

Xpert[®] MRSA

REF GXMRSA-100N-10

REF GXMRSA-120

Copyright © Cepheid. Cepheid®, the Cepheid logo, GeneXpert®, and Xpert® are trademarks of Cepheid.

FAM™ is a trademark of Life Technologies Corporation.

Texas Red® is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

This product is sold under license from Molecular Probes, Inc.

This product is licensed under US Patent Nos. 5,582,989 and 5,851,767 and corresponding claims of any non-US counterpart(s) thereof.

This product is sold under license from bioMérieux under US Patent No. 6,156,507 and corresponding claims of any non-US counterpart(s) thereof.

The purchase of this product includes a limited, non-transferable license under U.S. Patents Nos. 6,787,338; 6,503,720 and 6,303,305, and claims 9, 10, 11, 56, 76, 80 and 107 of U.S. Patent No. 6,174,670, and corresponding claims in patents and patent applications outside the United States, owned by the University of Utah Research Foundation and licensed to Idaho Technology, Inc., to use only this amount of product and only in an instrument marketed, distributed, sold, leased or otherwise transferred using a Cepheid trademark. No right is conveyed, expressly, by implication or estoppel, under any other patent or patent claims owned by the University of Utah Research Foundation or Idaho Technology, Inc. Without limiting the foregoing, no right, title or license is herein granted with respect to the uses that are proprietary to Idaho Technology or the University of Utah Research Foundation of fluorescence double stranded nucleic acid binding dyes, specifically including but not limited to SYBR® Green I, LCGreen® I, or LCGreen® Plus.

The purchase of this product includes a limited, non-transferable license under U.S. Patent No. 7,449,289, owned by GeneOhm Sciences Canada, Inc (a subsidiary of Becton, Dickinson and Company), to use such product for human IVD use with a GeneXpert® instrument. No right under U.S. Patent No. 7,449,289 is conveyed, expressly, by implication, or by estoppel, to use this product for any other purpose.

NO OTHER RIGHTS ARE CONVEYED EXPRESSLY, BY IMPLICATION OR BY ESTOPPEL TO ANY OTHER PATENTS. FURTHERMORE, NO RIGHTS FOR RESALE ARE CONFERRED WITH THE PURCHASE OF THIS PRODUCT.



CEPHEID
904 CARIBBEAN DRIVE
SUNNYVALE, CA 94089-1189
TEL: (408) 541-4191
FAX: (408) 541-4192
TECHNICAL SUPPORT TOLL-FREE: (888) 838-3222



CEPHEID EUROPE
VIRA-SOLELH
81470 MAURENS-SCOPONT - FRANCE
TEL: +33 5 63 82 53 00
FAX: +33 5 63 82 53 01
TECHNICAL SUPPORT: +33 5 63 82 53 19

English

For *In Vitro* Diagnostic Use Only

Proprietary Name

Xpert® MRSA

Common or Usual Name

Xpert MRSA Assay

Intended Use

The Cepheid Xpert MRSA Assay performed in the GeneXpert® Dx System (Xpert MRSA) is a qualitative *in vitro* diagnostic test designed for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from nasal swabs in patients at risk for nasal colonization. The test utilizes automated real-time polymerase chain reaction (PCR) to detect MRSA DNA. The Xpert MRSA Assay is intended to aid in the prevention and control of MRSA infections in healthcare settings. The Xpert MRSA Assay is not intended to diagnose MRSA 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

Staphylococcus aureus (SA) is a major nosocomial pathogen that causes a range of diseases including endocarditis, osteomyelitis, toxic shock syndrome, food poisoning, carbuncles and boils. In the early 1950s, acquisition and spread of beta-lactamase-producing plasmids thwarted the effectiveness of penicillin for treating *S. aureus* infections. In 1959, methicillin, a synthetic penicillin, was introduced. By 1960, methicillin-resistant *S. aureus* strains were identified. This was determined to be the result of *S. aureus* acquiring the *mecA* gene. In the US today, MRSA is responsible for approximately 25% of nosocomial infections and reports of community-acquired MRSA are increasing, resulting in significant morbidity and mortality. In an attempt to limit the spread of these infections, control strategies and policies are being developed and implemented in healthcare settings. Controlling MRSA is a primary focus of most hospital infection control programs. Currently, the standard surveillance method for detecting MRSA is culture, which is very laborious and time intensive.^{1,2,3,4,5} A rapid and more sensitive method for surveillance of MRSA will represent a definite advantage for infection control programs.

