenz anwesend ist, öffnet sich die Haarnadelstruktur nach der Beacon/Zielsequenz-Hybridisierung, woraufhin Fluoreszenz emittiert wird. Zur Feststellung von MRSA-Amplikons enthält der Molekular-Beacon das Fluorophor FAM am 5'-Ende und das nicht fluoreszierende Quencher Element DABCYL am gegenüberliegenden Ende des Oligonukleotids. Zur Feststellung der IK-Amplikons enthält der Molekular-Beacon das Fluorophor TET am 5'-Ende und den Quencher DABCYL am 3'-Ende. Jeder Beacon/Zielsequenz-Hybride fluoresziert bei einer Wellenlänge, welche für den Fluorophor charakteristisch ist, welches in dem jeweiligen Molekular-Beacon verwendet wird. Die Menge der Fluoreszenz in jedem gegebenen Zyklus oder nach dem Zyklus hängt von der Menge der spezifischen Amplikons ab, die zu diesem Zeitpunkt gebildet sind. Der SmartCycler® überwacht gleichzeitig die Fluoreszenz, welche von jedem Beacon ausgesandt wird, interpretiert alle Daten, und liefert am Ende des Zyklusprogramms die Endresultate (siehe Interpretierung der Ergebnisse).

Reagenzien

BD GeneOhm™ MRSA Test	48 Tests	200 Tests
Probenpuffer (Sample Buffer)	60 x 1 mL	240 X 1mL
Tris-EDTA-Puffer		
Lyseröhrchen (Lysis tube)	50 Röhrchen	200 Röhrchen
Glasperlen		
Master-Mix (Master Mix) (jeweils 8 Reaktionen)	8 Röhrchen	34 Röhrchen
< 0.0005 % DNA-Polymerase-Komplex		
< 0.001% Interne Kontrolle - nicht infektiöse DNA, welche MRSA-Primer-Bindungssequenzen und eine einzigartige Sequenz zur Probenhybridisierung enthalten.		
< 0.002 % Primers		
< 0.002 % Molekular-Proben		
< 0.05 % dATP, dCTP, dGTP, dTTP		

Rinderserum-Albumin

Kohlehydrat

MgCl₂< 0.001 % nicht infektiöse *Staphylococcus epidermidis*-genomische DNA (ATCC 14990)**Kontroll-DNA (Control DNA)**

8 Röhrchen

34 Röhrchen

Tris-EDTA-Puffer

Kohlehydrat

< 0.001 % nicht infektiöse genomische MRSA DNA (ATCC 43300)

Verdünnungspuffer (Diluent)

8 X 700 µL

34 X 700 µL

Tris-HCl-Puffer

MgCl₂(NH₄)₂SO₄

KCl

Vorsichtsmassnahmen**Dieser Test ist nur für den In-Vitro Diagnostik -Gebrauch.**

- Das Kit nicht verwenden, wenn das Sicherheitssiegel an der äußeren Verpackung gebrochen ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbeutel bei Ankunft geöffnet oder beschädigt ist.
- Schutzbeutel mit Master-Mix und Kontroll-DNA nach jedem Gebrauch rasch mit dem Reissverschluß schließen.
- Das Trockenmittel nicht aus dem Master-Mix und den DNA-Beuteln entfernen.
- Reagenzien nicht benutzen, wenn sich im Master-Mix und in den DNA-Beuteln kein Trockenmittel befindet.
- Reagenzien lassen sich nicht zwischen Chargen austauschen.
- Niemals Reagenzien von verschiedenen Röhrchen zusammentun - auch dann nicht, wenn sie aus derselben Charge sind.
- Reagenzien nicht nach dem Verfallsdatum anwenden.
- Verschlusskappen nicht unter Reagenzien austauschen, da Verunreinigungen auftreten und Testergebnisse gefährden könnten.
- Verunreinigung der Reagenzien durch Mikroben und Deoxyribonuklease (DNase) beim Entfernen von Aliquots aus Röhrchen vermeiden. Der Gebrauch von sterilen, DNase-freien Einweg-Pipettenspitzen mit Filterblockierung oder positiver Verdrängung wird empfohlen.
- Um Verunreinigung der Umgebung durch MRSA-Amplikons zu vermeiden, das Reaktionsröhrchen nach der Verstärkung nicht öffnen.
- Für jede Probe oder Reagenz eine neue Spitze anwenden.
- Das Ausführen der Test außerhalb den empfohlenen Zeitspannen kann ungültige Ergebnisse liefern. Tests außerhalb der angegebenen Zeitspannen sollten wiederholt werden.
- Zusätzliche Kontrollen können getestet werden, je nach den Richtlinien oder Anforderungen von lokalen, staatlichen, provinziellen und/oder Föderations-Vorschriften oder Akkreditierungs-Organisationen.
- In Fällen, in denen das Labor auch PCR-Tests mit offenen Röhrchen ausführt, sollten getrennte und abgeschlossene Arbeitsräume zur Probenvorbereitung und zu Verstärkungs- und Feststellungsaktivitäten angewandt werden. Vorräte und Geräte sollten ausschliesslich zum jeweiligen Arbeitsraum gehören und nicht von einem Raum in den anderen bewegt werden. Es müssen stets Handschuhe getragen und beim Wechsel von einem Raum in einen anderen ausgewechselt werden. Die Handschuhe müssen vor dem Hantieren von lyophilisierten Reagenzien ausgewechselt werden.
- Den Tupfer nicht einfrieren, sondern bei Raumtemperatur aufbewahren. In ungeöffnetem Zustand bleibt der Tupfer bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil.
- Proben immer als infektiös und gemäß den Laborsicherheitsrichtlinien, wie sie in *Biosafety in Microbiological und Biomedical Laboratories*³ und im CLSI - Dokument M29⁴ beschrieben sind, handhaben.
- Bei der Handhabung von Kit-Reagenzien Schutzkleidung und Einweg-Handschuhe tragen. Nach dem Test gründlich die Hände waschen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In Bereichen, wo Proben oder Kit-Reagenzien gehandhabt werden, nicht essen, trinken oder rauchen.
- Nicht verwendet Reagenzien und Abfälle im Einvernehmen mit Landes-, Föderations-, Provinz-, Staats- und lokalen Vorschriften entsorgen.

Mitgelieferte Materialien

- Probenpuffer (*Sample Buffer*)
- Lyseröhrchen (*Lysis tube*)
- Mater-Mix (*Master Mix*)
- Kontroll-DNA (*Control DNA*)
- Verdünnungspuffer (*Diluent*)
- SmartCycler®- Reaktionsröhrchen, 25 µL
- Proben-Identifizierungsetiketten

Lagerung, Handhabung und Stabilität

Gesammelte Proben

Proben sollten während dem Transport zwischen 2°C und 30°C aufbewahrt werden. Vor Gefrieren und vor zu hohen Temperaturen schützen.

Proben mit Anzeichen von potentiellen Störsubstanzen (z.B. Blut, überschüssige Nasensekretionen usw.) sollten innerhalb von 24-36 Stunden getestet werden. Ansonsten können Proben vor dem Testen bis zu 5 Tage lang bei 2-8°C aufbewahrt werden. Proben, welche innerhalb von 36 Stunden getestet werden können, dürfen bei Raumtemperatur (15-30°C) aufbewahrt werden.

Reagenzien

Hinweis: Während der Lagerung müssen die Reagenzien stets **vor Licht und Feuchtigkeit geschützt sein**. Röhrchen außerhalb des Schutzbeutels, welche nicht innerhalb der angegebenen Zeit verwendet werden, sollten verworfen werden.

Kitbestandteil		Master Mix und Control DNA (weiße und rote Streifenetiketten)	Lysis tube (gelber Verschluss)	Sample Buffer, und Diluent (blauer Verschluss, und schwarzes Bandetikett)
Versiegelter Beutel	Temperatur	2-25 °C	2-25 °C	2-25 °C
	Stabilität	Verfallsdatum	Verfallsdatum	Verfallsdatum
Geöffneter Beutel ¹	Temperatur	2-8 °C	2-25 °C ²	2-25 °C ²
	Stabilität	1 Monat ³	Verfallsdatum	2 Monate ³

¹ Wenn das Originalsiegel am Beutel aufgebrochen ist, den Beutel nach jedem Gebrauch sorgfältig mit dem Reissverschluss verschliessen und bei der richtigen Temperatur aufbewahren.

² Obwohl diese Reagenzien bei Raumtemperatur aufbewahrt werden können, sollten sie mit ihren begleitenden Reagenzien von derselben Charge bei 2-8°C aufbewahrt werden.

³ Falls der Beutel nach jedem Gebrauch richtig mit dem Reissverschluss verschlossen wird.

Kitbestandteile außerhalb des Schutzbeutels			Master Mix und Control DNA (weiße und grüne Streifenetiketten)
Nicht wiederhergestellte Röhrchen		Temperatur	15-25 °C
		Stabilität	2 Stunden
Rekonstituierte Röhrchen ¹	Original-Behälter	Temperatur	2-8 °C
		Stabilität	3 Stunden
	SmartCycler® - Reaktionsröhrchen	Temperatur	2-8 °C
		Stabilität	1 Stunde

¹ Unverwandte Röhrchen nach Ablauf der Verzögerung verwerfen.

Materialien, welche benötigt, aber nicht mitgeliefert werden

- **BBL™ CultureSwab™ Liquid Stuart** (Becton Dickinson, Katalog-Nr. 220099), **Copan Transystem™ Liquid Stuart** (Copan Italia International, Katalog-Nr. 141C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Liquid Stuart** (Copan Diagnostics Inc., Katalog-Nr. 141C.US), **HealthLink TransPorter™ Liquid Stuart Single** (HealthLink, Katalog-Nr. 4432)
- **BBL™ CHROMagar™ Staph aureus** Katalog-Nr. 214982, **Mannitol Salz-Agar (MSA)** Katalog-Nr. 221773 oder 221271 oder äquivalente Medien (optional)
- **Vortex** Genie 2 (Fisher) mit 1.5 mL Mikroröhrchenhalter oder ähnlichem; zum Bearbeiten von mehrfachen Proben, Adapter mit mehrfachen Halterungen können angewandt werden
- **Mikropipetten** (Genauigkeit zwischen 1-10 µL, 10-100 µL und 100-1000 µL)
- **Sterile DNase-freie Mikropipettenspitzen** mit Filterblockierung oder positiver Verdrängung
- **Sterile Feinspitzen-Transferpipetten** (z.B. VWR Katalognummern 14670-329, 14670-332) oder extralange sterile DNase-freie filterblockierte Spitzen 1250 µL (z.B. MATRIX Katalognummer 8255)
- **Scheren**
- **Gaze**
- Einweg- **Handschuhe**, ungepudert
- **Mikrozentrifuge** für Hochgeschwindigkeits- (muss 14 000 x g erreichen) und Niedrig-Geschwindigkeits-Zentrifugation
- **Heizblock** für 1.5 mL -Röhrchen oder Wasserbad
- Eis oder **Kühlblock** für 1.5 mL -Röhrchen
- Verschlusssentferner (z.B. MATRIX Katalognummer 4469) (optional)
- Stoppuhr oder **Timer**
- **SmartCycler® Startersystem** mit **Diagnostik-Software** (PCR-block, Gebrauchsanleitung, Zusatzteile, und Desktop-Computer) (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)

Gebrauchsanweisungen

Probensammlung

Um eine passende Probe zu erhalten, muss das Arbeitsverfahren zur Probensammlung genau befolgt werden.

Mit dem empfohlenen Tupfer mit flüssigem Stuart-Medium (siehe Materialien, welche benötigt, aber nicht mitgeliefert werden) werden Nasenproben nach dem folgenden Verfahren genommen:

1. Den Tupfer mit zwei Tropfen (etwa 50 µL) von sterilem physiologischem Serum (Salzlösung) anfeuchten, oder trocken anwenden.
2. Den Tupfer vorsichtig in das Nasenloch des Patienten einschieben (**die Tuferspitzte muss bis zu 2.5 cm (1 Zoll) von der Kante des Nasenflügels eingeführt werden**).
3. Den Tupfer 5 mal drehen.
4. Denselben Tupfer in das zweite Nasenloch einführen und die Probeentnahme-Schritte **2 und 3 wiederholen**.
5. Den Tupfer in seinen Behälter zurücktun.
6. Den Behälter identifizieren.
7. Die Tupfer im gemäß den Standard-Arbeitsverfahren des Krankenhauses zum Labor transportieren.
8. Für Lagerung und Handhabung den Abschnitt "Lagerung, Handhabung und Stabilität – Gesammelte Proben" lesen.

Probenvorbereitung

Hinweis: Ein **Sample Buffer-Röhrchen (Probenpuffer, blauer Verschluss)** und ein **Lysis tube (Lyseröhrchen, gelber Verschluss)** werden für jede Probe, die getestet werden soll, benötigt. Ausserdem wird für jede Gruppe von 20 zu testenden Proben ein weiteres Sample Buffer-Röhrchen (**blauer Verschluss**) benötigt. **Die benötigte Anzahl von Röhrchen aus dem Schutzbeutel entnehmen**, überschüssige Luft hinausdrücken und den Beutel rasch mit dem Reissverschluss schliessen.

Für Details zur Kultur von klinischen Proben (Tupfer) vor der Ausführung des BD GeneOhm™ MRSA-Tests bitte den Abschnitt "Kultur von klinischen Proben, Ausstrichmethode" lesen.

1. **Den Tupfer in ein Probenpuffer-Röhrchen geben (blauer Verschluss).**
Den Probenpuffer auf dem Verschluss und/oder dem Röhrchenetikett identifizieren.
2. **Den Tupferstab brechen und das Röhrchen fest verschliessen.**
Den Tupfer am Stab nahe dem Röhrchenrand halten (Gaze anwenden, um das Risiko von Verunreinigung auf ein Mindestmass zu halten). Den Tupfer ein paar Millimeter vom Boden abheben und den Stab gegen den Rand des Röhrchens drücken, um ihn zu brechen. Alternativmethode: Den Stab mit sauberen Scheren durchschneiden. Sicherstellen, dass der Verschluss dicht schliesst.
3. **Vortex: 1 Minute bei maximaler Drehzahl.**

Um mehrfache Proben zu bearbeiten, kann man Adapter mit Mehrfachhalterungen anwenden.

4. Die gesamte Zellsuspension in ein Lyseröhrchen transferieren (gelber Verschluss).

Mit einer sterilen Feinspitzen-Transferpipette oder einer P-1000 Mikropipette mit einer verlängerten Spitze transferieren. Für Details zum Kultivieren von klinischen Proben mit dem verbliebenen Tupper beziehen Sie sich bitte auf den Abschnitt "Kultivieren von klinischen Proben, Bereicherungsbrühe" auf Seite 10.

5. Bei hoher Drehzahl (zwischen 14 000 x g und 21 000 x g) für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugieren.

6. Den Überstand entfernen und verwerfen.

Eine sterile Feinspitzen-Transferpipette anwenden; aufpassen das Pellet nicht berührt wird. Für jede Probe eine neue Transferpipette anwenden.

7. 50 µL Probenpuffer zum Lyseröhrchen hinzugeben; fest verschließen.

Für jede Probe eine neue Pipettenspitze anwenden. Ein Probenpuffer-Röhrchen reicht zur Bereitung von 20 Proben aus. Für mehr als 20 Proben so viele Probenpuffer-Röhrchen wie nötig verwenden (die unverwendete Pufferlösung für spätere Schritte des BD GeneOhm™ MRSA Testsatz-Vorganges behalten).

8. Vortex: für 5 Minuten bei maximaler Drehzahl.

Um mehrere Proben zu bearbeiten, kann man Adapter mit mehrfachhalterungen anwenden.

9. Das Lyseröhrchen kurz zentrifugieren (Quick-Spin).

Bei niedriger Drehzahl für 2 bis 5 Sekunden; um den Inhalt auf den Boden des Röhrchens zu bringen.

10. Bei 95 ± 2 °C zwei (2) Minuten lang erhitzen.

Einen Heizblock für 1.5 mL -Röhrchen oder ein Wasserbad anwenden.

11. Das Lyseröhrchen auf Eis oder auf einem Kühlblock halten.

Lysate sind bis zu 4 Stunden lang bei 2-8 °C stabil. Wenn die Lysate am Ende dieser Zeit noch nicht verwendet wurden, bei -20 ± 5 °C zum späteren Gebrauch aufbewahren.

BD GeneOhm™ MRSA-Testvorgang

Hinweis: Ein rekonstituiertes Röhrchen Master-Mix (Master Mix , weißes Etikett) enthält genug Reagenzien für **8 Reaktionen**. Für jede zu testende Probe 1 SmartCycler® -Reaktionsröhrchen berechnen, und 2 zusätzliche SmartCycler® -Röhrchen zur positiven und negativen Kontrolle. **Eine (1) positive und eine (1) negative Kontrolle muss bei jedem BD GeneOhm™ MRSA-Testdurchlauf eingeschlossen werden.** Eine Control DNA (Kontroll-DNA, rotes Streifenetikett) wird für jeden Testdurchlauf benötigt. Ein Röhrchen mit *Diluent* (Verdünnungspuffer, schwarzes Streifenetikett) wird zur Wiederherstellung von bis zu 3 Master Mix-Röhrchen benötigt. **Die benötigte Anzahl von Röhrchen aus dem Schutzbeutel nehmen, überschüssige Luft hinausdrücken, und den Beutel rasch mit dem Reissverschluss verschließen.**

Nur soviel SmartCycler®-Reaktionsröhrchen vorbereiten, um die verfügbaren I-CORE®-Module am SmartCycler® zu füllen.

1. Die benötigte Anzahl von Master Mix-Röhrchen auf Eis oder auf einen Kühlblock für 1.5 mL -Röhrchen stellen.

2. 225 µL Verdünnungspuffer (schwarzes Streifenetikett) zu jedem Master Mix-Röhrchen hinzugeben.

Die Mikropipettenspitze durch das Septum am Verschluss des Master Mix-Röhrchens einschieben. Die Spitze nicht zu tief in den Verschluss einschieben. Das Verdünnungspuffer einspritzen. Das nicht verwendete Verdünnungspuffer anschließend verwerfen.

3. Vortex für 5-10 Sekunden.

4. Die benötigte Anzahl von SmartCycler® -Reaktionsröhrchen auf den SmartCycler® -Kühlblock stellen.

Ein SmartCycler® -Reaktionsröhrchen pro Probe und zwei weitere SmartCycler® -Reaktionsröhrchen für die Kontrollen berechnen. **Die optischen Detektionsfenster an den Unterkanten des Reaktionsröhrchen und die untere diamantformige Fläche nicht berühren.**

Die folgenden Schritte MÜSSEN innerhalb von einer Stunde ausgeführt werden:

5. 25 µL der wiederhergestellten Master-Mix zum SmartCycler® -Reaktionsröhrchen hinzugeben.

Das Septum vor dem Pipettieren der Reagenzien abnehmen. Die Flüssigkeit in den Reservebehälter (oberer Teil) der SmartCycler®-Reaktionsröhrchen geben. Die SmartCycler®-Reaktionsröhrchen auf dem Verschluss identifizieren. Man kann Probenidentifizierungsetiketten anwenden (mit dem Kit mitgeliefert). Unverwendete Master-Mix, welche **sofort bei 4-8 °C für maximal 3 Stunden** aufbewahrt wird, kann bei Bedarf für das sofortige Wiedertesten von ungelösten Proben angewandt werden. Die unverwendete Master-Mix nach dieser Zeit verwerfen.

6. 2.8 µL von jeder lysierten Probe in ein anderes, vorher gefülltes SmartCycler®-Reaktionsröhrchen geben; die Reaktionsröhrchen verschließen.