Principle of the Procedure

The GeneXpert Dx System automates and integrates sample purification, nucleic acid amplification, and detection of the target sequence in simple or complex samples using real-time PCR and RT-PCR assays. The system consists of an instrument, personal computer, and preloaded software for running tests on collected samples and viewing the results. The system requires the use of single-use disposable GeneXpert cartridges that hold the PCR reagents and host the PCR process. Because the cartridges are self-contained, cross-contamination between samples is eliminated. For a full description of the system, see the *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

Xpert MRSA Assay includes reagents for the detection of MRSA as well as a sample processing control (SPC) to control for adequate processing of the target bacteria and to monitor the presence of inhibitor(s) in the PCR reaction. The Probe Check Control (PCC) verifies reagent rehydration, PCR tube filling in the cartridge, probe integrity, and fluorophore stability.

The primers and probes in the Xpert MRSA assay detect a proprietary sequence for the presence of a cassette inserted into the *S. aureus* chromosome.

Reagents and Instruments

Material Provided

 The Xpert MRSA(GXM RSA-100N-10) contains sufficient reagents to process 10 specimens or quality control samples. The Xpert MRSA(GXM RSA-120) contains sufficient reagents to process 120 specimens or quality control samples.

The kit contains the following:

Xpert MRSA Assay Cartridges with integrated reaction tubes	10	120
Bead 1 (freeze-dried)	1 per cartridge	1 per cartridge
Polymerase		
dNTPs		
Bovine Serum Albumin (BSA)		
Bead 2 (freeze-dried)	1 per cartridge	1 per cartridge
Primers		
Probes		
BSA		
Bead 3 (freeze-dried)	1 per cartridge	1 per cartridge
Sample Processing Control (SPC)		
~6000 non-infectious sample preparation control spores		
Reagent 1 (Sodium Hydroxide)	3.0 mL per cartridge	3.0 mL per cartridge
Reagent 2 (Tris Buffer, EDTA, surfactants)	3.0 mL per cartridge	3.0 mL per cartridge
Xpert MRSA reagent pouch	1	1
Elution Reagent (Guanidinium thiocyanate, surfactants)	10 × 1.5 mL per pouch	125 × 1.5 mL per pouch

Notes:

Material Safety Data Sheets (MSDS) for all reagents provided in this assay are available upon request from Cepheid Technical Support, and are available on Cepheid's websites (www.cephid.com and www.cephidinternational.com).

The bovine serum albumin (BSA) in this product was produced exclusively from bovine plasma sourced in the United States. The manufacturing of the BSA is also performed in the United States. No ruminant protein or other animal protein was fed to the animals; the animals passed ante- and post-mortem testing. During processing, there was no commingling of the material with other animal materials.

Storage and Handling

-  Store the Xpert MRSA cartridges and reagents at 2–28 °C.
- Do not use reagents or cartridges that have passed the expiration date.
- Do not open a cartridge until you are ready to perform testing.
- Do not use any reagents that have become cloudy or discolored.

Materials Required but Not Provided

- GeneXpert Dx System (catalog number varies by configuration): GeneXpert instrument, computer, barcode wand reader, and Operator Manual
- Printer (See *GeneXpert Dx System Operator Manual* for compatibility guidelines)
- Cepheid Sample Collection Device (part number 900-0370)
- Vortex mixer
- Disposable, sterile transfer pipettes
- Sterile gauze

Materials Available but Not Provided

KWIK-STIK™ from MicroBiologics catalog # 0158 MRSA as positive control and #0371 MSSE (methicillin-sensitive *Staphylococcus epidermis*) as negative control.

Warnings and Precautions

-  • Treat all biological specimens, including used cartridges, as if capable of transmitting infectious agents. Because it is often impossible to know which might be infectious, all biological specimens should be treated with standard precautions. Guidelines for specimen handling are available from the U.S. Centers for Disease Control and Prevention⁶ and the Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards).⁷
- Follow your institution's safety procedures for working with chemicals and handling biological samples.
- The Xpert MRSA Assay does not provide susceptibility results. Additional time is required to culture and perform susceptibility testing.
- Do not substitute Xpert MRSA reagents with other reagents.
- Do not open the Xpert MRSA cartridge lid except when adding sample.
- Do not use a cartridge that has been dropped or shaken after you have added the sample.
- Do not use a cartridge that has a damaged reaction tube.
-  • Each single-use Xpert MRSA cartridge is used to process one test. Do not reuse spent cartridges.
- Consult your institution's environmental waste personnel on proper disposal of used cartridges and unused reagents. This material may exhibit characteristics of federal EPA Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) hazardous waste requiring specific disposal requirements. Check state and local regulations as they may differ from federal disposal regulations. Institutions outside the USA should check their country's hazardous waste disposal requirements.
-  • Store the Xpert MRSA kit at 2–28 °C.
-  • Reagent 1 contains sodium hydroxide (pH > 12.5); (R34 EU Risk) which is corrosive to eyes and skin requiring eye and skin protection.
-  • Elution Reagent contains guanidinium thiocyanate (R32; 52/53 EU Risk), which is harmful to aquatic organisms.

Specimen Collection and Transport



To obtain adequate specimen, follow the instructions in this section closely.

1. Open the Cepheid Collection Device by peeling back the outer packaging.
2. Ask the patient to tilt his/her head back. Insert dry swabs approximately 1–2 cm into each nostril.
3. Rotate the swabs against the inside of the nostril for 3 seconds. Apply slight pressure with a finger on the outside of the nose to help assure good contact between the swab and the inside of the nose.
4. Using the same swabs, repeat for the second nostril, trying not to touch anything but the inside of the nose.
5. Remove the plastic transport tube. Twist off the tube cap and discard it. Place the swabs into the plastic transport tube. The swabs should go all the way into the tube until they rest on top of the sponge at the bottom of the tube. Make sure the red cap is on tightly.

Note: The swabs should stay attached to the red cap at all times.

6. Label the plastic transport tube with patient ID and send to the laboratory.
7. Store swab specimen at room temperature (15–30 °C) if it will be processed within 24 hours, otherwise store swab at 2–8 °C. The swab specimen is stable up to 5 days when stored at 2–8 °C.

Procedure

Preparing the Cartridge

Important: Start the test within 15 minutes of adding the sample to the cartridge.

Note: Use only one of the swabs. The second swab is required for repeat testing.

To add the sample into the cartridge (Xpert MRSA):

1. Remove the cartridge and Elution Reagent from the kit.
2. Remove the swabs from the transport container and then remove one swab from the red cap.
3. Insert the swab into the tube containing the Elution Reagent.

Note: Use sterile gauze to minimize risks of contamination.

4. Hold the swab by the stem near the rim of the tube, lift the swab a few millimeters from the bottom of the tube and push the stem against the edge of the tube to break it. Make sure the swab is short enough to allow the cap to close tightly.
5. Close the cap and vortex at high speed for 10 seconds.
6. Open the cartridge lid. Using a sterile transfer pipette, transfer the entire contents of the Elution Reagent to the large notched opening (item #1 in Figure 1) in the GeneXpert cartridge.
7. Close the cartridge lid.