Beim Pipettieren aus dem Lyseröhrchen keine Glassperlen mit aufnehmen. Nach der Zugabe der Probe 2-3 mal im Vorratsbehälter auf- und abwärts pipettieren, um die Übergabe des Gesamtvolumens sicherzustellen. Für jede Probe eine neue Mikropipettenspitze anwenden.

7. Ein Kontroll DNA-Röhrchen (rotes Streifenetikett) auf Eis oder in einen Kühlblock für 1.5 mL -Röhrchen stellen.

8. 225 µL Probenpuffer (blauer Verschluss) zum Kontroll DNA-Röhrchen hinzugeben.

Das Probenpuffer-Röhrchen aus Schritt 7 vom Probenvorbereitungs-Protokoll verwenden. Die Mikropipettenspitze durch das Septum am Verschluss des control DNA-Röhrchens einschieben. Die Spitze nicht zu tief in den Verschluss einschieben. Den Probenpuffer einspritzen.

9. Vortex für 5-10 Sekunden.

10. 2.8 µL der wiederhergestellten Kontroll-DNA in das vorletzte SmartCycler® -Reaktionsröhrchen (positive Kontrolle) geben und verschließen.

Nach der Zugabe der DNA 2-3-mal im Vorratsbehälter auf- und abwärts pipettieren, um die Übergabe des Gesamtvolumens sicherzustellen. Als die positive Kontrolle identifizieren. Unverwendete Kontroll-DNA, welche **sofort bei 4-8 °C maximal 3 Stunden lang aufbewahrt wird**, kann im Falle von sofortigem erneutem Testen von ungelösten Proben zur Vorbereitung einer Kontroll-DNA verwendet werden.

11. 2.8 µL des Probenpuffer (blauer Verschluss) in das letzte SmartCycler® -Reaktionsröhrchen (negative Kontrolle) geben und verschließen.

Das Probenpuffer-Röhrchen aus Schritt 7 vom Probevorbereitungs-Protokoll anwenden. Dieses Röhrchen überwacht die PCR-Verunreinigung, welche während der Manipulierung der Proben möglicherweise stattfindet. Als die negative Kontrolle identifizieren. Den unverwendeten Probenpuffer danach verworfen.

12. Alle Reaktionsröhrchen 5-10 Sekunden lang zentrifugieren.

Die speziell angepasste Mikrozentrifuge verwenden, welche mit dem SmartCycler® -Instrument geliefert wurde.

13. Die Reaktionsröhrchen bei 2-8 °C auf dem SmartCycler®-Kühlblock halten, bevor man sie ins Instrument einlädt.

Die restlichen Lysate sollten, falls nötig, zum späteren Gebrauch bei -20 ± 5 °C eingefroren werden.

14. Den SmartCycler® auf das BD GeneOhm™ MRSA -Testprotokoll einstellen.

Beziehen Sie sich bei Bedarf auf die SmartCycler® Dx-Software-Gebrauchsanleitung. Sie sollten die Identifizierungsparameter für die Proben eingeben, bevor Sie den Durchlauf starten.

15. Jedes Reaktionsröhrchen in ein I-CORE® -Modul des SmartCycler® einschieben und den I-CORE®-Deckel schließen.

Die positiven und negativen Kontrollen in ihren richtigen Positionen einschieben (siehe den Abschnitt "Qualitätskontrolle"). Sämtliche Röhrchen fest an ihren Platz drücken.

16. Den Lauf starten.

Qualitätskontrolle

Positive und negative Kontrollen

Qualitätskontrollvorgänge sind dazu entwickelt, die Leistung des Testsatzes zu überwachen. Die positive Kontrolle ist dazu gedacht, wesentliche Reagenzdefekte zu überwachen. Die negative Kontrolle wird dazu angewandt, Verunreinigungen in den Reagenzien oder der Umgebung (oder Verschleppungen) von entweder MRSA-DNA oder MRSA-Amplifikons festzustellen. Positive und negative Kontrollen sind Testsatz-Kontrollen (Durchlauf-Kontrollen). Eine ungültige Kontrolle macht den Durchlauf ungültig. Und schließlich ist eine interne Kontrolle, welche in jede Reaktionsmischung eingearbeitet ist, dazu gedacht, PCR-Hemmung und Reagenzintegrität in jeder Probe zu überwachen.

Eine positive Kontrolle und eine negative Kontrolle müssen bei jedem Lauf am SmartCycler® mitlaufen. Die Software weist automatisch die Positionen der Kontrollen am Instrument an (siehe die SmartCycler® Dx -Software-Gebrauchsanleitung).

Proben-Verarbeitungskontrollen

Kontrollstämme können nach den Richtlinien oder Anforderungen von lokalen, staatlichen und/oder Bundes-Vorschriften oder akkreditierenden Organisationen getestet werden. Ein Referenz-MRSA-Stamm (z.B. Amerikanische Typen-Kultur-Sammlung, ATCC 43300) oder ein gut charakterisiertes klinisches MRSA-Isolat kann als eine Probenverarbeitungskontrolle angewandt werden, während eine Kultur von Methicillin-empfindlichen *Staphylococcus aureus* (z.B. ATCC 29213) oder von jeglicher sonstigen nicht-*Staphylococcus aureus*-Art (z.B. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990) als eine externe negative Kontrolle angewandt werden kann.

Isolierte Kolonien von einer 18- bis 24-h 5%-Schafsblut-Agarplatte (z. B. BBL™ Tryptikase-Soja-Agar (TSA II) mit 5 % Schafsblut, BD, Katalog-Nr. 221239 oder 221261) in Salzlösung bis zu einer Trübung von 0.5 McFarland (~1.5 X 10⁸ CFU/mL) neu suspendieren. Mit Salzlösung verdünnen, um eine Suspendierung von ~10⁵ CFU/mL zu erhalten. Den empfohlenen Tupfer mit flüssigem Stuart-Medium (siehe Materialien, welche benötigt, aber nicht mitgeliefert werden) in die bakterielle Suspendierung tauchen, die überschüssige Flüssigkeit ausdrücken, den Tupfer in seinen Behälter zurücktun (um Kontakt mit dem Transportmedium zu ermöglichen), und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen lassen. Als klinische Probe verarbeiten und testen (beziehen Sie sich auf die Abschnitte "Probenvorbereitung" und "BD GeneOhm™ MRSA-Testvorgang"), einschließlich Kontrollen. Sämtliche Proben und Kontrollen sollten gültige Ergebnisse liefern (keine ungültige positive oder negative Kontrolle und keine fehlgeschlagene interne Kontrolle).

Zur generellen QC-Anleitung kann der Anwender sich auch auf CLSI MM3⁵ und C24⁶ beziehen.

Kultivierung von klinischen Proben

Um antimikrobielle Anfälligkeitstests oder epidemiologische Typenbestimmung auszuführen, kann man klinische Proben an zwei verschiedenen Stellen des BD GeneOhm™ MRSA-Testvorgangs kultivieren. Man kann sie vom Sammelgerät (Tupfer) mit der Ausstrichmethode kultivieren, bevor man die Analyse mit dem BD GeneOhm™ MRSA durchführt, oder vom Tupfer mit einem Anreicherungs-schritt, nach dem Probevorbereitungsvorgang.

Ausstrichmethode

Diese Kulturmethode kann vor dem Probenvorbereitungsvorgang für den BD GeneOhm™ MRSA angewandt werden.

1. Den Tupfer aus seinem Behälter nehmen.
2. Eine Mannitol-Salzagar (MSA) –Platte inokulieren, indem man auf das erste Viertel der Platte streicht.
3. Den Tupfer in seinen Behälter zurückgeben oder in ein BD GeneOhm™ MRSA Probenpuffer-Röhrchen (blauer Verschluss) brechen, und nach den Anweisungen in dem Abschnitt "Probenvorbereitung" weiter fortfahren.
4. Mit einer Schlaufennadel das Inokulat auf die restlichen Viertel der MSA-Platte verteilen.
5. Die MSA-Platte 24-48 Stunden bei 35 °C inkubieren.
6. *S. aureus* -Kolonien identifizieren und bestätigen, und mit Standardmethoden auf Methicillin-Resistenz testen.

Kultivierung im Anreicherungsmedium

Man kann diese Kulturmethode mit Tupfern anwenden, die nach dem Transfer der Zellsuspension ins Lyseröhrchen noch im Probenpuffer-Röhrchen sind. Tupfer können vor dem Kultivieren bis zu 24 Stunden lang bei 2-8°C in einem geschlossenen Probenpuffer-Röhrchen aufbewahrt werden; ein Rückgewinn ist bei klinischen Proben mit geringen Mengen von MRSA eventuell nicht erfolgreich.

1. 1.0 mL Anreicherungsmedium zu dem Probenpuffer-Röhrchen hinzugeben, welches den Tupfer enthält.
TSB (tryptische Sojabrüh plus 6.5% NaCl) versetzt ist, wird vorgeschlagen.
2. 24-48 Stunden bei 35 °C inkubieren.
3. Subkultur auf einem angebrachten festen Medium 24-48 Stunden lang bei 35 °C durchführen.
Eine 5%ige Schafsblood-Agarplatte wird vorgeschlagen.
4. *S. aureus* -Kolonien identifizieren und bestätigen, und nach Standardmethoden auf Methicillin-Resistenz testen.

Interpretierung der Ergebnisse

Der Entscheidungsalgorithmus für den BD GeneOhm™ MRSA-Testsatz ist in der SmartCycler® -Software eingebettet. Die Interpretierung der Testergebnisse wird nach den folgenden Kriterien durchgeführt:

Berichtetes Testergebnis	Berichtetes IK-Ergebnis	Interpretation des Ergebnisses ¹
NEG (NEG)	PASS (BESTANDEN)	Keine MRSA-DNA festgestellt, MRSA-Nasenkolonisierung unwahrscheinlich
POS (POS)	NA (ENTFÄLLT)	MRSA-DNA festgestellt, MRSA-Nasenkolonisierung
Unresolved (Nicht Aufgeklärt)	FAIL (NITCH BESTANDEN)	Ungelöst—hemmende Probe oder Reagenzdefekt
ND	ND (NITCH BESTIMMT)	Wegen Fehler am des I-CORE®-Moduls nicht festgestellt (mit Warnung oder Fehlercode ²)

IK - Interne Kontrolle; NA – nicht zutreffend; ND – nicht festgestellt

¹BD GeneOhm™ MRSA -Ergebnisse können als Richtlinien bei der Isolierung und der Ebene von Vorsichtsmaßnahmen nach Anstaltsprogrammen und –Methoden angewandt werden

² Bitte beziehen Sie sich auf die SmartCycler® Dx-Software-Gebrauchsanleitung, um die Warnungs- und Fehlercodes zu interpretieren.

Eine ungültige positive oder negative Kontrolle macht den Testlauf ungültig. In solchen Fällen sind die Testergebnisse eines solchen Laufs ungültig und dürfen nicht berichtet werden. Ungültigkeitsfehler beim Testlauf oder Instrumenten-Fehlercodes oder Warnungen werden auf dem Bildschirm und in den Berichten markiert. Vor dem Berichten von MRSA-Ergebnissen immer sicherstellen, dass der Testlauf gültig war.

Bitte beziehen Sie sich für das Ausdrucken der Ergebnisse auf die SmartCycler® Dx-Software-Gebrauchsanleitung.

Ungültiger Testlauf

Mit gefrorenem Lysat neue Reaktionsröhrchen für alle klinischen Proben in diesem Testlauf, sowohl als auch neue Kontrollgefäße, anfertigen.

Nicht verwertbare Probe

Den Test mit dem entsprechenden gefrorenen Probelysat wiederholen. Es ist gezeigt worden, dass die Wirkung PCR -hemmender Substanzen durch einen Gefrier-Tauzyklus reduziert wird.

Probe wegen Fehler am I-CORE® -Modul nicht verwertbar

Den Test mit dem entsprechenden gefrorenen Probelysat wiederholen. Bitte beziehen Sie sich zur Interpretierung von Warnungen oder Fehlercode-Nachrichten auf die SmartCycler® Dx-Software-Gebrauchsanweisung.

Einschränkungen des Vorgangs

- Die Leistung dieses Tests wurde mit dem SmartCycler® -Instrument etabliert, und zwar mit Nasenabstrichproben, welche von Krankenhauspatienten oder von Patienten bei der Krankenhausaufnahme entnommen wurden, und mit Proben, welche mit dem Copan® Venturi Transystem mit flüssigem Stuart-Medium entnommen wurden. Daher kann dieses Produkt nur mit dem SmartCycler® angewandt werden; außerdem wird der Gebrauch eines anderen Proben-Sammelungs- oder Transportsystems als jene, welche in der Liste von benötigten und nicht mitgelieferten Materialien aufgeführt werden, nicht empfohlen. Andere klinische Quellen sind nicht bewertet worden, und die Leistungscharakteristiken dieses Tests sind bei anderen Probearten oder Patientenbevölkerungen unbekannt.
- Negative Testergebnisse können auch durch unrichtige Probenentnahme, Handhabung oder Lagerung, die Anwesenheit eines Hemmstoffes, technische Fehler, Probenverwechslungen, oder weil die Anzahl der Organismen in der Probe unterhalb der analytischen Empfindlichkeit liegt, stattfinden. Sorgfältige Befolgung der Anweisungen in dieser Beilage und in der SmartCycler® Dx-Software-Gebrauchsanleitung ist notwendig, um falsche Ergebnisse zu vermeiden. Die Anwendung dieses Tests sollte auf Personal beschränkt sein, welches im Vorgang und im Gebrauch des SmartCycler® geschult ist.

- Obwohl keine Reagenzien vorbereitet werden müssen und die wesentliche technische Durchführung aus Pipettieren besteht, sind gute Labortechniken zur richtigen Funktion dieses Tests unerlässlich. Wegen der hohen analytischen Empfindlichkeit dieses Tests ist auf die Reinheit aller Reagenzien achten, besonders, wenn mehrere Aliquots aus einem Röhrchen entnommen werden.
- Der Screeningtest stellt den Kolonisierungsstatus zu jedem gegebenen Zeitpunkt fest und kann je nach der Patientenbehandlung (d.h., je nach dem Entkolonisierungs-Regime), dem Patientenstatus (z.B., nicht aktiv MRSA abgebend) oder der Exposition in risikoreichen Umgebungen (z.B. Kontakt mit MRSA-Trägern, langer Krankenhausaufenthalt) variieren. Eine Überwachung des Kolonisierungsstatus sollte im Einvernehmen mit den Krankenhausregeln stattfinden.
- Die Ergebnisse des BD GeneOhm™ MRSA-Tests sollten als Hilfe bei der nosokomialen Infektionskontrolle verwendet werden, um Patienten zu identifizieren, bei welchen stärkere Vorsichtsmaßnahmen notwendig sind. Der Test ist nicht dazu vorgesehen, Patienten mit Staphylokokken-Infektionen zu identifizieren. Die Ergebnisse sollten nicht dazu angewandt werden, die Behandlung gegen MRSA-Infektionen anzuleiten oder zu überwachen.
- Ein positives BD GeneOhm™ MRSA-Ergebnis zeigt nicht unbedingt einen Fehlschlag der Therapie an, da DNA weiterhin bestehen kann. Ein negatives Ergebnis nach einem vorhergegangenen positiven Testergebnis kann aufgrund eines Therapieerfolges oder zeitweiligem Abstoß vorkommen.
- BD GeneOhm™ MRSA-Testergebnisse sind manchmal wegen einer ungültigen Kontrolle ungelöst oder ungültig und müssen erneut getestet werden, was zu einer Verzögerung beim Erhalt der Ergebnisse führen kann.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht unbedingt die Anwesenheit von lebensfähigen Organismen an. Es gestattet allerdings die Annahme der Anwesenheit von MRSA, da BD GeneOhm™ MRSA gleichzeitig die SCCmec-Kassette (welche das *mecA*-Gen trägt) und eine *S. aureus*-spezifische Sequenz feststellt, welche sich im *orfX*-Gen befindet. Der BD GeneOhm™ MRSA-Test stellt das *mecA*-Gen und das Penicillini-Bindungsprotein (PBP 2a), welches durch dieses Gen gekodet wird, nicht direkt fest.
- Es ist gezeigt worden, dass der BD GeneOhm™ MRSA-Test verschiedene Typen von MRSA feststellt, welche mit Infektionen verbunden sind, die im Krankenhaus und in der Gemeinde erworben wurden; die Bewertungen machten keine Feststellungen über die phenotypischen oder genotypischen Züge der MRSA-Isolate, um Stämme festzustellen, welche in einer Krankenhausumgebung virulenter sein könnten.
- Mutationen oder Polymorphismen in den Bindungsregionen der Primers oder Proben können die Detektion von neuen oder unbekannten MRSA-Varianten beeinflussen, was mit dem BD GeneOhm™ MRSA®-Test ein negatives Ergebnis liefern könnte.

Störsubstanzen

Potentielle Störsubstanzen können folgendes einschließen, sind aber nicht darauf beschränkt: Blut, überschüssige Nasensekrete / Schleim, abschwellende Medikamente und Substanzen, welche gelegentlich angewandt werden, um Trockenheit und Irritation im Naseninneren zu beheben. Die Anwesenheit von überschüssigen Nasensekreten und Blut kann PCR hemmen und zu ungelösten Ergebnissen führen.

In einer Untersuchungsstudie an 786 Nasenabstrichproben wurden in 43% der gesammelten Proben potentielle Störsubstanzen gefunden. Insgesamt gab es 35 (4.5%) ungelöste Proben. Von diesen 35 Proben wurde in 24 keine potentielle Störsubstanz berichtet, Nasensekrete wurden in 10 Proben berichtet, und eine Kombination von Substanzen wurden in einer Probe berichtet. Siebenundzwanzig (27) Proben wurden nach einem Gefrier-Tauzyklus gelöst. Von 8 Proben, welche nicht gelöst werden konnten, wurde in 4 keine potentielle Störsubstanz beobachtet, Nasensekrete wurden in 3 Proben beobachtet, und eine Kombination von Substanzen wurden in einer Probe beobachtet.

Erwartete Werte

Menschen sind für *S. aureus* ein natürliches Reservoir. Die Kolonisierung kann vorübergehend oder langfristig sein und über Jahre hinweg anhalten. *S. aureus* nasale Trägerraten von 25 bis 30% sind für die allgemeine Bevölkerung berichtet worden, und Raten von 10 bis 40% sind für ambulant behandelte Patienten-Kollektive oder bei Aufnahme ins Krankenhaus berichtet worden⁷. Methicillin-resistente *S. aureus* stellen nunmehr in einigen nordamerikanischen Krankenhäusern 50% der Isolate von im Krankenhaus aufgenommenen *S. aureus* dar².

In der Untersuchungsstudie für den BD GeneOhm™ MRSA-Test lag die gesamte Trägerrate von *S. aureus*, welche durch Kulturen festgestellt wurde (*S. aureus*, welche in Proben durch verschiedene Kulturtechniken festgestellt wurde) bei 36.1% mit einer Spanne von 33-40%. Einundfünfzig Prozent (51%) aller *S. aureus* - Isolate waren nach der Oxacillin-Agar-Methode gegen Methicillin resistent [Mueller-Hinton-Agarplatte, angereichert mit Oxacillin (6 µg/mL) und NaCl (4% w/v)]; die gesamte nasale MRSA –Trägerrate lag bei 18.6%. Mit dem BD GeneOhm™ MRSA-Test lag die gesamte MRSA–nasale Trägerrate bei 20.3%.