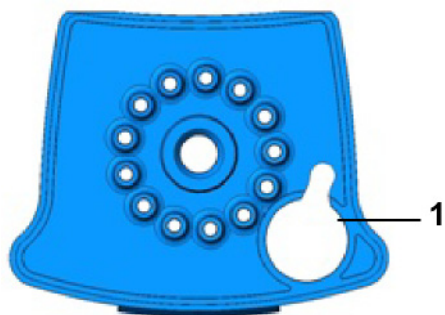


Figure 1. Xpert MRSA cartridge (top view).

Starting the Test

Important: Before you start the test, make sure the Xpert MRSA assay definition is imported into the GeneXpert software.

This section lists the basic steps of running the test. For detailed instructions, see the *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

1. Turn on the computer, and then turn on the GeneXpert Dx instrument.
2. On the Windows® desktop, double-click the GeneXpert Dx shortcut icon.
3. Log on to the GeneXpert Dx System software using your user name and password.
4. In the GeneXpert Dx System window, click **Create Test**. The Scan Cartridge Barcode dialog box appears.
5. Scan the barcode on the Xpert MRSA cartridge. The Create Test window appears. Using the barcode information, the software automatically fills the boxes for the following fields: **Select Assay**, **Reagent Lot ID**, **Cartridge SN**, and **Expiration Date**.
6. In the **Sample ID** box, scan or type the sample ID. Make sure you type the correct sample ID. The sample ID is associated with the test results and is shown in the View Results window and all the reports.
7. Click **Start Test**. In the dialog box that appears, type your password.
8. Open the instrument module door with the blinking green light and load the cartridge.
9. Close the door. The test starts and the green light stops blinking. When the test is finished, the light turns off.
10. Wait until the system releases the door lock before opening the module door and removing the cartridge.
11. Dispose of the used cartridges in the appropriate specimen waste containers according to your institution's standard practices.



Viewing and Printing Results

For detailed instructions on how to view and print the results, see the *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

CONTROL Quality Control

Each test includes a Sample Processing Control (SPC) and Probe Check Control (PCC).

Sample Processing Control (SPC)—Ensures the sample was correctly processed. The SPC contains spores of *Bacillus globigii* in the form of a dry spore cake that is included in each cartridge to verify adequate processing of MRSA. The SPC verifies that lysis of MRSA has occurred if the organisms are present and verifies that specimen processing is adequate. Additionally this control detects specimen-associated inhibition of the real-time PCR assay. The SPC should be positive in a negative sample and can be negative or positive in a positive sample. The SPC passes if it meets the validated acceptance criteria.

Probe Check Control (PCC)—Before the start of the PCR reaction, the GeneXpert Dx System measures the fluorescence signal from the probes to monitor bead rehydration, reaction-tube filling, probe integrity and fluorophore stability. Probe Check passes if it meets the assigned acceptance criteria.

External Controls—KWIK-STIK™ (MicroBioLogics, catalog # 0158 MRSA as positive control and # 0371 MSSE as negative control) may be used for training, proficiency testing and external QC of the GeneXpert Dx System. External controls may be used in accordance with local, state, federal accrediting organizations, as applicable. Follow the MicroBioLogics external control procedure described below:

1. Tear open the pouch at notch and remove the KWIK-STIK.
2. Pinch the bottom of the ampoule in the cap to release the hydrating fluid.
3. Hold vertically and tap to facilitate flow of fluid through shaft into bottom of unit containing pellet.
4. To facilitate dissolution of the lyophilized cell pellet, crush the pellet and gently pinch the bottom chamber.
5. Pull apart the KWIK-STIK to release the swab, and insert the swab into the tube containing the Elution Reagent.
6. The KWIK-STIK swab is now ready for Xpert MRSA testing.

Interpretation of Results

The results are interpolated by the GeneXpert Dx System from measured fluorescent signals and embedded calculation algorithms and will be shown in the View Results window. Possible results are:

MRSA POSITIVE

MRSA target DNA is detected (presumptive positive for MRSA colonization).

- MRSA—POSITIVE: MRSA target has a Ct within the valid range and endpoint above the minimum setting.
- SPC—NA (not applicable): SPC is ignored since MRSA amplification may compete with this control.
- Probe Check—PASS: All probe check results pass.

MRSA NEGATIVE

MRSA target DNA is not detected (presumed not colonized with MRSA), SPC meets acceptance criteria.

- MRSA—NEGATIVE: MRSA target DNA is not detected.
- SPC—PASS: SPC has a Ct within the valid range and endpoint above the endpoint minimum setting.
- Probe Check—PASS: All probe check results pass.

INVALID

Presence or absence of MRSA cannot be determined, repeat test with extra swab. SPC does not meet acceptance criteria, the sample was not properly processed, or PCR is inhibited.

- MRSA—INVALID: Presence or absence of MRSA DNA cannot be determined.
- SPC—FAIL: MRSA target result is negative and the SPC Ct is not within valid range and endpoint below minimum setting.
- Probe Check—PASS: All probe check results pass.

ERROR

Presence or absence of MRSA cannot be determined, repeat test with extra swab. The Probe Check control failed, which is probably due to an improperly filled reaction tube, a probe integrity problem, or because the maximum pressure limits were exceeded.

- MRSA—NO RESULT
- SPC—NO RESULT
- Probe Check—FAIL*; all or one of the probe check results fail.
* If the Probe Check passed, the error is caused by a system component failure.

NO RESULT

Presence or absence of MRSA cannot be determined, repeat test with extra swab. Insufficient data were collected to produce a test result (for example, the operator stopped a test that was in progress).

- MRSA—NO RESULT
- SPC—NO RESULT
- Probe Check—NA (not applicable)

Reasons to Repeat the Assay

Repeat the test using a new cartridge and new Elution Reagent (do not re-use the cartridge) or initiate alternate procedures if one of the following test results occurs:

- An **INVALID** result indicates that the controls SPC failed. The sample was not properly processed or PCR is inhibited.
- An **ERROR** result indicates that the Probe Check control failed and the assay was aborted possibly due to the reaction tube being filled improperly, a reagent probe integrity problem was detected, or because the maximum pressure limits were exceeded.
- A **NO RESULT** indicates that insufficient data were collected. For example, the operator stopped a test that was in progress.

Limitations

The performance of the Xpert MRSA Assay was validated using the procedures provided in this package insert only. Modifications to these procedures may alter the performance of the test. Results from the Xpert MRSA Assay should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data available to the clinician.

Erroneous test results might occur from improper specimen collection, not following the recommended sample collection procedure, handling or storage, technical error, sample mix-up, or because the number of organisms in the specimen is not detected by the test. Careful compliance to the instructions in this insert is necessary to avoid erroneous results.

Because the detection of MRSA is dependent on the number of organisms present in the sample, reliable results are dependent on proper specimen collection, handling, and storage.

Rerunning the Xpert MRSA when results are **INVALID**, **ERROR**, and **NO RESULT** should depend on practices and policies within each facility. Alternate procedures (e.g. culture using selective agar plates with or without overnight incubation in a selective enrichment broth) should be available. For culturing, remaining swab specimens should be placed in appropriate transport systems and cultured within 4 days.

A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organism. It is however, presumptive for the presence of MRSA.

Testing with Xpert MRSA assay should be used as an adjunct to other methods available.

Test results might also be affected by concurrent antibiotic therapy. Therefore, therapeutic success or failure cannot be assessed using this test because DNA might persist following antimicrobial therapy.

Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown MRSA variants resulting in a false negative result.

Interfering substances

Potentially interfering substances evaluated include blood, mucus and nasal sprays used to relieve congestion, nasal dryness or irritation. The presence of these substances did not significantly inhibit PCR and did not give invalid or erroneous results.

In the investigational study for Xpert MRSA Assay, potential interfering substances (blood, mucus or both) were reported on 45 of 1077 (4.2 %) nasal swab specimens. Of the 31 specimens that gave an equivocal result on initial testing, three specimens had mucus and one specimen had blood on the swab. Three of the four specimens gave a result on retesting while one that contained mucus remained indeterminate.