Leistungscharakteristika

Klinische Leistung

Die Leistungscharakteristika des BD GeneOhm™ MRSA-Tests wurden in einer prospektiven Multizentrenstudie festgestellt: 4 Zentren, davon zwei in Kanada und zwei in den Vereinigten Staaten, welche bereits kulturbasierende MRSA –Screeningprogramme etabliert hatten. Um an der Studie teilzunehmen, mussten die Patienten ihr schriftliches Einverständnis geben und nach Krankenhausregeln für die MRSA-Screeningtests qualifiziert sein, und keine Antibiotikatherapie gegen MRSA erhalten haben. Die Screeningtest Kriterien beinhalteten folgendes, waren aber nicht unbedingt darauf beschränkt: systematische Auslese aller Patienten bei der Aufnahme ins Krankenhaus, vorherige MRSA-Infektion oder Träger, Einlieferung aus einer anderen Anstalt, langer Krankenhausaufenthalt, oder eine Vorgeschichte von langem Krankenhausaufenthalt und Kontakt mit einem MRSA-Träger.

Die Referenzmethode bestand aus einer Anfangsanalyse mit der Oxacillin-Agar-Platte nach selektiver Zucht auf Mannitol-Salzagar. Proben, welche auf MRSA negativ waren, wurden einer weiteren Analyse unterzogen, welche aus einem Anreicherungs-schritt in tryptischer Sojabrüh (TSB plus 6.5% NaC), gefolgt vom Test auf Oxacillin-Agar-Platten. Eine Probe, welche auf MRSA kulturpositiv war, wurde als eine Probe definiert, welche nach einer der beiden Kulturtechniken auf MRSA positiv war. Eine Probe, welche auf MRSA kulturnegativ war, wurde als eine Probe definiert, welche nach beiden Kulturtechniken auf MRSA negativ war.

Für die Auslesetestmethode mit selektiver Zucht auf Mannitol-Salzagar (MSA) wurden die Platten direkt mit Nasentupfer-Proben inokuliert und danach bei 35°C 24 bis 48 Stunden lang inkubiert. Wo nötig, wurden angenommene Kolonien von *S. aureus* auf 5% Schafsblut-Agarplatten subkultiviert und 24-48 Stunden bei 35°C inkubiert. Ansonsten wurden isolierte Kolonien direkt auf MSA-Platten getestet. Angenommene Staphylokokken-Kolonien wurden mit einem Latex-Agglutinationstest oder einem Röhrchen-Koagulase-Test bestätigt. Bestätigte Kolonien von *S. aureus* wurden auf Mueller-Hinton-Agarplatten getestet, welche mit Oxacillin (6 µg/mL) und NaCl (4% w/v) angereichert waren, und bei 33 bis 35°C (nicht über 35°C) volle 24 Stunden lang inkubiert. MRSA-Screeningtests mit einem Anreicherungsschritt in tryptischer Sojabrühre (TSB) plus 6.5% NaCl, wurde auch in Fällen ausgeführt, bei der mit der MSA-Screeningtest-Methode ein negatives Ergebnis auf MRSA erhalten wurde. Zu diesem Zweck wurden TSB-Brühen nach direktem Ausplätten auf MSA inokuliert, über Nacht bei 35°C inkubiert, auf 5% Schafsblut-Agarplatten 24-48 Stunden lang bei 35°C subkultiviert, und die Platten bei 2-8°C zum Testen, falls benötigt, aufbewahrt. Die Bestätigung von angenommenen Kolonien und die Feststellung der Methicillin-Resistenz wurden wie oben beschrieben ausgeführt. An einer Untersuchungsstelle wurden sämtliche Proben mit beiden Kultur-Screeningtestmethoden getestet.

Insgesamt wurden 786 Nasenabstrichproben, welche mit dem empfohlenen Tupfer mit flüssigem Stuart-Medium entnommen wurden (siehe erforderliche Materialien die nicht mitgeliefert werden), mit der oben beschriebenen Kultur-Referenzmethode und mit dem BD GeneOhm™ MRSA-Testkit auf MRSA getestet. Im Vergleich zu der Kultur-Referenzmethode identifizierte der BD GeneOhm™ MRSA-Kit 92.5% aller Proben als MRSA-positiv (mit einer der Kulturtechniken) und 96.4% aller Proben als negativ (mit beiden Kulturtechniken – siehe Tabellen 1 und 2). In der getesteten Bevölkerung ergibt das einen negativen Vorhersagewert von 98.2% und einen positiven Vorhersagewert von 85.4%.

Tabelle 1. Ergebnisse, welche mit dem BD GeneOhm™ MRSA-Test erhalten wurden, im Vergleich mit der Referenz-Methode¹.

		BD GeneOhm™ MRSA		Gesamt
		Positiv	Negativ	
Kultur-Techniken	Positiv	135	11	146
	Negativ	23	609	632
	Gesamt	158	620	778

¹ Acht (8) Proben, welche zunächst ungelöst waren, blieben nach erneutem Testen mit dem BD GeneOhm™ MRSA-Test ungelöst und sind nicht in der Tabelle eingeschlossen. Alle 8 waren kulturnegativ.

Vierzehn (14) von 23 kulturnegativen Proben, welche aber BD GeneOhm™ MRSA-positiv waren, wurden bei Untersuchungen auch als MRSA-kulturpositiv befunden, was zu einer Gesamtzahl von 149 kulturpositiven und BD GeneOhm™ MRSA-positiven Proben von insgesamt 160 kulturpositiven Proben führte. Bei 2 Proben, welche kulturpositiv aber BD GeneOhm™ MRSA-negativ waren, war es nicht möglich, bei einem Isolat, welches auf Oxacilin-Agarplatten eine Resistenz gegen Methicillin zeigte, den *mecA*-Gen festzustellen; dies wurde durch den *mecA*-spezifischen PCR-Test festgestellt, der von Martineau *et al.*⁸ beschrieben wird.

Tabelle 2. Leistungen des BD GeneOhm™ MRSA-Tests, welche im Vergleich zu der Referenzmethode von den Forschungsstellen erhalten wurden

	Empfindlichkeit (95% CI) ¹	Spezifität (95% CI) ¹	Anzahl der nicht verwertbaren Proben ²	Ungültige/ Gesamt- anzahl der Durchläufe
Stelle 1	86.8% (n=38) (71.9-95.6%)	99.6% (n=261) (97.9-100%)	6	0/26
Stelle 2	100% (n=30) (88.4-100%)	98.0% (n=102) (93.1-99.8%)	16	0/21
Stelle 3	89.3% (n=28) (71.8-97.7%)	90.8% (n=119) (84.1-95.3%)	11	1/15
Stelle 4	94.0% (n=50) (83.5-98.7%)	94.0% (n=150) (88.9-97.2%)	2	2/27
Gesamt	92.5% (n=146) (86.9-96.2%)	96.4% (n=632) (94.6-97.27%)	35	3/89

¹ Binomiale 95% Sicherheits-Intervalle.

² Sämtliche Proben waren wegen fehlgeschlagenen internen Kontrollen ungelöst, was Inhibitoren oder Reagenziendefekte anzeigt. Siebenundzwanzig (27) von 35 wurden nach erneutem Testen gelöst.

SCCmec –Typenidentifizierung von MRSA-kulturpositiven Proben nach Oliveira und de Lencastre⁹ zeigte Proben der Typen I, II und IV. Es wurden in der Studie keine SCCmec Typ III-Proben isoliert. In einer getrennten Studie wurden allerdings Stämme und andere klinische Isolate von allen SCCmec –Typen mit dem BD GeneOhm™ MRSA-Test getestet und festgestellt.

Die Leistungen, welche von den Forschungsstellen für BD GeneOhm™ MRSA festgestellt wurden, und die individuellen Kulturtechniken im Vergleich zu der Kulturreferenz-Methode (beide Kulturtechniken) werden in Tabellen 3 und 4 dargestellt.

Tabelle 3. Ergebnisse, welche für den BD GeneOhm™ MRSA-Test und jede Kulturauslesetechnik mit Proben erhalten wurden, welche mit der Kulturreferenz-Methode auf MRSA positiv waren.

Stelle	MRSA -Prävalenz ¹	Empfindlichkeit (95% CI) ²		
		BD GeneOhm™ MRSA	OxaMSA ³	OxaTSB ⁴
Stelle 1	12.7% (38/300)	86.8% (71.9-95.6%)	81.6% (65.7-92.3%)	ND
Stelle 2	21.7% (30/138)	100% (88.4-100%)	93.3% (77.9-99.2%)	ND
Stelle 3	18.9% (28/148)	89.3% (71.8-97.7%)	64.3% (44.1-81.4%)	ND
Stelle 4	25.0% (50/200)	94.0% (83.5-98.7%)	80.0% (66.3-90.0%)	78.0% (64.0-88.5%)
Gesamt	18.6% (146/786)	92.5% (86.9-96.2%)	80.1% (72.7-86.3%)	ND

¹ Festgestellt mit Ergebnissen, welche mit der Kulturreferenz-Methode erhalten wurden (Kombination von OxaMSA und OxaTSB)² Binomiale 95% Sicherheits-Intervalle.³ Oxacillin-Auslese-Agartest nach selektivem Wachstum auf MSA⁴ Oxacillin-Auslese-Agartest nach Anreicherung in TSB mit 6.5% NaCl. Stelle 4 testete sämtliche Proben mit beiden Kulturtechniken, während die anderen Stellen nur Proben testete, welche mit der OxaMSA –Kulturmethode negativ waren.**Tabelle 4.** Ergebnisse, welche mit dem BD GeneOhm™ MRSA-Test und jeder Kulturauslesetechnik erhalten wurden, mit Proben, welche nach den Kultur-Referenzmethode auf MRSA negativ waren.

Stelle	MSSA ¹	Spezifität (95% CI) ²		
		BD GeneOhm™ MRSA	OxaMSA ³	OxaTSB ⁴
Stelle 1	73/262	99.6% (97.9-100%)	100% (98.6-100%)	ND
Stelle 2	25/108	98.0% (93.2-99.8%)	100% (96.4-100%)	ND
Stelle 3	24/120	90.8% (84.1-95.3%)	100% (96.9-100%)	ND
Stelle 4	16/150	94.0% (88.9-97.2%)	100% (97.6-100%)	100% (97.6-100%)
Gesamt	138/640	96.4% (94.6-97.7%)	100% (99.4-100%)	ND

¹ Anzahl von MSSA in der gesamten MRSA-kulturnegativen Bevölkerung² Binomiale 95% Sicherheits-Intervalle.³ Oxacillin-Auslese-Agartest nach selektivem Wachstum auf MSA⁴ Oxacillin-Auslese-Agartest nach Anreicherung in TSB mit 6.5% NaCl. Stelle 4 testete sämtliche Proben mit beiden Kulturtechniken, während die anderen Stellen nur Proben testeten, welche mit der OxaMSA –Kulturmethode negativ waren.

Analytische Spezifität

Genomische DNA von 37 Spezies (ATCC-Stämmen), die phylogenetisch mit *S. aureus* und Mitgliedern der Nasen-Begleitflora verwandt sind, 27 Stämme (15 Bezugsstämme und 12 klinische Isolate) von Methicillin-empfindliche koagulase-negativen Staphylococci und 44 Stämme (zwei Bezugsstämme und 42 klinische Isolate) von Methicillin-empfindliche koagulase-negativen Staphylococci wurden getestet. Die Spezifität war 100%.

Wie in Tabelle 4 angezeigt, wurden in 138 Proben, welche mit Kulturtechniken analysiert wurden, von Untersuchungsstellen Methicillin-empfindliche *S. aureus* festgestellt. Sieben (7) ergaben mit dem BD GeneOhm™ MRSA-Test positive Ergebnisse. Nach weiterer Untersuchung mit besseren Kulturtechniken wurde in 4 Proben die tatsächliche Anwesenheit von MRSA gezeigt.

Analytische Empfindlichkeit

Die analytische Empfindlichkeit (Detektionsbeschränkung oder LOD) des BD GeneOhm™ MRSA-Tests wurde mit 7 Stämmen von MRSA festgestellt. Quantifizierte Kulturen und gereinigte genomische DNA, verdünnt im Probenpuffer des BD GeneOhm™ MRSA-Tests, wurden in 5 Replikaten getestet. Das LOD wird als die kleinste Konzentration, bei welcher mindestens 92.5% aller Replikate positiv testen, definiert.

Das LOD des BD GeneOhm™ MRSA-Tests ist 15 Genomkopien pro Reaktion. Das LOD in CFU ist 5 CFU/Reaktion. Wenn man den Verdünnungsfaktor wegen der Probenverarbeitung einbezieht, bedeutet das etwa 325 CFU/Tupfer.

Reproduzierbarkeit

Eine Gruppe von 10 simulierten Proben mit verschiedenen Konzentrationen von MRSA und den beiden Kontrollen (positiv und negativ) des BD GeneOhm™ MRSA-Tests wurden dreifach an drei verschiedenen Tagen an jeder von 3 Stellen getestet (10 Proben plus zwei Kontrollen, getestet an X 3 X 3 Tagen X 3 Stellen). Dies wurde mit drei Reagenzchargen wiederholt.

Tabelle 5. Gesammelte Daten der Reproduzierbarkeitsstudie

Proben-ID	Charge 1	Charge 2	Charge 3	Gesamte Übereinstimmung (%)	Proben-ID
Negativ	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Negativ	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Schwach positiv ¹	19/27	18/27	16/27	53/81	65%
Stark positiv	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Stark positiv	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Schwach positiv ¹	14/27	13/27	18/27	45/81	56%
Positiv	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positiv	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Schwach positiv	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positiv	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positive Kontrolle	26/27	27/27	27/27	80/81	99%
Negative Kontrolle	26/27	27/27	27/27	80/81	99%
Gesamte Übereinstimmung	301/324	301/324	304/324	906/972	93%
Gesamte % Übereinstimmung	93%	93%	94%	93%	

¹ Proben mit CFUs unterhalb der Detektionsbeschränkung des Tests.

Español

Indicaciones de uso

La prueba BD GeneOhm™ MRSA es una prueba diagnóstica cualitativa *in vitro* para la detección directa de colonización nasal por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) con el objetivo de ayudar en la prevención y control de infecciones de SARM en entornos sanitarios. La prueba se realiza en un SmartCycler®, con muestra nasal obtenida con torunda de pacientes con riesgo de colonización, y utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para la amplificación de ADN de SARM y sondas de hibridación fluorescentes específicas de la diana que permiten la detección de ADN amplificado. La prueba BD GeneOhm™ MRSA no está concebida para diagnosticar infecciones de SARM ni para orientar o controlar el tratamiento para dichas infecciones. Se requieren cultivos concomitantes únicamente con el fin de obtener microorganismos para tipificación epidemiológica o para la posterior realización de antibiograma.

Resumen y explicación de la prueba

Se obtiene una muestra nasal y se transporta al laboratorio utilizando la torunda recomendada en medio Stuart líquido (consulte la sección Material necesario pero no suministrado). Para el análisis, se coloca la torunda en la solución tampón de muestras. La muestra se concentra y se lisa. Se agrega una alícuota del lisado a los reactivos de PCR que contienen los cebadores específicos de SARM utilizados para amplificar la diana genética, si está presente. La prueba también incluye un control interno (CI) para detectar muestras inhibitorias de PCR y para confirmar la integridad de los reactivos de la prueba. Las dianas amplificadas se detectan con sondas de hibridación marcadas con fluoróforos que no emiten fluorescencia (marcadores moleculares). La amplificación, detección e interpretación de las señales son realizadas automáticamente por el software Cepheid SmartCycler®. El procedimiento completo dura entre 60 y 75 minutos, dependiendo del número de muestras procesadas. La recuperación de células de SARM, a fin de realizar la tipificación epidemiológica o para un antibiograma complementario, es posible gracias a la inoculación de medios de cultivo apropiados. Esto puede hacerse durante la preparación de muestras o en las 24 horas siguientes.

El *S. aureus* es una causa importante de infecciones hospitalarias. La mayoría de las transmisiones ocurren a través de las manos contaminadas de una persona portadora de *S. aureus*. Si bien el *S. aureus* causa infecciones con manifestaciones clínicas que van desde las pústulas hasta sepsis y muerte, se encuentra comúnmente en la nariz o en la piel de personas sanas (portadores asintomáticos). El tratamiento de las infecciones por *S. aureus* se ha convertido en un verdadero reto debido a la aparición de cepas resistentes a antimicrobianos anteriormente efectivos. Las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina se encuentran frecuentemente en entornos sanitarios, y en algunos hospitales norteamericanos representan más del 50% de cepas aisladas de *S. aureus* de infecciones nosocomiales². Los factores de riesgo de infecciones por SARM en entornos sanitarios incluyen las estancias prolongadas en hospitales, la proximidad a pacientes contagiados de SARM, la exposición a tratamientos antibióticos múltiples y prolongados de amplio espectro y la colonización nasal por SARM. La detección sistemática precoz de portadores nasales de SARM para identificar pacientes que requieran aislamiento puede formar parte de un programa eficaz para el control de las infecciones por SARM. Todas las técnicas que se utilizan actualmente para detectar SARM requieren una etapa de cultivo y el aislamiento de colonias puras, seguido de prueba de sensibilidad a la oxacilina, detección del gen *mecA* o detección de la proteína fijadora de penicilina (PBP 2a) codificada por el gen *mecA*. Esto aumenta el tiempo de resolución de la condición de portador de SARM a un mínimo de 16 horas; con un tiempo promedio de más de 48 horas. Con la rapidez con que pueden propagarse las infecciones de *S. aureus*, especialmente en los entornos sanitarios donde son frecuentes los portadores, la capacidad de proporcionar resultados de colonización nasal por SARM el día del ingreso representa sin duda una ventaja para los programas de control de infecciones.

Principio de procedimiento

Después de la lisis, se producirá la amplificación de la diana [secuencia cerca del lugar de inserción de la región cromosómica del gen *mec* de *Staphylococcus aureus* (SCC*mec*)]. También se llevará a cabo una amplificación del CI, un fragmento de ADN de 335-bp que incluye una secuencia de 277-bp que no se encuentra en SARM, a menos que existan sustancias inhibitorias de PCR.

Las dianas amplificadas de ADN se detectan con sondas fluorescentes, oligonucleótidos monocatenarios en forma de horquilla que disponen de un desactivador de fluorescencia (quencher) en un extremo y de un indicador fluorescente (fluoróforo) en el otro. Cuando la diana está ausente, se desactiva la fluorescencia. Cuando la diana está presente, la estructura de horquilla se abre con la hibridación del marcador o de la diana, lo que resulta en la emisión de fluorescencia. Para la detección de amplicones de SARM, el marcador molecular contiene el fluoróforo FAM en el extremo 5' y el fragmento desactivador no fluorescente de DABCYL en el extremo opuesto del oligonucleótido. Para la detección de amplicones de CI, el marcador molecular contiene el fluoróforo TET en el extremo 5' y el fragmento desactivador de DABCYL en el extremo 3'. Cada híbrido diana-marcaador emite fluorescencia a una longitud de onda característica del fluoróforo utilizado en el marcador molecular particular. La cantidad de fluorescencia en cualquier ciclo dado, o en el ciclo siguiente, depende de la cantidad de amplicones específicos presentes en ese momento. El SmartCycler® simultáneamente controla la fluorescencia emitida por cada marcador, interpreta todos los datos y al final del programa del ciclo proporciona un resultado final (véase Interpretación de resultados).

Reactivos

Prueba BD GeneOhm™ MRSA	48 Pruebas	200 Pruebas
Tampón de muestras (Sample Buffer)	60 X 1 mL	240 X 1mL
Solución tampón Tris-EDTA		
Tubo de lisis (Lysis tube)	50 tubos	200 tubos
Perlas de vidrio		
Mezcla maestra (Master Mix) (8 reacciones cada una)	8 tubos	34 tubos
< 0,0005 % Complejo ADN polimerasa		
< 0,001% Control Interno – ADN no infeccioso que contiene secuencias de unión de cebadores-SARM y una secuencia única para hibridación con la sonda.		
< 0,002 % cebadores		
< 0,002 % sondas moleculares		
< 0,05 % dATP, dCTP, dGTP, dTTP		
Albúmina sérica bovina		

Hidrato de carbono

MgCl₂

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

ADN de Control (Control DNA)

8 tubos

34 tubos

Solución tampón Tris-EDTA

Hidrato de carbono

< 0,001 % ADN genómico de SARM no infeccioso (ATCC 43300)

Diluyente (Diluent)

8 X 700 µL

34 X 700 µL

Solución tampón Tris-HCl

MgCl₂

(NH₄)₂SO₄

KCl

Precauciones

Esta prueba es únicamente para diagnóstico *in vitro*.

- No utilizar el kit si el precinto de seguridad de la caja exterior está roto.
- No utilizar los reactivos si las bolsas protectoras están abiertas o desgarradas a su llegada.
- Cierre las bolsas protectoras de las mezclas maestras y ADN de control rápidamente con el cierre deslizante después de cada uso.
- No retirar el desecante de las bolsas de mezcla maestra y de ADN de control.
- No utilizar los reactivos si no hay desecante dentro de las bolsas de mezcla maestra y de ADN de control.
- Los reactivos no son intercambiables entre los lotes.
- No mezcle nunca los reactivos de distintos tubos, incluso si pertenecen al mismo lote.
- No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.
- No intercambie tapas entre los reactivos, ya que puede producirse contaminación que altere los resultados de la prueba.
- Evite la contaminación microbiana y de desoxirribonucleasa (DNAsa) de los reactivos cuando saque las muestras de los tubos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta desechables de desplazamiento positivo o con filtro, esterilizadas y sin DNAsa.
- Para evitar la contaminación del medio con amplicones de SARM, no abra los tubos de reacción después de la amplificación.
- Utilice una nueva punta para cada muestra o reactivo.
- El realizar la prueba fuera de los intervalos de tiempo recomendados puede invalidar los resultados. Las pruebas que no hayan sido realizadas dentro de los intervalos de tiempo especificados deben repetirse.
- Pueden examinarse controles adicionales de acuerdo con las pautas o requisitos del reglamento local, estatal, provincial y/o federal o de organizaciones acreditadoras.
- En los casos en que el laboratorio realiza también las pruebas de PCR con tubos abiertos, deben utilizarse zonas de trabajo separadas y aisladas para las actividades de preparación de muestras y amplificación / detección. Los suministros y el equipo deben estar dedicados a cada área y no deben moverse de un área a otra. Siempre deben llevarse guantes y éstos deben cambiarse antes de pasar de un área a otra. Los guantes deben cambiarse antes de manipular reactivos liofilizados.
- No congele el dispositivo de obtención de muestras. Guárdelo a temperatura ambiente. Si no se abre, el dispositivo de obtención de muestras se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada.
- Manipule siempre las muestras como si fueran infecciosas, y de acuerdo con los procedimientos de seguridad de laboratorio como los descritos en *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³ y en el Documento M29 de CLSI⁴.
- Lleve ropa protectora y guantes desechables cuando manipule los reactivos del equipo. Lávese las manos bien después de realizar la prueba.
- No pipetee con la boca.
- No fume, beba, o coma en áreas donde se trabaje con muestras o reactivos del equipo.
- Deshágase de los reactivos no utilizados y de los desechos de acuerdo con el reglamento del país, federal, provincial, estatal y local.

Material proporcionado

- Tampón de muestras (Sample Buffer)
- Tubo de lisis (Lysis tube)
- Mezcla maestra (Master Mix)
- ADN de Control (Control DNA)

- Diluyente (Diluent)
- Tubos de reacción de SmartCycler®, 25 µL
- Etiquetas de identificación de muestras

Conservación, manejo y estabilidad

Muestras obtenidas

Las muestras deben mantenerse entre 2°C y 30°C durante el transporte. Protéjalas contra la congelación o exposición a un calor excesivo.

Las muestras con indicios de sustancias potencialmente interferentes (p.ej. sangre, exceso de secreciones nasales, etc.) deben analizarse en un plazo de 24 a 36 horas. De lo contrario, las muestras pueden guardarse hasta 5 días a 2-8°C antes de ser analizadas. Las muestras que pueden ser analizadas en un plazo de 36 horas pueden guardarse a temperatura ambiente (15-30°C).

Reactivos

Nota: Las condiciones de almacenamiento deben seguir las especificaciones escritas en cada bolsa. Los tubos que estén fuera de su bolsa protectora y no fueran utilizados dentro de los intervalos de tiempo especificados deben ser desechados.

Componente del equipo		Master Mix y Control DNA (etiquetas de tiras blancas y rojas)	Lysis tube (tapa amarilla)	Sample Buffer, y Diluent (tapa azul, y etiqueta con tira negra respectivamente)
Bolsa cerrada	Temperatura	2-25 °C	2-25 °C	2-25 °C
	Estabilidad	Fecha de caducidad	Fecha de caducidad	Fecha de caducidad
Bolsa abierta	Temperatura	2-8 °C ¹	2-25 °C ²	2-25 °C ²
	Estabilidad	1 mes ³	Fecha de caducidad	2 meses ³

¹ Una vez roto el precinto original de la bolsa, cierre con cuidado la bolsa con el cierre deslizante después de cada uso y consérvela a la temperatura adecuada.

² Aunque estos reactivos pueden almacenarse a temperatura ambiente deberían ser conservados con sus reactivos asociados del mismo lote a 2-8°C.

³ Siempre que la bolsa esté bien cerrada con el cierre deslizante después de cada uso.

Componente del equipo fuera de su bolsa protectora			Master Mix y Control DNA (etiquetas de tiras blancas y rojas)
Tubos no preparados		Temperatura	15-25 °C
		Estabilidad	2 horas
Tubos preparados ¹	Recipiente original	Temperatura	2-8 °C
		Estabilidad	3 horas
	Tubo SmartCycler®	Temperatura	2-8 °C
		Estabilidad	1 hora

¹ Deseche los tubos no utilizados después de la fecha de caducidad.

Material necesario pero no suministrado

- Líquido de Stuart BBL™ CultureSwab™ (nº de catálogo de Becton Dickinson 220099), líquido de Stuart Transystem™ de Copan (nº de catálogo de Copan Italia International 141C.USE), líquido de Stuart Venturi Transystem™ de Copan (nº de catálogo de Copan Diagnostics Inc. 141C.US), líquido de Stuart único TransPorter™ de HealthLink (nº de catálogo de HealthLink 4432),.
- Staph. aureus BBL™ CHROMagar™ nº de catálogo 214982, agar manitol sal (MSA) número de catálogo 221773 o 221271 o medios equivalentes (opcional)
- Vortex Genie 2 (Fisher) con portamicrotubo de 1,5 mL o equivalente; para procesar múltiples muestras pueden usarse adaptadores con varios lugares de sujeción.
- Micropipetas (margen de precisión entre 1-10 µL, 10-100 µL y 100-1000 µL)
- Puntas de pipeta de desplazamiento positivo o con filtro, estériles y sin DNAsa.
- Pipetas de transferencia con puntas finas estériles (p.ej. nº 14670-329, 14670-332) o puntas estériles extensibles sin DNAsa y con filtro de 1.250 µL (p.ej. nº 8255 del catálogo MATRIX)
- Tijeras
- Gasas

- **Guantes** desechables, sin talco
- **Microcentrifuga** para centrifugación de velocidad alta (debe alcanzar 14 000 x g) y baja
- **Bloque de calor seco** para tubos de 1,5 mL o baño maría
- Hielo o **bloque de enfriamiento** para tubos de 1,5 mL
- Herramienta para quitar tapas (p.ej. n° 4469 del catálogo de MATRIX) (opcional)
- **Cronómetro** o minuterio
- **Sistema iniciador (starter system) SmartCycler®** con **Dx Software** (bloque de procesamiento, manual del usuario, equipo de accesorios y computadora de escritorio) (Cepheid, Sunnyvale, CA, EE.UU.)

Modo de empleo

Obtención de muestras

Para obtener una muestra adecuada, debe seguirse rigurosamente el procedimiento para obtención de muestras.

Utilizando la torunda recomendada en medio Stuart líquido (consulte la sección Material necesario pero no suministrado), se obtienen muestras nasales de acuerdo con el siguiente procedimiento:

1. Humedezca la torunda con dos gotas (unos 50 µL) de suero fisiológico estéril (salino) o utilícelo seco.
2. Inserte la torunda con cuidado en el orificio nasal del paciente (**la punta de la torunda debe insertarse hasta 2,5 cm (1 pulgada) desde el borde de los orificios nasales**).
3. Haga girar la torunda 5 veces.
4. Inserte la misma torunda en el segundo orificio nasal y repita el proceso indicado en los pasos 2 y 3.
5. Ponga la torunda en su recipiente;
6. Etiquete el recipiente.
7. Envíe la muestra al laboratorio de acuerdo con los procedimientos normalizados de trabajo del hospital.
8. Consulte la sección titulada "Conservación, manipulación y estabilidad – Muestras obtenidas" para información sobre conservación y manipulación.

Preparación de muestras

Nota: Para el análisis de cada muestra se necesita **un tubo de Sample Buffer** (tampón de muestras, **tapa azul**) y un **Lysis tube** (tubo de lisis, **tapa amarilla**). También se requiere otro tubo de **Sample buffer (tapa azul)** para cada grupo de 20 muestras que vayan a analizarse. Saque el número necesario de tubos de las bolsas protectoras, **extraiga el exceso de aire y cierre las bolsas rápidamente con el cierre deslizante**.

Para el cultivo de muestras clínicas (con torundas) antes de realizar la prueba BD GeneOhm™ MRSA, consulte la sección "Cultivo de muestras clínicas, método de estría en placa" para obtener información.

1. **Coloque el dispositivo de obtención de muestras (torunda) en un tubo de tampón de muestra.**
Identifique el tubo de solución tampón de muestras en la tapa y/o la etiqueta del tubo.
2. **Rompa el palo de la torunda y cierre el tubo herméticamente.**
Sujete la torunda por el palo cerca del borde del tubo (utilice una gasa para minimizar los riesgos de contaminación). Levante la torunda unos milímetros del fondo del tubo y doble el palo contra el borde del tubo para romperlo. Método alternativo: use tijeras limpias para cortar el palo. Asegúrese de cerrar la tapa herméticamente.
3. **Agite con vortex de alta velocidad durante un minuto.**
Para procesar múltiples muestras, puede usarse un adaptador con varios lugares de sujeción.
4. **Transfiera la suspensión de células completa a un tubo de lisis (tapa amarilla).**
Utilice una pipeta de transferencia con punta fina estéril o una micropipeta P-1000 con una punta de mayor longitud.
Para el cultivo de muestras clínicas con la torunda restante, consulte la sección "Cultivo de muestras clínicas, Caldo de enriquecimiento" en la página 10, para obtener información.
5. **Centrifugue a alta velocidad (entre 14 000 x g y 21 000 x g) durante 5 minutos a temperatura ambiente.**
6. **Quite el sobrenadante y deséchelo.**
Utilice una pipeta de transferencia con punta fina estéril; tenga cuidado de no tocar el sedimento. Utilice una nueva pipeta de transferencia para cada muestra.
7. **Añada 50 µL de tampón de muestras al tubo de lisis; ciérrelo herméticamente.**
Utilice una punta de pipeta nueva para cada muestra. Pueden prepararse hasta 20 muestras con un tubo de Solución tampón de muestras. Para más de 20 muestras, utilice tantos tubos de tampón de muestras como sean necesarios (**guarde la solución tampón no utilizada para las etapas posteriores del procedimiento de la prueba BD GeneOhm™ MRSA**).
8. **Agite con vortex a alta velocidad durante 5 minutos.**
Para procesar múltiples muestras puede usarse un adaptador con varios lugares de sujeción.
9. **Centrifugue el tubo de lisis brevemente (centrifugado rápido).**
A velocidad baja durante 2 a 5 segundos, para que el contenido quede en el fondo del tubo.

10. Calientelo a 95 ± 2 °C durante dos (2) minutos.

Utilice un bloque de calor seco para los tubos de 1,5 mL o un baño maría

11. Mantenga el tubo de lisis en hielo o en un bloque de enfriamiento.

Los lisados se mantienen estables hasta 4 horas a 2-8 °C. Si los lisados no se han utilizado al final de este período de tiempo, almacénelos a -20 ± 5 °C para uso posterior.

Procedimiento de la prueba BD GeneOhm™ MRSA

Nota: Un tubo de *Master Mix* preparada (mezcla maestra, **etiqueta blanca**) producirá suficientes reactivos **para realizar 8 reacciones**. Se necesitarán un tubo SmartCycler® por cada muestra que vaya a ser analizada y 2 tubos SmartCycler® adicionales para los controles positivo y negativo. **Deben incluirse un (1) control positivo y un (1) control negativo en cada serie analítica de BD GeneOhm™ MRSA.** Se necesita un *Control DNA* (ADN de control, **etiqueta de tira roja**) por serie analítica. Se necesita un tubo de *Diluent* (diluyente, **etiqueta con tira negra**) para la preparación de hasta 3 tubos de *Master mix*. Saque el número necesario de tubos de las bolsas protectoras, **extraiga el exceso de aire y cierre las bolsas rápidamente con el cierre deslizante.**

Prepare sólo el número necesario de tubos SmartCycler® para llenar los módulos I-CORE® disponibles en el instrumento SmartCycler®.

1. Coloque el número necesario de tubo(s) de mezcla maestra en hielo o en un bloque de enfriamiento para tubos de 1,5 mL.**2. Añada 225 µL de diluyente (etiqueta con tira negra) a cada tubo de mezcla maestra.**

Inserte la punta de la micropipeta a través de la pared de la tapa del tubo de **mezcla maestra**. No inserte la punta muy profundamente en la tapa. Administre el diluyente. Deseche después el diluyente no utilizado.

3. Agite con vortex durante 5 a 10 segundos.**4. Coloque el número necesario de tubos SmartCycler® en el bloque de enfriamiento SmartCycler®.**

Se necesitan un tubo SmartCycler® por muestra y dos tubos SmartCycler® más para los controles. **Evite tocar las ventanas de detección óptica en los bordes inferiores del tubo y la parte inferior romboidal.**

Los siguientes pasos DEBEN realizarse en un período de una hora:**5. Agregue 25 µL de mezcla maestra preparada a los tubos SmartCycler®.**

Quite la tapa del tubo antes de pipetear el reactivo. Vierta el líquido en el depósito (parte superior) de los tubos SmartCycler®. Identifique los tubos SmartCycler® en la tapa. Pueden usarse las etiquetas de identificación de muestras (incluidas en el equipo). Si es necesario la mezcla maestra no utilizada **almacenada inmediatamente a 4-8 °C durante un máximo de 3 horas y al abrigo de la luz** puede usarse para volver a analizar de inmediato los resultados indeterminados. Deseche la mezcla maestra no utilizada después de este período.

6. Agregue 2,8 µL de cada muestra lisada a un tubo SmartCycler® que contiene el mezcla maestra; cierre los tubos.

Tenga cuidado de no aspirar las perlas al pipetear en el tubo de lisis. Después de añadir la muestra, pipetee hacia arriba y hacia abajo en el depósito de 2 a 3 veces para asegurar la transferencia del volumen completo. Utilice una punta de micropipeta nueva para cada muestra.

7. Coloque un tubo de ADN de control (etiqueta con tira roja) en hielo o en un bloque de enfriamiento para tubos de 1,5 mL.**8. Añada 225 µL de tampón de muestras (tapa azul) al tubo de ADN de control.**

Utilice el tubo del tampón de muestras del paso 7 del protocolo de Preparación de muestras. Inserte la punta de la micropipeta a través de la pared de la tapa del tubo de *ADN de control*. No inserte la punta muy profundamente en la tapa. Administre la tampón de muestras.

9. Agite el tubo con vortex durante 5 a 10 segundos.**10. Agregue 2,8 µL del ADN de control preparado al penúltimo tubo SmartCycler® (Control positivo); cierre el tubo.**

Después de añadir el ADN, pipetee hacia arriba y hacia abajo en el depósito de 2 a 3 veces para asegurar la transferencia del volumen completo. Identifíquelo como control positivo. El ADN de control no utilizado **guardado inmediatamente a 4-8 °C durante un máximo de 3 horas al abrigo de la luz** puede usarse para la preparación de un nuevo control positivo en caso de un nuevo análisis inmediato de los resultados indeterminados. Deseche el ADN de control no utilizado después de este período.

11. Agregue 2,8 µL de tampón de muestras (tapa azul) al último tubo SmartCycler® (Control negativo); cierre el tubo.

Utilice el tubo del tampón de muestras del paso 7 del protocolo de Preparación de muestras. Así se controlará la posible contaminación de PCR durante la manipulación de las muestras. Identifíquelo como control negativo. Deseche después la solución tampón de muestras no utilizada.

12. Centrifugue todos los tubos de reacción durante 5 a 10 segundos.

Utilice la microcentrífuga, adaptada especialmente, suministrada con el instrumento SmartCycler®.

13. Mantenga los tubos entre 2 y 8 °C en el bloque de enfriamiento SmartCycler® antes de colocarlos en el instrumento.

Los lisados restantes deben congelarse a -20 ± 5 °C para uso posterior, si es necesario.

14. Cree una serie analítica con el protocolo de la prueba BD GeneOhm™ MRSA.

Si es necesario consulte el Manual del operador del Software Dx de SmartCycler®. Debe introducir los parámetros de identificación para las muestras antes de empezar la serie.

15. Inserte cada tubo de reacción en un módulo I-CORE® del SmartCycler® y cierre la tapa del I-CORE®.

Coloque los controles positivo y negativo en su posición adecuada (véase la sección titulada "Control de calidad"). Empuje hacia abajo todos los tubos firmemente hasta que estén en su sitio.

16. Empezar la serie.

Control de calidad

Controles positivo y negativo

Los procedimientos de control de calidad están concebidos para controlar la eficacia de la prueba. El control positivo está pensado para controlar fallos importantes de los reactivos. El control negativo se utiliza para detectar la contaminación de reactivos o la contaminación ambiental (o por recirculación) por ADN de SARM o amplicones de SARM. Los controles positivo y negativo son controles de prueba (controles de serie). Un control no válido invalida la serie. Por último, un control interno incorporado a cada mezcla de reacción está concebido para controlar la inhibición de PCR en cada muestra y la integridad de los reactivos.

Deben incluirse un control positivo y un control negativo para cada serie en el SmartCycler®. El software asigna automáticamente la posición de los controles en el instrumento (consulte el Manual del operador del Software Dx de SmartCycler®).

Controles de procesamiento de las muestras

Pueden analizarse cepas de control de acuerdo con las pautas o requisitos del reglamento local, estatal y/o federal o de organizaciones de acreditación. Puede usarse una cepa de SARM de referencia (p.ej. American Type Culture Collection, ATCC 43300) o una cepa aislada de SARM bien caracterizada como control de procesamiento de muestras mientras que puede usarse un cultivo de *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (p.ej. ATCC 29213) o de cualquier otro *Staphylococcus* que no sea *aureus* (p.ej. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990) como control negativo externo.