Expected Values

In the Xpert MRSA clinical study, a total of 1077 nasal specimens were collected from 1077 subjects at 7 enrolling sites across the United States. The study population was grouped into subjects in nursing homes or extended stay facilities, hospitalized over 3 days, hospitalized for 3 days or less, out patient clinic and staff or others. The number and percentage of positive and negative cases relative to the reference culture method are calculated and presented in the table below.

Table 1. Expected values for MRSA in different population studies

Group	Positive n (%)	Negative n (%)	Total (%) ¹
Nursing homes, long term and extended stay facilities	62 (25.5)	181 (74.5)	243 (22.6)
Hospitalized >3 days	61 (23.0)	204 (77.0)	265 (24.7)
Hospitalized =3 days	29 (13.1)	193 (86.9)	222 (20.7)
Out patient clinic	46 (17.7)	214 (82.3)	260 (24.2)
Staff and others	11 (12.9)	74 (87.1)	85 (7.9)
Total	209 (19.4)	866 (80.6)	1075

¹ Two culture positive hospitalized subjects had unknown admission dates

Performance Characteristics

Clinical Performance

Performance characteristics of the Xpert MRSA Assay were determined in a multi-site prospective investigation study at seven institutions by comparing the MRSA assay on the GeneXpert System (Xpert MRSA Assay) with a second FDA-cleared nucleic acid amplification test (NAAT), and enriched culture, the most sensitive culture method. Subjects included individuals and medical staff at risk for nasal colonization. Each subject was enrolled in the study only one time. Subjects who had received systemic or topical-nasal antibiotics in the period 48 hours to one week prior to study enrollment, under 2 years of age, had contraindication to nasal swab collection were excluded from the study. Only those subjects meeting the inclusion and exclusion criteria were enrolled.

Nasal swabs were collected from each subject. One swab was tested by the Xpert MRSA Assay and another swab by the second FDA-cleared NAAT test. The two types of NAAT tests were performed at each participating institution and an additional swab was sent to a centralized laboratory for culture testing.

At the centralized laboratory, the swab was directly streaked on to a selective chromogenic agar plate with cefoxitin and the plate was incubated for 24–48 hours at 35 ±2 °C. The swab was transferred to trypticase soy broth (TSB) with 6.5% sodium chloride and incubated for 18–24 hours at 35 ±2 °C. If the direct streak was negative at 24 hours, the enriched TSB was streaked onto another chromogenic agar plate with cefoxitin and incubated for 24–48 hours at 35 ±2 °C. Confirmation of presumptive positives colonies from either culture method was performed with a tube coagulase test and Gram stain.

Assay performance of the Xpert MRSA Assay and the second FDA-cleared NAAT test were calculated relative to the central laboratory culture results (reference culture).

Overall Results

A total of 1077 eligible subjects (one specimen per patient) were tested for MRSA by Xpert MRSA, and a 2nd FDA-cleared NAAT test and culture. The Xpert MRSA identified 86.3% of the specimens positive for MRSA and 94.9% of the specimens negative for MRSA relative to the reference culture method. For the subjects tested, the positive predictive value was 80.5% and the negative predictive value was 96.6%.

Table 2a. Xpert MRSA Compared to Reference Culture Method

		Culture			
		+	-		
Xpert MRSA	+	182	44	226	Positive Agreement: 86.3%
	-	29	819	848	Negative Agreement: 94.9%
		211	863	1074*	PPV ¹ : 80.5%
					NPV ² : 96.6%

* 3 specimens did not give Xpert results on two attempts

¹ Positive predictive value

² Negative predictive value

When compared to the direct culture method (swabs directly streaked on selective chromogenic agar plates with cefoxitin without TSB enrichment and incubated for 24–48 hours at 35 ±2 °C), Xpert MRSA identified 94.3% of the specimens positive for MRSA and 93.2% of the specimens negative for MRSA; the positive predictive value was 73.0% and the negative predictive value was 98.8%.