Vuelva a suspender las colonias aisladas de una placa de agar sangre de cordero al 5% (p. ej., agar con tripticasa de soja BBL™ (TSA II) con sangre de oveja al 5 %, catálogo de BD nº 221239 o 221261) en solución salina de 18 a 24 horas a una turbidez de 0,5 McFarland (~1,5 X 10⁸ UFC/mL). Dilúyase en solución salina para obtener una suspensión de ~10⁶ UFC/mL. Sumerja la torunda recomendada con medio Stuart líquido (consulte la sección Material necesario pero no suministrado) en la suspensión bacteriana, presione para eliminar el exceso de líquido, coloque la torunda en su recipiente (para permitir el contacto con el medio de transporte), y déjelo reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Procéselo y analicelo como una muestra clínica (consulte las secciones tituladas "Preparación de muestras" y "Procedimiento de la prueba BD GeneOhm™ MRSA"), incluyendo los controles. Todas las muestras y controles deberían producir resultados válidos (ningún control positivo o negativo no válido y ningún control interno fallido).

Para orientación general sobre control de calidad, el usuario quizás prefiera consultar el documento MM3⁵ y C24 del CLSI⁶.

Cultivo de muestras clínicas

Para realizar antibiogramas o tipificación epidemiológica, las muestras clínicas pueden cultivarse en dos etapas distintas del procedimiento analítico BD GeneOhm™ MRSA. Se puede realizar a partir del dispositivo de obtención de muestras (torunda) antes de llevar a cabo el análisis con BD GeneOhm™ MRSA mediante el método de estría en placa o con la torunda siguiendo el procedimiento de preparación de muestras realizando una etapa de enriquecimiento.

Método de estría en placa

Este método de cultivo puede realizarse antes del procedimiento de preparación de muestras para BD GeneOhm™ MRSA.

1. Saque el dispositivo de obtención de muestras (torunda) de su recipiente.
2. Inocule una placa de agar, sal y manitol (MSA) estriando el primer cuadrante de la placa.
3. Vuelva a colocar la torunda en su recipiente o rómpala en un tubo de tampón de muestras (tapa azul) de BD GeneOhm™ MRSA y prosiga según las instrucciones de la sección "Preparación de muestras".
4. Con una aguja de asa, estríe el resto de los cuadrantes de la placa MSA.
5. Incube la placa MSA durante 24 a 48 horas a 35 °C.
6. Identifique y confirme las colonias de *S. aureus* y realice análisis para determinar la resistencia a la meticilina de acuerdo con los métodos habituales.

Caldo de enriquecimiento

Este método de cultivo puede realizarse con torundas que permanecen en el tubo de solución tampón de muestras después de la transferencia de la suspensión de células al tubo de lisis. Las torundas pueden guardarse a 2-8°C en un tubo de solución tampón de muestras cerrado hasta 24 horas antes de realizar el cultivo; es posible que no tenga éxito la obtención con muestras clínicas que contengan pequeñas cantidades de SARM.

1. Añada 1,0 mL de caldo de enriquecimiento a los tubos de solución tampón que contengan la torunda.
Se sugiere TBS (caldo tripticasa soja) enriquecido con 6,5% NaCl.
2. Incúbese durante 24 a 48 horas a 35 °C.
3. Realice el subcultivo en un medio sólido apropiado durante 24 a 48 horas a 35 °C.
Se sugiere placa agar-sangre de carnero al 5%.
4. Identifique y confirme las colonias de *S. aureus* y realice análisis para determinar la resistencia a la meticilina de acuerdo con los métodos habituales.

Interpretación de resultados

El algoritmo de decisión para la prueba BD GeneOhm™ MRSA está integrado en el software SmartCycler®. La interpretación de los resultados de la prueba se realiza de acuerdo con los siguientes criterios:

Resultado notificado de la prueba	Resultado notificado de CI	Interpretación del resultado ¹
NEG (Negativo)	PASS (Aceptado)	No se ha detectado ningún ADN de SARM, colonización nasal de SARM poco probable
POS (Positivo)	NA (NA)	Detectado ADN de SARM, colonización nasal de SARM
Unresolved (Sin resolver)	FAIL (Rechazado)	Sin resolver – muestra inhibidora o defecto de reactivo
ND (SD)	ND (SD)	Sin determinar debido a fallo del Módulo I-CORE® (con advertencias o códigos de error ²)

IC – Control interno; NA – no aplicable; SD – sin determinar

¹ Los resultados de BD GeneOhm™ MRSA pueden utilizarse para orientar el aislamiento y el nivel de precauciones de acuerdo con los programas y prácticas institucionales.

² Consulte el Manual del operador del Software Dx de SmartCycler® para la interpretación de advertencias y códigos de error.

Un control positivo o negativo no válido invalida la serie. En dichos casos, los resultados de la prueba obtenidos en esa serie no son válidos y no deben ser notificados. En la pantalla y en los informes aparecen marcados la serie analítica no válida o los códigos de error o advertencias del instrumento. Antes de notificar los resultados de SARM, verifique siempre que la serie analítica sea válida.

Consulte el Manual del operador del Software Dx de SmartCycler® para imprimir los resultados.

Serie analítica no válida

Utilizando lisados congelados, prepare nuevos tubos de reacción para todas las muestras clínicas de esa serie analítica junto con nuevos tubos de control.

Muestras sin resolver

Repita la prueba con el lisado congelado de la muestra correspondiente. Se ha demostrado que el efecto del ciclo de congelación-descongelación reduce las sustancias inhibidoras de PCR.

Muestra sin determinar debido a fallo del módulo I-CORE®

Repita la prueba con el lisado congelado de la muestra correspondiente. Para la interpretación de mensajes de advertencia o códigos de error, consulte el Manual del operador del Software Dx de SmartCycler®.

Limitaciones del procedimiento

- La eficacia de esta prueba se ha establecido con el instrumento SmartCycler®, con muestras nasales obtenidas de pacientes hospitalizados o de pacientes en el momento de ingreso y con muestras obtenidas utilizando la Copan® Venturi Transystem con medio Stuart líquido. Por consiguiente, este producto sólo puede utilizarse con el SmartCycler®; además, no se recomienda el uso de otros sistemas de obtención y transporte de muestras, aparte de los que figuran en la sección Material necesario pero no suministrado. No se han evaluado otras fuentes clínicas y se desconoce la eficacia diagnóstica de esta prueba en otros tipos de muestras o de pacientes.
- Asimismo pueden producirse resultados negativos de la prueba debidos a una obtención, manipulación o conservación inadecuadas de las muestras, a la presencia de un inhibidor, a error técnico, a la confusión de muestras o a que el número de organismos en la muestra sea inferior a la sensibilidad analítica de la prueba. Es necesario seguir cuidadosamente las instrucciones incluidas en este prospecto y en el Manual del operador del Software Dx de SmartCycler® para evitar resultados erróneos. El uso de esta prueba debe limitarse al personal capacitado para el procedimiento y a la utilización del SmartCycler®.
- Aunque no hay necesidad de preparación de reactivos y la principal operación técnica es el pipeteado, es esencial una buena técnica de laboratorio para el funcionamiento adecuado de esta prueba. Debido a la alta sensibilidad analítica de esta prueba, debe tenerse extrema precaución para preservar la pureza de todos los reactivos, especialmente en los casos en que se toman múltiples alícuotas de un tubo.
- La detección sistemática determina el estado de colonización en un momento determinado y podría variar dependiendo del tratamiento del paciente (p.ej. régimen de descolonización), condición del paciente (p.ej. no está eliminando activamente el MRSA) o exposición a ambientes de alto riesgo (p.ej. contacto con un portador de SARM, hospitalización prolongada). El control del estado de colonización debe realizarse de acuerdo con las normas del hospital.
- Los resultados de la prueba BD GeneOhm™ MRSA deben utilizarse como un complemento de los esfuerzos de control de infecciones hospitalarias para identificar a pacientes que necesiten mayores precauciones. La prueba no está concebida para identificar a pacientes con infección estafilocócica. Los resultados no deben utilizarse para orientar o controlar el tratamiento de infecciones de SARM.
- Un resultado positivo en la prueba BD GeneOhm™ MRSA no indica necesariamente el fracaso del tratamiento, ya que es posible que persista el ADN. Un resultado negativo después de un resultado positivo en la prueba puede indicar el éxito del tratamiento o puede producirse debido a una eliminación intermitente.
- A veces los resultados de la prueba BD GeneOhm™ MRSA pueden quedar sin resolver o invalidados debido a un control no válido, y es necesario volver a hacer pruebas que pueden ocasionar un retraso en la obtención de los resultados.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Sin embargo, es presuntivo de la presencia de SARM ya que BD GeneOhm™ MRSA detecta simultáneamente el casete SCCmec (portador del gen *mecA*) y una secuencia específica de *S. aureus* situada en el interior del gen *orfX*. La prueba BD GeneOhm™ MRSA no detecta directamente el gen *mecA* ni la proteína fijadora de penicilina (PBP 2a) codificada por este gen.

- Se ha demostrado que BD GeneOhm™ MRSA detecta varios tipos de SARM que se han relacionado con infecciones adquiridas en hospitales y en la comunidad; las evaluaciones no determinaron los rasgos fenotípicos o genotípicos de cepas aisladas de SARM para identificar cepas que puedan ser más virulentas en el entorno hospitalario.
- La presencia de mutaciones o polimorfismos en las regiones de hibridación de las sondas o de los cebadores puede afectar la detección de variantes nuevas o de variantes desconocidas de SARM y producir un resultado falso negativo con la prueba BD GeneOhm™ MRSA®.

Sustancias interferentes

La lista no exhaustiva de sustancias potencialmente interferentes es la siguiente: sangre, exceso de secreciones nasales o mucosidad, descongestionante y sustancias que se usen ocasionalmente para aliviar la sequedad o la irritación nasal. La presencia de un exceso de secreciones nasales y de sangre puede ocasionar la inhibición de la PCR y producir resultados indeterminados.

En un estudio experimental realizado con 786 muestras nasales, se notificaron sustancias potencialmente interferentes en el 43% de las muestras obtenidas. En total, hubo 35 (4,5%) muestras no resueltas. De estas 35 muestras, no se notificaron sustancias potencialmente interferentes en 24 de ellas, se notificaron secreciones nasales en 10 y una combinación de sustancias en una muestra. Veintisiete (27) fueron resueltas mediante un ciclo de congelación-descongelación. En las 8 muestras que no pudieron resolverse, no se observaron sustancias potencialmente interferentes en 4, se observaron secreciones nasales en tres y una combinación de sustancias en una.

Valores previstos

Los seres humanos son un reservorio natural para el *S. aureus*. La colonización puede ser transitoria o persistente y puede durar varios años. Se han notificado tasas de colonización nasal de *S. aureus* del 25 al 30% para la población general y del 10 al 40% para los pacientes ambulatorios o en el momento del ingreso⁷. En algunos hospitales norteamericanos el *S. aureus* resistente a la metilicina representa actualmente más del 50% de las cepas aisladas de *S. aureus* adquirido en hospital².

En el estudio experimental para la prueba BD GeneOhm™ MRSA, la tasa global de colonización nasal de *S. aureus* determinada por cultivo (*S. aureus* aislado en muestras mediante cualquier técnica de cultivo) fue de 36,1% con un margen de 33-40%. El cincuenta y un por ciento (51%) de las cepas aisladas de *S. aureus* se mostró resistente a la metilicina mediante el método de detección con oxacilina en agar [placa de agar Mueller-Hinton enriquecida con oxacilina (6 µg/mL) y NaCl (4% w/v)] con una tasa global de colonización nasal de SARM del 18,6%. Con la prueba BD GeneOhm™ MRSA, la tasa global de colonización nasal de SARM fue del 20,3%.

Eficacia diagnóstica

Eficacia clínica

La eficacia diagnóstica de la prueba BD GeneOhm™ MRSA se determinó en un estudio experimental prospectivo en múltiples instituciones: 4 centros médicos, dos en Canadá y dos en los EE.UU. con programas de detección sistemática de SARM mediante cultivo. Para participar en el estudio, los pacientes tenían que dar su consentimiento por escrito y reunir los requisitos necesarios para la detección sistemática de SARM, de acuerdo con las normas del hospital, y no haber recibido terapia antibiótica para el SARM. Los criterios de selección para la detección sistemática incluían entre otros los siguientes: detección sistemática de todos los pacientes al ingreso, infección o colonización de SARM previa, traslado desde otra institución, estancia hospitalaria o historial de hospitalización prolongada y contacto con un portador de SARM.

El método de referencia consistió en un análisis inicial con la prueba de oxacilina en agar tras crecimiento selectivo en agar, sal y manitol. Las muestras negativas de SARM fueron sometidas a un análisis adicional que consistía en una etapa de enriquecimiento con caldo tripticasa soja (TBS) con 6,5% NaCl, seguido de la prueba de oxacilina en agar. Una muestra de cultivo positivo de SARM se definió como una muestra positiva por cualquiera de las técnicas de cultivo. Una muestra de cultivo negativo de SARM se definió como una muestra negativa por cualquiera de las técnicas de cultivo.

Para el método de detección sistemática con crecimiento selectivo en agar sal y manitol (MSA), las placas se inocularon directamente con la torunda con muestras nasales, seguidas de incubación a 35°C durante 24 a 48 horas. Cuando era necesario, las supuestas colonias de *S. aureus* se subcultivaron en placas de agar sangre de carnero al 5% y se incubaron durante 24 a 48 horas a 35°C. De lo contrario, las colonias aisladas se analizaron directamente de placas MSA. La sospecha de colonias estafilocócicas se confirmó con una prueba de aglutinación de látex o mediante una prueba de coagulasa en tubo. Las colonias confirmadas con *S. aureus* fueron analizadas en placa agar Mueller-Hinton enriquecida con oxacilina (6 µg/mL) y NaCl (4% w/v) incubadas entre 33 y 35°C (sin exceder los 35°C) durante 24 horas. También se realizó la detección sistemática de SARM con etapa de enriquecimiento en caldo tripticasa soja (TSB) con 6,5% NaCl en los casos en que se obtuvo un resultado negativo de SARM con el método de detección sistemática de MSA. Para este fin se inocularon medios TSB después de el cultivo directo en placas de Petri en MSA, se incubaron por la noche a 35°C, se sometieron a subcultivo en placas de agar sangre de cordero al 5% durante 24 a 48 horas a 35°C y las placas se guardaron a 2-8°C para ulterior análisis en caso necesario. La confirmación de las supuestas colonias y la determinación de la resistencia a la metilicina se realizaron como se describe más arriba. En un centro de investigación, se analizó cada muestra utilizando ambos métodos de detección sistemática mediante cultivo.

En total, 786 muestras nasales obtenidas con la torunda recomendada en medio Stuart líquido (consulte la sección Material necesario pero no suministrado) se examinaron para detectar la existencia de SARM con el método de cultivo de referencia descrito más arriba y con la prueba BD GeneOhm™ MRSA. Comparada con el método de cultivo de referencia, la prueba BD GeneOhm™ MRSA identificó un 92,5% de las muestras como positivas de SARM mediante cualquier técnica de cultivo y un 96,4% de las muestras como negativas mediante ambas técnicas de cultivo (Tablas 1 y 2). Para los pacientes sometidos a análisis, esto da como resultado un valor de predicción negativo del 98,2% y un valor de predicción positivo del 85,4%.

Tabla 1. Resultados obtenidos con la prueba BD GeneOhm™ MRSA en comparación con el método de referencia¹.

Técnicas de cultivo		BD GeneOhm™ MRSA		Total
		Positivo	Negativo	
	Positivo	135	11	146
	Negativo	23	609	632
	Total	158	620	778

¹ Ocho (8) muestras que dieron inicialmente resultados indeterminados quedaron sin resolver después de volver a ser analizadas con la prueba BD GeneOhm™ MRSA y no se incluyen en la tabla. Las 8 muestras eran de cultivo negativo.

Catorce (14) de las 23 muestras de cultivo negativo pero positivas de BD GeneOhm™ MRSA resultaron ser de cultivo positivo de SARM tras investigación posterior, lo que dio como resultado un total de 149 muestras de cultivo positivo y positivas en BD GeneOhm™ MRSA de un total de 160 muestras de cultivo positivo. Para 2 de las muestras de cultivo positivo pero de resultado negativo en BD GeneOhm™ MRSA, no pudo demostrarse que ninguna de las cepas aisladas que mostró resistencia a la metilicina en placas de oxacilina en agar fuera portadora del gen *mecA* cuando fueron analizadas con la prueba de PCR específica de *mecA* descrita por Martineau *et al*⁶.

Tabla 2. Eficacia de la prueba BD GeneOhm™ MRSA obtenida por los centros de investigación comparada con el método de referencia

	Sensibilidad (95% CI) ¹	Especificidad (95% CI) ¹	N° de muestras sin resolver ²	N° de análisis no válidos/n° total de análisis
Centro 1	86,8% (n=38) (71,9-95,6%)	99,6% (n=261) (97,9-100%)	6	0/26
Centro 2	100% (n=30) (88,4-100%)	98,0% (n=102) (93,1-99,8%)	16	0/21
Centro 3	89,3% (n=28) (71,8-97,7%)	90,8% (n=119) (84,1-95,3%)	11	1/15
Centro 4	94,0% (n=50) (83,5-98,7%)	94,0% (n=150) (88,9-97,2%)	2	2/27
Total	92,5% (n=146) (86,9-96,2%)	96,4% (n=632) (94,6-97,27%)	35	3/89

¹Intervalos de confianza del 95% por el método de exacto binomial.

²Todas las muestras quedaron sin resolver debido a controles internos fallidos que revelan la inhibición o defecto de reactivo. Veintisiete (27) de las 35 fueron resueltas tras ser sometidas a otra prueba.

La tipificación del SCCmec de las muestras de cultivo positivo de SARM, de acuerdo con Oliviera y de Lencastre⁹, reveló muestras de tipos I, II y IV. No hubo ninguna muestra de SCCmec tipo III aislada del estudio. Sin embargo, en otro estudio diferente, las cepas de referencia y otras cepas clínicas aisladas de todos los tipos de SCCmec fueron analizadas y detectadas con la prueba BD GeneOhm™ MRSA.

Los resultados de eficacia obtenidos por los centros de investigación para BD GeneOhm™ MRSA y las técnicas de cultivo individuales comparados con el método de referencia de cultivo (ambas técnicas de cultivo) se presentan en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Resultados obtenidos de la prueba BD GeneOhm™ MRSA y cada técnica de detección sistemática mediante cultivo con muestras positivas de SARM por el método de cultivo de referencia.

Centro	Prevalencia de SARM ¹	Sensibilidad (95% CI) ²		
		BD GeneOhm™ MRSA	OxaMSA ³	OxaTSB ⁴
Centro 1	12,7% (38/300)	86,8% (71,9-95,6%)	81,6% (65,7-92,3%)	ND
Centro 2	21,7% (30/138)	100% (88,4-100%)	93,3% (77,9-99,2%)	ND
Centro 3	18,9% (28/148)	89,3% (71,8-97,7%)	64,3% (44,1-81,4%)	ND
Centro 4	25,0% (50/200)	94,0% (83,5-98,7%)	80,0% (66,3-90,0%)	78,0% (64,0-88,5%)
Total	18,6% (146/786)	92,5% (86,9-96,2%)	80,1% (72,7-86,3%)	ND

¹ Determinado mediante resultados obtenidos con el método de cultivo de referencia (combinación de OxaMSA y OxaTSB)

² Intervalos de confianza del 95% por el método de exacto binomial.

³ Prueba de oxacilina en agar después de crecimiento selectivo en MSA.

⁴ Prueba de oxacilina en agar después de enriquecimiento en TSB con 6,5% NaCl. El centro 4 analizó todas las muestras con ambas técnicas de cultivo mientras que el resto de los centros analizó sólo las muestras negativas con el método de cultivo OxaMSA.

Tabla 4. Resultados obtenidos de la prueba BD GeneOhm™ MRSA y cada técnica de detección sistemática mediante cultivo con muestras negativas de SARM por el método de cultivo de referencia.

Centro	MSSA ¹	Especificidad (95% CI) ²		
		BD GeneOhm™ MRSA	OxaMSA ³	OxaTSB ⁴
Centro 1	73/262	99,6% (97,9-100%)	100% (98,6-100%)	ND
Centro 2	25/108	98,0% (93,2-99,8%)	100% (96,4-100%)	ND
Centro 3	24/120	90,8% (84,1-95,3%)	100% (96,9-100%)	ND
Centro 4	16/150	94,0% (88,9-97,2%)	100% (97,6-100%)	100% (97,6-100%)
Total	138/640	96,4% (94,6-97,7%)	100% (99,4-100%)	ND

¹ Número de MSSA en el total de pacientes con cultivo negativo de SARM² Intervalos de confianza del 95% por el método de exacto binomial.³ Prueba de oxacilina en agar después de crecimiento selectivo en MSA⁴ Prueba de oxacilina en agar después de enriquecimiento en TSB con 6,5% NaCl. El centro 4 analizó todas las muestras con ambas técnicas de cultivo mientras que el resto de instituciones analizó sólo las muestras negativas con el método de cultivo OxaMSA.

Especificidad analítica

Se analizaron el ADN genómico de 37 cepas ATCC que representan especies relacionadas filogenéticamente con *S. aureus* y gérmenes de la flora comensal nasal, 27 cepas (15 cepas de referencia y 12 cepas clínicas aisladas) de estafilococos coagulasa negativos sensibles a la metilicina y 44 cepas (dos cepas de referencia y 42 cepas clínicas aisladas) de estafilococos coagulasa negativos resistentes a la metilicina. La especificidad fue del 100%.

Como se indicó en la Tabla 4, los centros de investigación consideraron que 138 muestras analizadas con técnicas de cultivo contenían *S.aureus* sensible a la metilicina. Siete (7) dieron resultados positivos con la prueba BD GeneOhm™ MRSA. Investigaciones posteriores con técnicas de cultivo mejoradas demostraron que 4 contenían SARM.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica (límite de detección o LD) de la prueba BD GeneOhm™ MRSA se determinó con 7 cepas de SARM. El cultivo cuantitativo y el ADN genómico purificado diluidos en la solución tampón de muestras de la prueba BD GeneOhm™ MRSA fueron analizados en 5 muestras. El LD se define como la concentración más pequeña en la que al menos el 92,5% de todas las muestras da resultado positivo. El LD de la prueba BD GeneOhm™ MRSA es de 15 copias de genoma por reacción. El LD en UFC es de 5 UFC/reacción. Teniendo en cuenta el factor de dilución debido al procesamiento de muestras, esto se traduce en aproximadamente 325 UFC/muestra.

Reproducibilidad

Un panel de 10 muestras simuladas con diversas concentraciones de SARM y los dos controles (positivo y negativo) de la prueba BD GeneOhm™ MRSA fueron analizados en triplicado en tres días distintos en 3 instituciones (10 muestras más 2 controles analizados X 3 X 3 días X 3 instituciones). Esto se repitió con tres lotes de reactivos.

Tabla 5. Datos acumulativos del estudio de reproducibilidad

Muestra ID	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Concordancia total	% total de concordancia
Negativo	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Negativo	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positivo débil ¹	19/27	18/27	16/27	53/81	65%
Positivo fuerte	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positivo fuerte	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positivo débil ¹	14/27	13/27	18/27	45/81	56%
Positivo	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positivo	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positivo débil	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positivo	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Control positivo	26/27	27/27	27/27	80/81	99%
Control negativo	26/27	27/27	27/27	80/81	99%
Concordancia total	301/324	301/324	304/324	906/972	93%
% total de concordancia	93%	93%	94%	93%	

¹ Muestras con UFC por debajo del límite de detección de la prueba.

Italiano

Uso previsto

Il saggio BD GeneOhm™ MRSA è un test diagnostico qualitativo *in vitro* per il rilevamento diretto della colonizzazione nasale da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) che contribuisce alla prevenzione e al controllo delle infezioni da MRSA in ambienti sanitari. Il test eseguito sullo strumento SmartCycler®, con un campione di tampone nasale prelevato da pazienti a rischio di colonizzazione, utilizza la reazione di polimerasi a catena (polymerase chain reaction, PCR) per l'amplificazione del DNA dello MRSA e sonde di ibridazione fluorogeniche specifiche per il target per il rilevamento del DNA amplificato. Il saggio BD GeneOhm™ MRSA non ha la finalità di diagnosticare le infezioni da MRSA né di guidare o monitorare il trattamento di tali infezioni. Le colture concomitanti sono necessarie unicamente per recuperare organismi per la tipizzazione epidemiologica o per ulteriori test di suscettibilità.

Riassunto e spiegazione del test

Un tampone nasale è prelevato e trasportato al laboratorio utilizzando il tampone consigliato con mezzo liquido di Stuart (fare riferimento a Materiali necessari, ma non forniti). Per il test, il tampone viene posto in una tampona. Il campione viene concentrato e lisato. Un'aliquota del lisato viene aggiunta ai reagenti PCR che contengono i primer specifici MRSA utilizzati per amplificare il target genetico, se presente. Il saggio include anche un controllo interno (internal control, IC) per rilevare campioni inibitori della PCR e per confermare l'integrità dei reagenti del saggio. I target amplificati sono rilevati con sonde di ibridazione etichettate con fluorofori temprati ("molecular beacon"). L'amplificazione, il rilevamento e l'interpretazione dei segnali sono eseguiti automaticamente dal software Cepheid SmartCycler®. L'intera procedura richiede circa 60-75 minuti, in base al numero di campioni trattati. Per il recupero di MRSA per la tipizzazione epidemiologica o per ulteriori test di suscettibilità antibiotica, può essere inoculato un mezzo di coltura adeguato durante la preparazione del campione o fino a 24 ore dopo la preparazione.

Lo *S. aureus* è una delle cause principali di infezioni nosocomiali. La maggior parte delle trasmissioni avviene tramite il contatto con le mani contaminate di un portatore di *S. aureus*. Sebbene lo *S. aureus* provochi infezioni con manifestazioni cliniche che vanno dalle pustole alla sepsi e al decesso¹, lo si trova comunemente nel naso o sulla cute di individui sani (portatori asintomatici). Il trattamento delle infezioni da *S. aureus* è diventato una vera sfida a causa dell'emergere di ceppi resistenti agli agenti antimicrobici precedentemente efficaci. I ceppi di *S. aureus* meticillino-resistenti si riscontrano spesso in ambienti sanitari e rappresentano oltre il 50% dei ceppi isolati di *S. aureus* contratti in ospedale in alcuni ospedali del Nord America². I fattori di rischio per infezioni da MRSA in ambienti sanitari comprendono ricovero ospedaliero prolungato, vicinanza a pazienti affetti da MRSA, esposizione a trattamenti antibiotici ad ampio spettro multipli e prolungati e trasporto nasale di MRSA. Lo screening precoce dei pazienti alla ricerca di trasporto nasale di MRSA per identificare i pazienti che richiedono isolamento può rientrare in un programma efficace di controllo delle infezioni da MRSA. Tutte le tecniche attualmente utilizzate per rilevare MRSA richiedono un passo di coltura e l'isolamento di colonie pure seguito da test della suscettibilità all'oxacillina, rilevamento del gene *mecA* o rilevamento della proteina penicillino-legante (penicillin binding protein, PBP 2a) codificata dal gene *mecA*. Ciò aumenta il tempo di risoluzione dello status di portatore di MRSA fino ad un minimo di 16 ore, con un tempo medio di oltre 48 ore. Con la velocità di diffusione delle infezioni da *S. aureus*, soprattutto negli ambienti sanitari in cui i portatori sono frequenti, la possibilità di fornire i risultati relativi al trasporto nasale di MRSA il giorno stesso del ricovero costituisce un vantaggio decisivo per i programmi di controllo delle infezioni.

Principio della procedura

A seguito della lisi, ha luogo l'amplificazione del target [sequenza prossima al punto di inserimento di SCCmec (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*)]. Avrà luogo inoltre l'amplificazione dell'IC, un frammento di DNA di 335-bp comprendente una sequenza di 277-bp non trovata in MRSA, a meno che non siano presenti sostanze inibitrici di PCR.

I target DNA amplificati sono rilevati con molecular beacon, un oligonucleotide a singolo filamento a forma di forcina etichettato ad un'estremità con un inibitore e all'altra estremità con un colorante reporter fluorescente (fluoroforo). In assenza del target, la fluorescenza è inibita. In presenza del target, la struttura a forcina si apre all'ibridazione del beacon/target, comportando l'emissione di fluorescenza. Per il rilevamento delle sequenze amplificate MRSA, il molecular beacon contiene il fluoroforo FAM all'estremità 5' e la parte caratteristica della molecola dell'inibitore DABCYL non fluorescente all'estremità opposta dell'oligonucleotide. Per il rilevamento delle sequenze amplificate IC, il molecular beacon contiene il fluoroforo TET all'estremità 5' e l'inibitore DABCYL all'estremità 3'. Ciascun ibrido target beacon diventa fluorescente ad una lunghezza d'onda caratteristica del fluoroforo utilizzato nel particolare molecular beacon. La quantità di fluorescenza in qualsiasi dato ciclo, o nei cicli seguenti, dipende dalla quantità di sequenze amplificate specifiche presenti in tale momento. Lo SmartCycler® esegue simultaneamente il monitoraggio della fluorescenza emessa da ciascun beacon, interpreta tutti i dati e alla fine del programma di ciclo fornisce un risultato finale (vedere Interpretazione dei risultati).

Reagenti

Saggio BD GeneOhm™ MRSA	48 Test	200 Test
Tampone (Sample Buffer)	60 X 1 mL	240 X 1 mL
Soluzione tampone EDTA tris		
Provetta di lisi (Lysis tube)	50 provette	200 provette
Perle di vetro		
Master mix (8 reazioni ognuno) (Master Mix)	8 provette	34 provette
< 0,0005% complesso polimerasi DNA		
< 0,001% controllo interno - DNA non infettivo contenente sequenze di legame di primer MRSA e una sequenza unica per l'ibridazione delle sonde		
< 0,002 % primer		
< 0,002 % sonde molecolari		
< 0,05 % dATP, dCTP, dGTP, dTTP		

Siero albumina bovina

Carboidrati

MgCl₂

< 0,001 % DNA genomico non infettivo da *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990)

DNA di controllo (Control DNA)

8 provette

34 provette

Soluzione tampone EDTA tris

Carboidrati

< 0,001 % DNA di MRSA genomico non infettivo (ATCC 43300)

Diluyente (Diluent)

8 X 700 µL

34 X 700 µL

Soluzione tampone HCl tris

MgCl₂

(NH₄)₂SO₄

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 i sacchetti protettivi sono aperti o danneggiati alla consegna.
- Chiudere rapidamente le borse protettive dei master mix e del DNA di controllo con la chiusura a cerniera dopo ciascun utilizzo.
- 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.
- I reagenti non sono intercambiabili tra i lotti.
- Non riunire 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, in quanto esiste la possibilità di contaminazione che comprometterebbe i risultati del test.
- Evitare la contaminazione microbica e deossiribonucleasi (DNAse) dei reagenti quando si rimuovono aliquote dalle provette. Si consiglia l'utilizzo di puntali per pipettatrice sterili monouso con blocco a filtro privi di DNAse o a spostamento positivo.
- Per evitare la contaminazione dell'ambiente con sequenze amplificate MRSA, non aprire le provette di reazione dopo l'amplificazione.
- Utilizzare un nuovo puntale per ciascun campione o reagente.
- L'esecuzione del saggio al di fuori degli intervalli temporali consigliati può produrre risultati non validi. I dosaggi non eseguiti entro gli intervalli temporali specificati vanno ripetuti.
- È possibile sottoporre a test ulteriori controlli secondo le indicazioni o i requisiti delle normative locali, regionali e/o nazionali o delle organizzazioni di verifica.
- Nei casi in cui il laboratorio esegua anche test PCR a provetta aperta, utilizzare aree di lavoro separate e isolate per le attività di preparazione e amplificazione / rilevamento dei campioni. I rifornimenti e le apparecchiature vanno dedicati a ciascuna area e non vanno spostati da un'area all'altra. Devono essere sempre indossati guanti, che devono essere cambiati prima di passare da un'area all'altra o prima di manipolare reagenti liofilizzati.
- Non congelare il dispositivo di prelievo. Conservare a temperatura ambiente. Se non viene aperto, è stabile fino alla data di scadenza indicata.
- Trattare sempre i campioni come infettivi e in conformità alle procedure sicure di laboratorio quali ad esempio quelle descritte in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³ e nel documento CLSI M29⁴.
- Indossare abbigliamento protettivo e guanti monouso quando si trattano reagenti del kit. Lavare accuratamente le mani dopo aver eseguito il test.
- Non pipettare con la bocca.
- Non fumare, bere né mangiare in aree in cui sono maneggiati i campioni o i reagenti del kit.
- Smaltire i reagenti inutilizzati e i rifiuti in conformità alle normative nazionali, regionali, provinciali e locali.

Materiali forniti

- Tampone (Sample Buffer)
- Provetta di lisi (Lysis tube)
- Master mix (Master Mix)
- DNA di controllo (Control DNA)
- Diluyente (Diluent)

- Provette di reazione SmartCycler®, 25 µL
- Etichette di identificazione dei campioni

Conservazione, trattamento e stabilità

Campioni prelevati

I campioni vanno mantenuti ad una temperatura compresa fra 2 °C e 30 °C durante il trasporto. Proteggere contro il congelamento o l'esposizione a calore eccessivo.

I campioni con tracce di sostanze che potrebbero interferire (ad es. sangue, secrezioni nasali eccessive, ecc.) vanno sottoposti a test entro 24-36 ore. In caso contrario, è possibile conservare i campioni fino a 5 giorni a 2-8 °C prima di eseguire il test. I campioni che possono essere sottoposti a test entro 36 ore possono essere mantenuti a temperatura ambiente (15-30 °C).

Reagenti

Nota: Le condizioni di conservazione devono rispettare le specifiche riportate su ogni busta. Le provette esterne alla loro sacca protettiva e non utilizzate entro il limite temporale specificato vanno scartate.

Componenti del kit		Master Mix e Control DNA (etichette a strisce bianche e rosse)	Lysis tube (tappo giallo)	Sample Buffer, e Diluent (rispettivamente tappo blu , ed etichetta a strisce nere)
Busta sigillata	Temperatura	2-25 °C	2-25 °C	2-25 °C
	Stabilità	Data di scadenza	Data di scadenza	Data di scadenza
Busta aperta	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 sulla busta, chiudere con cura la busta con la chiusura a cerniera dopo ciascun utilizzo e conservare alla temperatura adeguata.

² Sebbene questi reagenti possano essere conservati a temperatura ambiente, vanno conservati assieme ai rispettivi reagenti di accompagnamento dello stesso lotto a 2-8 °C.

³ Purché la sacca sia correttamente chiusa con la chiusura a cerniera dopo ciascun utilizzo.

Componente del kit esterno alla propria busta protettiva			Master Mix e Control DNA (etichette a 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 non utilizzate dopo la scadenza.

Materiali necessari, ma non forniti

- BBL™ CultureSwab™ Liquid Stuart (catalogo Becton Dickinson n. 220099), Copan Transystem™ Liquid Stuart (catalogo Copan Italia International n. 141C.USE), Copan Venturi Transystem™ Liquid Stuart (catalogo Copan Diagnostics Inc. n. 141C.US), HealthLink TransPorter™ single Liquid Stuart (catalogo HealthLink n. 4432)
- BBL™ CHROMagar™ Staph aureus catalogo n. 214982, Mannitol Salt Agar (MSA) catalogo n. 221773 or 221271 o terreno equivalente (opzionale)
- Vortice Genie 2 (Fisher) con supporto per microprovette da 1,5 ml o equivalente; per trattare più campioni, è possibile utilizzare un adattatore con più siti di mantenimento
- Micropipettatrici (intervallo accurato 1-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL)
- Puntali per micropipettatrice sterili privi di DNase con blocco a filtro o a spostamento positivo

- **Pipette di trasferimento sterili a puntale sottile** (ad es. VWR, nn. di catalogo 14670-329, 14670-332) o puntali per micropipettrici sterili privi di DNase con blocco a filtro da 1250 µL (ad es. MATRIX, n. di catalogo 8255)
- **Forbici**
- **Garze**
- **Guanti** monouso, senza polvere
- **Microcentrifuga** per la centrifuga ad alta (deve raggiungere 14.000 x g) e bassa velocità
- **Blocco di riscaldamento a secco** per provette da 1,5 mL o bagno d'acqua
- Ghiaccio o **blocco di raffreddamento** per provette da 1,5 mL
- Strumento per la rimozione dei tappi (ad es. MATRIX, n. catalogo 4469) (opzionale)
- Cronometro o **timer**
- **Sistema iniziale SmartCycler® con software Dx** (blocco di elaborazione, manuale per l'utente, kit degli accessori e computer desktop) (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)

Istruzioni per l'uso

Prelievo di campioni

Al fine di ottenere un campione adeguato, la procedura per il prelievo di campioni deve essere seguita strettamente.

Utilizzando il tampone consigliato con mezzo liquido di Stuart (fare riferimento a Materiali necessari, ma non forniti), i campioni nasali sono prelevati in base alla seguente procedura:

1. Inumidire il tampone con due gocce (circa 50 µL) di siero fisiologico sterile (soluzione salina) o utilizzarlo secco.
2. Inserire con cura il tampone nella narice della paziente (**la punta del tampone deve essere inserito fino a 2,5 cm dal bordo delle narici**).
3. Ruotare il tampone 5 volte.
4. Inserire lo stesso tampone nella seconda narice e ripetere le fasi 2 e 3 per il prelievo del campione.
5. Collocare il tampone nel relativo contenitore.
6. Etichettare il contenitore.
7. Inviare il tampone al laboratorio seguendo le procedure operative standard dell'ospedale.
8. Fare riferimento alla sezione intitolata "Conservazione, trattamento e stabilità – Campioni prelevati" per la conservazione e il trattamento.

Preparazione del campione

Nota: Una provetta di Sample Buffer (Tampone, **tappo blu**) e una Lysis tube (Provetta di lisi, **tappo giallo**) sono necessarie per il test di **ciascun campione**. Per ogni gruppo di 20 campioni da sottoporre a test occorre inoltre una provetta di *Sample Buffer* aggiuntiva (**tappo blu**). Rimuovere il numero necessario di provette dalle rispettive buste protettive, **rimuovere l'aria in eccesso e chiudere rapidamente le buste con la chiusura a cerniera**.

Per maggiori dettagli sulla coltivazione di campioni clinici (tampone) prima di eseguire il saggio BD GeneOhm™ MRSA, consultare la sezione "Coltivazione di campioni clinici, metodo di coltura a striscia".

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

Identificare la provetta di tampone campione sull'etichetta del tappo e/o della provetta.

2. **Rompere lo stelo del campione e chiudere saldamente la provetta.**

Tenere il tampone per lo stelo in prossimità dell'orlo della provetta (utilizzare garza per ridurre al minimo i rischi di contaminazione). Sollevare il tampone di qualche millimetro dal fondo e piegare lo stelo contro il bordo della provetta per romperlo. Metodo alternativo: utilizzare forbici pulite per tagliare lo stelo. Accertarsi che il tappo si chiuda saldamente.