Table 2b. Xpert MRSA Compared to Direct Culture Method

		Direct Culture			
		+	-		
Xpert MRSA	+	165	61	226	Positive Agreement: 94.3%
	-	10	838	848	Negative Agreement: 93.2%
		175	899	1074	PPV ¹ : 73.0%
					NPV ² : 98.8%

¹ Positive predictive value

² Negative predictive value

The following tables show the performance of Xpert MRSA and MRSA prevalence at each clinical site compared to the reference culture and direct culture methods.

Table 3a. Performance of Xpert MRSA by Site Compared to Reference Culture Method

Site	MRSA prevalence ¹	Positive Agreement (n) (95% CI) ²	Negative Agreement (n) (95% CI) ³	No. of indeterminate results
1	20.2% (78/387)	87.2% (n=78) (77.7-93.7%)	93.9% (n=309) (90.6-96.3%)	10
2	5.2% (3/58)	100.0% (n=3) (29.2-100.0%)	98.2% (n=55) (90.3-100.0%)	3
3	44.4% (12/27)	91.7% (n=12) (61.5-99.8%)	100.0% (n=15) (78.2-100.0%)	3
4	12.3% (20/162)	80.0% (n=20) (56.3-94.3%)	97.2% (n=142) (92.9-99.2%)	9
5	20.5% (46/224)	89.1% (n=46) (76.4-96.4%)	94.9% (n=178) (90.6-97.7%)	1
6	22.3% (42/188)	81.0% (n=42) (65.9-91.4%)	93.2% (n=146) (87.8-96.7%)	6
7	35.7% (10/28)	90.0% (n=10) (55.5-99.8%)	94.4% (n=18) (72.7-99.9%)	2
Total	19.6% (211/1074)	86.3% (n=211) (80.9-90.6%)	94.9% (n=863) (93.2-96.3%)	34

¹Determined from results by reference culture method

²Number of positive determined by reference culture method

³Number of negative determined by reference culture method

Table 3b. Performance of Xpert MRSA by Site—Comparison to Direct Culture Method

Site	Positive Agreement	Negative Agreement
1	95.4% (87.1-99.0%)	92.2% (88.8-94.9%)
2	100.0% (29.2-100.0%)	98.2% (90.3-100.0%)
3	91.7% (61.5-99.8%)	100.0% (78.2-100.0%)
4	81.3% (54.4-96.0%)	95.2% (90.4-98.1%)
5	94.9% (82.7-99.4%)	93.0% (88.3-96.2%)
6	97.1% (84.7-99.9%)	92.9% (87.6-96.4%)
7	100.0% (54.1-100.0%)	81.8% (59.7-94.8%)
Total	94.3% (89.7-97.2%)	93.2% (91.4-94.8%)

Performances of Xpert MRSA, the 2nd FDA-cleared NAAT and direct culture method from individual sites relative to the reference culture method are presented in the tables below.

Table 4a. Results from Xpert MRSA, Direct Culture Method and Second FDA-cleared NAAT Test with Specimens Positive for MRSA by Reference Culture Method

Positive Agreement (95% CI)			
Site	Xpert MRSA	2nd NAAT	Direct Culture¹
1	87.2% (77.7-93.7%)	80.8% (70.3-88.8%)	83.3% (73.2-90.8%)
2	100.0% (29.2-100.0%)	100.0% (29.2-100.0%)	100.0% (29.2-100.0%)
3	91.7% (61.5-99.8%)	83.3% (51.6-97.9%)	100.0% (73.5-100.0%)
4	80.0% (56.3-94.3%)	78.9% (54.4-93.9%)	80.0% (56.3-94.3%)
5	89.1% (76.4-96.4%)	89.1% (76.4-96.4%)	84.8% (71.1-93.7%)
6	81.0% (65.9-91.4%)	78.6% (63.2-89.7%)	81.0% (65.9-91.4%)
7	90.0% (55.5-99.7%)	100.0% (69.2-100.0%)	60.0% (26.2-87.8%)
Total	86.3% (80.9-90.6%)	83.3% (77.6-88.1%)	82.9% (77.2-87.8%)

¹ Swabs directly streaked on selective chromogenic agar plates with cefoxitin and incubated for 24-48 hours at 35 ±2 °C.