3. **Mescolare con moto vorticoso ad alta velocità per un minuto.**

Per trattare più campioni, è possibile utilizzare un adattatore con più siti di mantenimento.

4. **Trasferire l'intera sospensione di cellule in una provetta di lisi (tappo giallo).**

Utilizzare una pipetta di trasferimento sterile a puntale sottile o una micropipettrici P-1000 con puntale allungato.

Per maggiori dettagli sulla coltivazione dei campioni clinici col tampone restante, consultare la sezione "Coltivazione di campioni clinici, brodo di arricchimento" a pag. 10.

5. **Centrifugare ad alta velocità (tra 14.000 x g e 21.000 x g) per 5 minuti a temperatura ambiente.**

6. **Rimuovere il supernatante e scartarlo.**

Utilizzare una pipetta di trasferimento sterile a puntale sottile; prestare attenzione a non toccare la pastiglia. Utilizzare una nuova pipetta di trasferimento per ciascun campione.

7. **Aggiungere 50 µL di tampone alla provetta di lisi; chiudere saldamente.**

Utilizzare un nuovo puntale per pipettrici per ogni campione. Una provetta di tampone è sufficiente per preparare 20 campioni. Per più di 20 campioni, utilizzare le provette in quantità necessaria (**conservare la soluzione tampone inutilizzata per la procedura di saggio BD GeneOhm™ MRSA**).

8. **Mescolare con moto vorticoso ad alta velocità per 5 minuti.**

Per trattare più campioni, è possibile utilizzare un adattatore con più siti di mantenimento.

9. Centrifugare brevemente la provetta di lisi (una rotazione rapida).

A bassa velocità per 2 - 5 secondi, per portare il contenuto al fondo della provetta.

10. Riscaldare a 95 ± 2 °C per due (2) minuti.

Utilizzare un blocco di riscaldamento a secco per provette da 1,5 mL o bagno d'acqua

11. Mantenere la provetta di lisi su ghiaccio o su un blocco di raffreddamento.

I lisati sono stabili fino a 4 ore a 2-8 °C. Se i lisati non sono stati utilizzati al termine di questo periodo di tempo, conservarli a -20 ± 5 °C per usarli in seguito.

Procedura di saggio BD GeneOhm™ MRSA

Nota: Una provetta di Master Mix ricostituito (etichetta bianca) fornisce reagenti sufficienti per **eseguire 8 reazioni**. Calcolare una provetta SmartCycler® per ogni campione da sottoporre a test e 2 provette SmartCycler® aggiuntive per i Positive e Negative control. **Ogni analisi BD GeneOhm™ MRSA deve includere un (1) Positive control e un (1) Negative control.** Per ogni saggio è richiesto un Control DNA (DNA di controllo, **etichetta a strisce rosse**). Una provetta di Diluent (Diluente, **etichetta a strisce nere**) è necessaria per la ricostituzione di un numero massimo di 3 provette di Master Mix. Rimuovere il numero necessario di provette dalle rispettive buste protettive, **rimuovere l'aria in eccesso e chiudere rapidamente le buste con la chiusura a cerniera**.

Preparare solo il numero di provette SmartCycler® sufficiente a riempire i moduli disponibili I-CORE® sullo strumento SmartCycler®.

1. Collocare le provette di Master Mix necessarie 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 tutte le provette di Master Mix.**

Inserire il puntale della micropipettatrice attraverso il setto del tappo della provetta di Master Mix. Non inserire il puntale troppo in profondità nel tappo. Erogare il diluente. Eliminare successivamente il diluente non utilizzato.

3. Mescolare con moto vorticoso le provette per 5-10 secondi.**4. Collocare le provette SmartCycler® necessarie sul blocco di raffreddamento SmartCycler®.**

Calcolare una provetta SmartCycler® per ogni campione e 2 ulteriori provette SmartCycler® per i controlli. **Evitare di toccare le finestre di rilevamento ottico ai bordi inferiori della provetta e l'area inferiore a forma di rombo.**

I seguenti passaggi DEVONO essere eseguiti nell'arco di un'ora:**5. Aggiungere 25 µL di Master Mix ricostituito alle provette SmartCycler®.**

Rimuovere il setto coperchio prima di pipettare il reagente. Erogare il liquido nel serbatoio (parte superiore) delle provette SmartCycler®. Identificare le provette SmartCycler® sul tappo. È possibile utilizzare le etichette di identificazione dei campioni (fornite col kit). Il Master Mix non utilizzato e **conservato immediatamente a 4-8 °C per un massimo di 3 ore lontano dalla luce** può essere impiegato, se necessario, per ripetere immediatamente i test in caso di risultati non chiari. Dopo tale periodo eliminare il Master Mix non utilizzato.

6. Aggiungere 2,8 µL di ciascun campione lisato ad una diversa provetta SmartCycler® precedentemente riempita; chiudere le provette.

Prestare attenzione a non aspirare le perle quando si pipetta nella provetta di lisi. Dopo l'aggiunta del campione, pipettare in alto e in basso 2-3 volte nel serbatoio per accertarsi del trasferimento del volume completo. Usare un nuovo puntale per micropipettatrice per ogni campione.

7. Collocare una provetta di DNA di controllo (etichetta a strisce rosse) su ghiaccio o su un blocco di raffreddamento per provette da 1,5 mL.**8. Aggiungere 225 µL di tampone (tappo blu) alla provetta di Control DNA.**

Utilizzare la provetta di tampone dal punto 7 del protocollo per la preparazione dei campioni. Inserire il puntale della micropipettatrice attraverso il setto del tappo della provetta di DNA di controllo. Non inserire il puntale troppo in profondità nel tappo. Erogare il tampone.

9. Mescolare con moto vorticoso la provetta per 5-10 secondi.**10. Aggiungere 2,8 µL del DNA di controllo ricostituito alla penultima provetta SmartCycler® (Positive control); chiudere la provetta.**

Dopo l'aggiunta del DNA, pipettare in alto e in basso 2-3 volte nel serbatoio per accertarsi del trasferimento del volume completo. Identificare la provetta come positive control. Il DNA di controllo non utilizzato e **conservato immediatamente a 4-8 °C per un massimo di 3 ore** può essere impiegato per la preparazione di un nuovo Positive control in caso di ripetizione immediata del test per eventuali risultati non chiari. Dopo tale periodo eliminare il DNA di controllo non utilizzato.

11. Aggiungere 2,8 µL di tampone (tappo blu) all'ultima provetta SmartCycler® (Negative control); chiudere la provetta.

Utilizzare la provetta di tampone dal punto 7 del protocollo per la preparazione dei campioni. In tal modo si controlla l'eventuale contaminazione PCR che potrebbe verificarsi durante la manipolazione dei campioni. Identificare la provetta come Negative control. Eliminare successivamente il tampone non utilizzato.

12. Centrifugare tutte le provette di reazione per 5-10 secondi.

Utilizzare la microcentrifuga appositamente adattata fornita con lo strumento SmartCycler®.

13. Mantenere le provette a 2-8 °C sul blocco di raffreddamento dello SmartCycler® prima del caricamento sullo strumento.

I lisati restanti vanno congelati a -20 ± 5 °C per l'utilizzo successivo, se necessario.

14. Creare un'analisi col protocollo di saggio BD GeneOhm™ MRSA.

Fare riferimento al Manuale per l'operatore del software SmartCycler® Dx se necessario. Prima di avviare l'analisi vanno immessi i parametri di identificazione per i campioni.

15. Inserire ciascuna provetta di reazione in un modulo I-CORE® dello SmartCycler® e chiudere il coperchio dell'I-CORE®.

Collocare i controlli positivo e negativo nella rispettiva posizione appropriata (vedere la sezione intitolata "Controllo della qualità"). Premere verso il basso tutte le provette saldamente in posizione.

16. Avviare l'analisi.

Controllo della qualità

Controlli positivi e negativi

Le procedure di controllo della qualità sono progettate in modo da controllare le prestazioni del saggio. Il positive control ha lo scopo di controllare sostanziali problemi importanti ai reagenti. Il negative control è utilizzato per rilevare la contaminazione del reagente o quella ambientale (o trascinamento) da parte di sequenze amplificate di MRSA o di DNA di MRSA. I positive e negative control sono controlli di saggio (controlli dell'analisi). Un controllo non valido invalida l'analisi. Infine, un controllo interno incorporato in ciascuna miscela di reazione ha lo scopo di monitorare l'inibizione della PCR in ciascun campione e l'integrità del reagente.

Un positive control e un negative control devono essere inclusi in ciascuna analisi del saggio sullo SmartCycler®. Il software assegna automaticamente la posizione dei controlli sullo strumento (fare riferimento al Manuale per l'operatore del software SmartCycler® Dx).

Controlli di trattamento dei campioni

È possibile testare i ceppi di controllo secondo le indicazioni o i requisiti delle normative locali, regionali e/o nazionali o delle organizzazioni di verifica. Un ceppo di MRSA di riferimento (ad es. American Type Culture Collection, ATCC 43300) o un isolato clinico ben caratterizzato di MRSA possono essere utilizzati come controllo di trattamento dei campioni, mentre una coltura di *Staphylococcus aureus* sensibile alla meticillina (ad es. ATCC 29213) o qualsiasi coltura non di *Staphylococcus aureus* (ad es. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990) può essere utilizzata come controllo negativo esterno.

Risospendere colonie isolate da una piastra agar di sangue di pecora da 18 a 24 ore al 5% (ad es. BBL™ Trypticase Soy Agar (TSA II) con sangue di montone al 5%, Catalogo BD n. 221239 o 221261) ad una torbidità di 0,5 McFarland (~1,5 X 10⁸ CFU/mL). Diluire con soluzione salina per ottenere una sospensione di ~10⁶ CFU/mL. Immergere il tampone consigliato con mezzo liquido di Stuart (fare riferimento a Materiali necessari, ma non forniti) nella sospensione batterica, premere per far uscire il fluido in eccesso, collocare il tampone nel relativo contenitore (per consentire il contatto col mezzo di trasporto) e lasciare riposare a temperatura ambiente per 5 minuti. Trattare e sottoporre a test come un campione clinico (fare riferimento alle sezioni "Preparazione del campione" e "Procedura di saggio BD GeneOhm™ MRSA"), compresi i controlli. Tutti i campioni e i controlli dovranno fornire risultati validi (nessun controllo non valido positivo o negativo e nessun controllo interno non riuscito).

Per indicazioni generali sul controllo della qualità, l'utente può fare riferimento a CLSI MM3⁵ e C24⁶.

Coltivazione di campioni clinici

Per eseguire un test di 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 svolgere l'analisi con BD GeneOhm™ MRSA utilizzando il metodo coltura a striscia, oppure col tampone successivamente alla procedura di preparazione del campione tramite una fase di arricchimento.

Metodo di coltura a striscia

Questo metodo di coltivazione può essere eseguito prima della procedura di preparazione del campione per BD GeneOhm™ MRSA.

1. Rimuovere il dispositivo di prelievo (tampone) dal relativo contenitore.
2. Inoculare una piastra di agar di sale di mannitolo (mannitol salt agar, MSA) rigando il primo quadrante della piastra.
3. Riporre il tampone nel relativo contenitore o romperlo in una provetta di tampone (tappo blu) di BD GeneOhm™ MRSA e continuare in base alle istruzioni riportate nella sezione "Preparazione del campione".
4. Con un ago ad anello, rigare l'inoculo nei restanti quadranti della piastra MSA.
5. Incubare la piastra MSA per 24-48 ore a 35 °C.
6. Identificare e confermare le colonie di *S. aureus* ed eseguire il test della resistenza alla meticillina secondo le modalità standard.

Brodo di arricchimento

Questo metodo di coltivazione può essere eseguito con tamponi lasciati nella provetta della soluzione tampone in seguito al trasferimento della sospensione di cellule nella provetta di lisi. I tamponi possono essere conservati a 2-8 °C in una provetta di tampone chiusa fino a 24 ore prima della coltivazione; il recupero potrebbe non riuscire con campioni clinici che contengono basse quantità di MRSA.

1. Aggiungere 1,0 mL di brodo di arricchimento alle provette di tampone che contengono il tampone.
Si consiglia di utilizzare brodo al triptone di soia (TSB, tryptic soy broth) con aggiunta di 6,5% di NaCl.
2. Incubare per 24-48 ore a 35 °C.
3. Eseguire la sottocoltura su un adeguato mezzo solido per 24-48 ore a 35 °C.
Si consiglia di utilizzare una piastra agar di sangue di pecora al 5%.
4. Identificare e confermare le colonie di *S. aureus* ed eseguire il test della resistenza alla meticillina secondo le modalità standard.

Interpretazione dei risultati

L'algoritmo decisionale per il saggio BD GeneOhm™ MRSA è incorporato nel software SmartCycler®. L'interpretazione dei risultati del saggio è eseguita in base ai seguenti criteri:

Risultato del saggio riportato	Risultato IC riportato	Interpretazione del risultato ¹
NEG (NEGATIVO)	PASS (SUPERATO)	Nessun DNA di MRSA rilevato, colonizzazione nasale di MRSA improbabile
POS (POSITIVO)	NA (NA)	DNA di MRSA rilevato, colonizzazione nasale di MRSA
Unresolved (Non chiaro)	FAIL (NON RIUSCITO)	Non chiaro—campione inibitore o problema del reagente
ND (ND)	ND (ND)	Non determinato a causa di problema del modulo I-CORE® (con codici di avvertenza o di errore ²)

IC - Internal Control (Controllo interno); NA - non applicabile; ND - non determinato

¹ I risultati BD GeneOhm™ MRSA possono essere utilizzati per decidere in merito all'isolamento e ai livelli di precauzione in base ai programmi e alle pratiche istituzionali.

² Fare riferimento al Manuale per l'operatore del software SmartCycler® Dx per l'interpretazione dei codici di avvertenza e di errore.

Un controllo positivo o negativo non valido invalida l'analisi del saggio. In tali casi, i risultati del saggio ottenuti per tale analisi sono non validi e non devono essere riportati. La mancata validità di un'analisi del saggio o i codici di errore dello strumento o le avvertenze sono riportati su schermo e sui rapporti. Prima di riportare i risultati MRSA, verificare sempre che l'analisi del saggio sia valida.

Fare riferimento al Manuale per l'operatore del software SmartCycler® Dx per la stampa dei risultati.

Analisi del saggio non valida

Utilizzando lisati congelati, preparare nuove provette di reazione per tutti i campioni clinici entro tale analisi del saggio assieme a nuove provette di controllo.

Campioni non risolti

Ripetere il test col corrispondente lisato congelato del campione. È stato dimostrato che l'effetto del ciclo di congelamento-scongelo è di ridurre le sostanze inibitorie di PCR.

Campione non determinato a causa di problema del modulo I-CORE®

Ripetere il test col corrispondente lisato congelato del campione. Per l'interpretazione dei messaggi di codice di avvertenza o di errore, fare riferimento al Manuale per l'operatore del software SmartCycler® Dx.

Limiti della procedura

- Le prestazioni di questo test sono state stabilite con lo strumento SmartCycler®, con campioni nasali prelevati da pazienti già ricoverati o al momento del ricovero e con campioni prelevati con Copan Venturi Transystem® con mezzo liquido di Stuart. Per questo motivo, questo prodotto può essere utilizzato solo con lo SmartCycler®; inoltre, non si consiglia l'utilizzo di un sistema di prelievo e trasporto di campioni diverso da quelli elencati nella sezione Materiali necessari, ma non forniti. Altre sostanze cliniche non sono state valutate e le caratteristiche prestazionali di questo test sono ignote su altri tipi di campioni o popolazioni di pazienti.
- Possono anche verificarsi risultati di test negativi da prelievo, trattamento o conservazione impropri di campioni, presenza di inibitore, errore tecnico, miscela di campioni o poiché il numero di organismi nel campione è inferiore alla sensibilità analitica del test. Un'attenta conformità alle istruzioni fornite in questo inserto e nel Manuale per l'operatore del software SmartCycler® Dx è necessaria per evitare risultati erranei. L'utilizzo di questo test va limitato al personale addestrato alla procedura e all'utilizzo dello SmartCycler®.
- Sebbene non vi sia alcuna esigenza di preparazione dei reagenti e la principale operazione tecnica sia la pipettatura, una buona tecnica di laboratorio è essenziale per la corretta esecuzione di questo saggio. A causa dell'elevata sensibilità analitica di questo test, va prestata estrema attenzione a preservare la purezza di tutti i reagenti, particolarmente nei casi in cui più aliquote sono prelevate da una provetta.
- Lo screening determina lo stato della colonizzazione ad un dato momento e può variare a seconda del trattamento del paziente (ad es. regime di decolonizzazione), dello stato del paziente (ad es. MRSA senza dispersione attiva) o dall'esposizione ad elevati rischi ambientali (ad es. contatto con portatori di MRSA, ricovero prolungato). Il monitoraggio dello stato di colonizzazione deve essere condotto in base alle politiche dell'ospedale.
- I risultati del saggio BD GeneOhm™ MRSA vanno utilizzati come ausilio agli sforzi per il controllo delle infezioni nosocomiali per identificare i pazienti che richiedono maggiori precauzioni. Il test non è destinato ad individuare i pazienti con infezione da stafilococco. I risultati non devono essere utilizzati per guidare o monitorare il trattamento di infezioni da MRSA.
- Un risultato BD GeneOhm™ MRSA positivo non indica necessariamente un fallimento del trattamento di eradicazione, poiché il DNA potrebbe persistere. Un risultato negativo in seguito ad un precedente risultato positivo può indicare il successo del trattamento di eradicazione oppure può essere dovuto a dispersione intermittente.
- I risultati del saggio BD GeneOhm™ MRSA potrebbero talvolta essere non chiari o invalidati a causa di un controllo non valido e potrebbero richiedere un nuovo test che potrebbe comportare un ritardo nell'ottenimento dei risultati.
- Un risultato positivo del test non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. È tuttavia presuntivo per la presenza di MRSA, poiché BD GeneOhm™ MRSA rileva contemporaneamente la cassetta SCCmec (che porta il gene *mecA*) e una sequenza di *S. aureus* specifica che si trova all'interno del gene *orfX*. BD GeneOhm™ MRSA non rileva direttamente il gene *mecA* né la proteina penicillina-legante (PBP 2a) codificata da tale gene.

- È stato mostrato che BD GeneOhm™ MRSA rileva vari tipi di MRSA che sono stati associati alle infezioni contratte in ospedali e comunità; le valutazioni non hanno esaminato i tratti fenotipico e genotipico degli isolati MRSA per identificare i ceppi che possono essere più virulenti in ambiente ospedaliero.
- Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda potrebbero influenzare il rilevamento di varianti di MRSA nuove o sconosciute, dando un risultato negativo col saggio BD GeneOhm™ MRSA.

Sostanze interferenti

Tra le potenziali sostanze interferenti sono da annoverare, in modo non limitativo: sangue, secrezioni nasali/muco eccessivi, decongestionanti e sostanze occasionalmente utilizzate per alleviare secchezza e/o irritazioni nasali. La presenza di eccessive secrezioni nasali e sangue potrebbe inibire PCR e fornire risultati non chiari.

In uno studio di ricerca condotto su 786 campioni nasali, le sostanze potenzialmente interferenti sono state riportate per il 43% dei campioni prelevati. In totale, erano presenti 35 (4,5%) campioni non chiari. Di questi 35 campioni, non esisteva alcuna sostanza potenzialmente interferente riportata per 24 campioni, secrezioni nasali per 10 e una combinazione di sostanze per un campione. Ventisette (27) sono stati risolti con un ciclo di congelamento-scongelo. Per gli 8 campioni che non è stato possibile risolvere, non si osservava alcuna sostanza potenzialmente interferente per 4 campioni, secrezioni nasali per tre campioni e una combinazione di sostanze per un campione.

Valori attesi

Gli esseri umani sono un serbatoio naturale di *S. aureus*. La colonizzazione può essere transeunte o persistente e può durare anni. Nella popolazione generale sono stati riportati tassi di trasporto di *S. aureus* nasale del 25-30%, mentre nella popolazione ambulatoriale o ricoverata sono stati riportati tassi del 10-40%. L'*S. aureus* meticillino-resistente rappresenta attualmente oltre il 50% degli isolati di *S. aureus* contratto in ospedale in alcuni ospedali del Nord America².

Nello studio di ricerca per il saggio BD GeneOhm™ MRSA, il tasso complessivo di trasporto di *S. aureus* nasale determinato da coltura (*S. aureus* isolato in campioni con una delle due tecniche di coltura) era del 36,1% con un intervallo di 33-40%. Il cinquantuno per cento (51%) degli isolati di *S. aureus* era meticillino-resistente col metodo agar schermo oxacillina [piastra agar Mueller-Hinton con aggiunta di oxacillina (6 µg/mL) e NaCl (4% w/v)] per un tasso complessivo di trasporto nasale di MRSA del 18,6%. Col saggio BD GeneOhm™ MRSA, il tasso complessivo di trasporto nasale di MRSA era del 20,3%.

Caratteristiche prestazionali

Prestazioni cliniche

Le caratteristiche prestazionali del saggio BD GeneOhm™ MRSA sono state determinate in uno studio di ricerca prospettivo a più siti: 4 centri medici, due in Canada e due negli Stati Uniti, che avevano avviato un programma di screening MRSA basato su colture. Per poter partecipare allo studio, i pazienti dovevano fornire consenso scritto, essere idonei per lo screening MRSA in base alle politiche dell'ospedale e non aver ricevuto terapia antibiotica per MRSA. I criteri dello screening comprendevano (ma non vi erano necessariamente limitati): screening sistematico di tutti i pazienti al ricovero, infezione o trasporto MRSA precedente, trasferimento da un'altra istituzione, ricovero ospedaliero prolungato o anamnesi di ricovero prolungato e contatto con un portatore di MRSA.

Il metodo di riferimento comprendeva un'analisi iniziale con il test agar schermo oxacillina dopo crescita selettiva su agar di sale di mannitolo. I campioni negativi per MRSA sono stati sottoposti ad un'ulteriore analisi che comprendeva una fase di arricchimento in brodo di tripticasi di soia (TSB) contenente 6,5% di NaCl, seguita dal test agar schermo oxacillina. Un campione positivo alla coltura di MRSA era definito un campione positivo per MRSA da una delle due tecniche di coltura. Un campione negativo alla coltura di MRSA era definito come un campione negativo per MRSA da entrambe le tecniche di coltura.

Per il metodo di screening con crescita selettiva su agar di sale di mannitolo (mannitol salt agar, MSA), le piastre sono state inoculate direttamente con campioni da tampone nasale e in seguito incubate a 35 °C per 24-48 ore. Se necessario, le colonie presuntive di *S. aureus* sono state sottocoltivate a 5% di piastre agar di sangue di pecora e incubate per 24-48 ore a 35 °C. Le colonie isolate in altro modo sono state sottoposte a test direttamente dalle piastre MSA. Le colonie di stafilococco presuntive sono state confermate con un saggio di agglutinazione di lattice o da un test di coagulasi in provetta. Le colonie di *S. aureus* confermate sono state sottoposte a test su piastra agar Mueller-Hinton con aggiunta di oxacillina (6 µg/mL) e NaCl (4% w/v) incubate a 33-35 °C (non oltre i 35 °C) per 24 ore intere. Nei casi in cui il metodo di screening MSA dava un risultato MRSA negativo, è stato eseguito anche uno screening MRSA con una fase di arricchimento in brodo al triptone di soia (tryptic soy broth, TSB) contenente 6,5% di NaCl. A tale scopo, i brodi TSB sono stati inoculati dopo rivestimento diretto su MSA, incubati per tutta la notte a 35 °C, sottocoltivati a piastre agar di sangue di pecora al 5% per 24-48 ore a 35 °C e le piastre sono state conservate a 2-8 °C per eseguire i test se necessario. La conferma delle colonie presuntive e la determinazione della resistenza alla meticillina sono state eseguite come descritto in precedenza. In un sito dello studio, ogni campione è stato testato con entrambi i metodi di screening delle colture.

In totale, 786 campioni nasali prelevati col tampone consigliato con mezzo liquido si Stuart (fare riferimento a Materiali necessari, ma non forniti) sono stati sottoposti a screening per MRSA col metodo di coltura di riferimento descritto in precedenza e col saggio BD GeneOhm™ MRSA. Rispetto al metodo di coltura di riferimento, BD GeneOhm™ MRSA ha identificato il 92,5% dei campioni positivi per MRSA con una delle due tecniche di coltura e il 96,4% dei campioni negativi con entrambe le tecniche di coltura (tabelle 1 e 2). Per la popolazione sottoposta a test, ciò si è tradotto in un valore predittivo negativo del 98,2% e in un valore predittivo positivo dell'85,4%.

Tabella 1. Risultati ottenuti col saggio BD GeneOhm™ MRSA confrontati col metodo di riferimento¹.

		BD GeneOhm™ MRSA		Totale
		Positivo	Negativo	
Tecniche di coltura	Positivo	135	11	146
	Negativo	23	609	632
	Totale	158	620	778

¹ Otto (8) campioni che davano inizialmente risultati non chiari restavano non chiari ad un nuovo test con saggio BD GeneOhm™ MRSA e non sono stati inclusi nella tabella. Tutti e 8 erano negativi alla coltura.

Quattordici (14) dei 23 campioni negativi alla coltura ma positivi a BD GeneOhm™ MRSA sono risultati positivi alla coltura MRSA dopo ulteriori ricerche, con un totale di 149 campioni positivi alla coltura e positivi a BD GeneOhm™ MRSA su un totale di 160 campioni positivi alla coltura. Per 2 dei campioni positivi alla coltura ma negativi a BD GeneOhm™ MRSA, non è stato possibile dimostrare che nessuno degli isolati che mostrava resistenza alla meticillina su piastre agar di oxacillina portasse il gene *mecA* quando sono stati sottoposti a test col saggio PCR specifico per *mecA* descritto da Martineau et al.⁸.

Tabella 2. Prestazioni del saggio BD GeneOhm™ MRSA ottenute dai siti dello studio confrontate col metodo di riferimento

	Sensibilità (95% CI) ¹	Specificità (95% CI) ¹	N. di campioni non chiari ²	N. di analisi non valide/totale
Sito 1	86,8% (n=38) (71,9-95,6%)	99,6% (n=261) (97,9-100%)	6	0/26
Sito 2	100% (n=30) (88,4-100%)	98,0% (n=102) (93,1-99,8%)	16	0/21
Sito 3	89,3% (n=28) (71,8-97,7%)	90,8% (n=119) (84,1-95,3%)	11	1/15
Sito 4	94,0% (n=50) (83,5-98,7%)	94,0% (n=150) (88,9-97,2%)	2	2/27
Totale	92,5% (n=146) (86,9-96,2%)	96,4% (n=632) (94,6-97,27%)	35	3/89

¹ Intervalli di confidenza binomiale 95%.² Tutti i campioni erano non chiari a causa di controlli interni non superati indicativi di inibizione o di problemi del reagente. Ventisette (27) dei 35 sono stati risolti con un nuovo test.

La tipizzazione SCCmec di campioni positivi alla coltura MRSA secondo Oliviera e de Lencastre⁹ ha rivelato campioni di tipo I, II e IV. Dallo studio non sono stati isolati campioni SCCmec di tipo III. Tuttavia, in uno studio separato i ceppi di riferimento e altri isolati clinici di tutti i tipi SCCmec sono stati sottoposti a test e rilevati col saggio BD GeneOhm™ MRSA.

Le prestazioni ottenute dai siti dello studio per BD GeneOhm™ MRSA e le tecniche di coltura individuali confrontate con il metodo di coltura di riferimento (entrambe le tecniche di coltura) sono riportate nelle Tabelle 3 e 4.

Tabella 3. Risultati ottenuti per il saggio BD GeneOhm™ MRSA e ogni tecnica di screening delle colture con campioni positivi per MRSA col metodo di coltura di riferimento.

Sito	Prevalenza di MRSA ¹	Sensibilità (95% CI) ²		
		BD GeneOhm™ MRSA	OxaMSA ³	OxaTSB ⁴
Sito 1	12,7% (38/300)	86,8% (71,9-95,6%)	81,6% (65,7-92,3%)	ND
Sito 2	21,7% (30/138)	100% (88,4-100%)	93,3% (77,9-99,2%)	ND
Sito 3	18,9% (28/148)	89,3% (71,8-97,7%)	64,3% (44,1-81,4%)	ND
Sito 4	25,0% (50/200)	94,0% (83,5-98,7%)	80,0% (66,3-90,0%)	78,0% (64,0-88,5%)
Totale	18,6% (146/786)	92,5% (86,9-96,2%)	80,1% (72,7-86,3%)	ND

¹ Determinato dai risultati ottenuti col metodo di coltura di riferimento (combinazione di OxaMSA e OxaTSB)² Intervalli di confidenza binomiale 95%.³ Test agar schermo oxacillina dopo crescita selettiva su MSA.⁴ Test agar schermo oxacillina dopo arricchimento in TSB con 6,5% di NaCl. Il sito 4 ha sottoposto a test tutti i campioni con entrambe le tecniche di coltura, mentre i restanti siti hanno sottoposto a test solo i campioni negativi col metodo di coltura OxaMSA.

Tabella 4. Risultati ottenuti per il saggio BD GeneOhm™ MRSA e ogni tecnica di screening delle colture con campioni negativi per MRSA col metodo di coltura di riferimento.

Sito	MSSA ¹	Specificità (95% CI) ²		
		BD GeneOhm™ MRSA	OxaMSA ³	OxaTSB ⁴
Sito 1	73/262	99,6% (97,9-100%)	100% (98,6-100%)	ND
Sito 2	25/108	98,0% (93,2-99,8%)	100% (96,4-100%)	ND
Sito 3	24/120	90,8% (84,1-95,3%)	100% (96,9-100%)	ND
Sito 4	16/150	94,0% (88,9-97,2%)	100% (97,6-100%)	100% (97,6-100%)
Totale	138/640	96,4% (94,6-97,7%)	100% (99,4-100%)	ND

¹ Numero di MSSA nella popolazione totale negativa alla coltura MRSA² Intervalli di confidenza binomiale 95%.³ Test agar schermo oxacillina dopo crescita selettiva su MSA⁴ Test agar schermo oxacillina dopo arricchimento in TSB con 6,5% di NaCl. Il sito 4 ha sottoposto a test tutti i campioni con entrambe le tecniche di coltura, mentre i restanti siti hanno sottoposto a test solo i campioni negativi col metodo di coltura OxaMSA.**Specificità analitica**

È stato testato il DNA genomico di 37 ceppi ATCC che rappresentano specie fitogeneticamente collegate a *S. aureus* e membri della flora nasale saprofita, 27 ceppi (15 ceppi di riferimento e 12 isolati clinici) di stafilococchi negativi alla coagulasi sensibili alla meticillina e 44 ceppi (due ceppi di riferimento e 42 isolati clinici) di stafilococchi negativi alla coagulasi meticillino-resistenti. La specificità era del 100%.

Come mostrato nella tabella 4, i siti dello studio ritenevano che 138 campioni analizzati con tecniche di coltura contenessero *S. aureus* sensibile alla meticillina. Sette (7) hanno dato risultati positivi col saggio BD GeneOhm™ MRSA. Dopo ulteriori ricerche condotte con tecniche di coltura più potenti, 4 hanno mostrato di contenere effettivamente MRSA.

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica (limite di rilevamento o LOD (Limit of Detection)) del saggio BD GeneOhm™ MRSA è stata determinata con 7 ceppi di MRSA. La coltura quantificata e il DNA genomico purificato diluito nella tampone del saggio BD GeneOhm™ MRSA sono stati sottoposti a test in 5 replicati. Il LOD è definito come la minima concentrazione alla quale almeno il 92,5% dei replicati è risultato positivo al test.

Il LOD del saggio BD GeneOhm™ MRSA è 15 coppie di genomi per reazione. Il LOD in CFU è 5 CFU/reazione. Prendendo in considerazione il fattore di diluizione dovuto al trattamento dei campioni, ciò si traduce in circa 325 CFU/tampone.

Riproducibilità

Un gruppo di 10 campioni simulati con concentrazioni variabili di MRSA e dei due controlli (positivo e negativo) del saggio BD GeneOhm™ MRSA è stato sottoposto a test in triplicato in tre giorni diversi a ciascuno dei 3 siti (10 campioni più 2 controlli sottoposti a test X 3 X 3 giorni X 3 siti). Questa operazione è stata ripetuta con 3 lotti di reagenti.

Tabella 5. Dati cumulativi di riproducibilità dello studio

ID del campione	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3	Accordo totale	Accordo % totale
Negativo	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Negativo	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Debolmente positivo ¹	19/27	18/27	16/27	53/81	65%
Fortemente positivo	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Fortemente positivo	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Debolmente positivo ¹	14/27	13/27	18/27	45/81	56%
Positivo	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positivo	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Debolmente positivo	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positivo	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positive control	26/27	27/27	27/27	80/81	99%
Negative control	26/27	27/27	27/27	80/81	99%
Accordo totale	301/324	301/324	304/324	906/972	93%
Accordo % totale	93%	93%	94%	93%	

¹ Campioni con CFU al di sotto del limite di rilevamento del saggio.

References / Références / Referenzen / Referencias / Riferimenti

- ¹ Centers for Disease Control and Prevention. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin or soft tissue infection in a state prison. Mississippi, 2000. MMWR 2001; 50:919-922.
- ² National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. Am J Infect Control. 2002; 30:458-475.
- ³ Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
- ⁴ Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline – Second edition. Document M29 (Refer to the latest edition).
- ⁵ Clinical and Laboratory Standards Institute. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline. CLSI document MM3-A2 (Refer to the latest edition).
- ⁶ Clinical and Laboratory Standards Institute. Statistical Quality Control for Quantitative Measurements: Principles and Definitions; Approved Guideline – Second Edition, Document C24 (Refer to the latest edition).
- ⁷ Jernigan, J.A. *et al.* Prevalence of and risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at the time of hospital admission. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24:409-414.
- ⁸ Martineau, F. *et al.* Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 2000; **44**(2) : 231-238
- ⁹ Oliveira, D.C. and H. de Lencastre. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:2155-2161.

This kit is sold under license from the Public Health Research Institute of the City of New York, Inc. and may be used under the PHRI patent rights only for human *in vitro* clinical diagnostics.

The purchase of this product allows the purchaser to use it for amplification and detection of nucleic acid sequences for providing human *in vitro* diagnostics. No general patent or other license of any kind other than this specific right of use from purchase is granted hereby.

Cette trousse est vendue sous licence du « Public Health Research Institute of the City of New York, Inc. » et peut être utilisée uniquement pour du diagnostic clinique *in vitro* chez l'humain.

L'achat de ce produit permet à l'acheteur de l'utiliser pour procéder à une amplification et à une détection de séquences d'acides nucléiques lors de diagnostics cliniques *in vitro* chez l'humain. Aucun brevet général ou licence, autre que le droit d'utilisation spécifique conféré par l'achat, n'est octroyé par les présentes.

Dieser Test wird durch eine Lizenz vom Public Health Research Institute [Öffentliches Gesundheits-Forschungsinstitut] von der Stadt von New York, Inc. verkauft, und darf nur unter den PHRI-Patentrechten, und nur für menschliche, klinische *In-Vitro*-Diagnostik angewandt werden.

Der Kauf dieses Produktes gestattet dem Käufer die Verstärkung und Feststellung von Nukleinsequenzen zum Zweck von menschlicher *In-Vitro*-Diagnostik. Kein generelles Patent und keine Lizenz jeglicher anderen Art ausser diesem spezifischen Gebrauchsrecht aus dem Verkauf wird hiermit abgetreten.

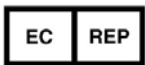
Este equipo se vende bajo licencia del Public Health Research Institute of the City of New York, Inc. (PHRI) y puede ser utilizado únicamente para diagnóstico clínico *in vitro* en seres humanos, según los derechos de patente del PHRI.

La compra de este producto permite al comprador utilizarlo para la amplificación y detección de secuencias de ácido nucleico en los diagnósticos clínicos *in vitro* en seres humanos. No se otorga por el presente documento ninguna patente general ni ninguna otra licencia de cualquier tipo, aparte del derecho de utilización específico conferido por la compra.

Questo kit è venduto sotto licenza dal Public Health Research Institute della City of New York, Inc. e può essere utilizzato nell'ambito dei diritti del paziente PHRI solo per la diagnostica clinica umana *in vitro*.

L'acquisto di questo prodotto consente all'acquirente di utilizzarlo per l'amplificazione e il rilevamento delle sequenze di acidi nucleici per la fornitura di diagnostica umana *in vitro*. Con la presente non è concesso alcun brevetto generale o altra licenza di alcun tipo diversa da questo specifico diritto di utilizzo conferito dall'acquisto.

Index of symbols / Table des symboles / Symbolindex / Índice de símbolos / Indice dei simboli

Symbol / Symbole / Simbolo / Simbolo	Meaning / Signification / Bedeutung / Significado / Significato
REF	Catalog number / Référence du Catalogue / Bestellnummer / Número de Catálogo / Numero di catalogo
	In Vitro Diagnostic use / Aux fins de Diagnostic In Vitro / In-vitro-Diagnostika / Para fines de Diagnóstico in Vitro / Uso diagnostico In Vitro
	Manufacturer / Fabricant / Hersteller / Fabricante / Produttore
	Authorized european representative / Représentant européen autorisé / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft / Representante europeo autorizado / Rappresentante europeo autorizzato
	Contains sufficient for "n" tests / Contenu suffisant pour « n » tests / Inhalt ausreichend für « n » Prüfungen / Contiene cantidad suficiente par « n » pruebas / Il contenuto è sufficiente per "n" test
	Batch code / Code de lot / Chargenbezeichnung / Código de lote / Codice del lotto
	Use by / Utiliser avant / Verwendbar bis / Fecha de caducidad / Data di scadenza
	Temperature limitation / Limites de température / Temperaturbegrenzung / Limites de temperatura / Limiti di temperatura
	Protect from light and moisture / Conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité / Vor Licht und Feuchtigkeit schützen / Conservar al abrigo de la luz y la humedad / Proteggere da luce e umidità
	Reseal bag after use / Refermer le sac après utilisation / Beutel nach Gebrauch wieder verschließen / Volver a cerrar la bolsa después de la utilización / Richiudere la sacca dopo l'uso
	Consult instructions for use / Se référer aux instructions d'utilisation / Gebrauchsanweisung beachten / Ver las instrucciones de utilización / Consultare le istruzioni per l'uso
	Box 1 of 3 / Boîte 1 de 3 / Kasten 1 von 3 / Caja 1 de 3 / Confezione 1 di 3



Customer Service/Service à la Clientèle/Kundendienst/ Servicio de Atención al Cliente/ Servizio Assistenza:
1.888.436.3646



BENEX Limited, Bay K 1a/d,
Shannon Industrial Estate,
Shannon, County Clare,
Ireland



BD Diagnostics,
2555 boul. Parc-Technologique
Québec, Qc, Canada, G1P 4S5