Table 4b. Results from Xpert MRSA, Direct Culture Method and Second FDA-cleared NAAT Test with Specimens Negative for MRSA by Reference Culture Method

Negative Agreement (95% CI)			
Site	Xpert MRSA	2nd NAAT	Direct Culture¹
1	93.9% (90.6-96.3%)	92.2% (88.7-95.0%)	100.0% (98.8-100.0%)
2	98.2% (90.3-100.0%)	98.2% (90.3-100.0%)	100.0% (93.6-100.0%)
3	100.0% (78.2-100.0%)	100.0% (79.4-100.0%)	100.0% (79.4-100.0%)
4	97.2% (92.9-99.2%)	97.9% (93.9-99.6%)	100.0% (97.5-100.0%)
5	94.9% (90.6-97.7%)	93.8% (89.2-96.9%)	100.0% (97.9-100.0%)
6	93.2% (87.8-96.7%)	94.5% (89.5-97.6%)	100.0% (97.5-100.0%)
7	94.4% (72.7-99.9%)	94.4% (72.7-99.9%)	100.0% (81.5-100.0%)
Total	94.9% (93.2-96.3%)	94.4% (92.7-95.9%)	100.0% (99.6-100.0%)

¹ Swabs directly streaked on selective chromogenic agar plates with cefoxitin and incubated for 24-48 hours at 35 ±2 °C.

Analytical Specificity

Cultures from 51 American Type Culture Collection (ATCC) and Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA) strains representing species phylogenetically related to *S. aureus* and members of the nasal commensal flora, 32 strains of methicillin-sensitive coagulase negative staphylococci, and 12 strains of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci were tested. Three replicates of each isolate were tested at $\approx 1 \times 10^6$ CFU/swab. None of these isolates were detected by the assay. The specificity was 100%.

Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the Xpert MRSA was determined using 6 strains of MRSA representing the six SCC_{mec} types and subtypes (I, II, III, IV, IVa and V). Cultures of these strains were quantified then diluted to values spanning the range of 10 to 1000 colony forming units (CFU) per swab. All dilutions were tested in replicates of 4. Limit of detection obtained for each type or subtype tested shows the lowest number of CFU/swab at which all 4 replicates were reported positive. All of the strains representing the SCC_{mec} cassette types I - V were detected by the Xpert MRSA Assay.

Table 5. Detection of SCC_{mec} Types

SCC _{mec}	(CFU/swab)
type I	10
type II	10
type III	10
type V	10
type IV	50
type IVa	100

Additional studies using type II cells were performed to determine the 95% confidence interval for the analytical limit of detection (LOD) of this assay. The limit of detection is defined as the lowest number of MRSA colony forming units (CFU) per swab that can be reproducibly distinguished from negative samples with 95% confidence. Results indicate that the Xpert MRSA will produce a positive result with 95% confidence for a swab containing 80 CFU.

Reproducibility

A panel of specimens with varying concentrations of MRSA and methicillin sensitive *Staphylococcus epidermidis* (negative) were tested in triplicate on 10 different days at each of the three sites (4 specimens $\times$ 3 times /day $\times$ 10 days $\times$ 3 sites). One lot of Xpert MRSA kit was used at each of the 3 testing sites. Xpert MRSA assays were performed according to the Xpert MRSA procedure.

Table 6. Summary of Reproducibility Results

Specimen ID	MRSA in CFU/ swab	MSSE CFU/swab	Site 1	Site 2	Site 3	Total Agreement	% Total Agreement
Negative	0	2.6×10^6	30/30	30/30	30/31 ^A	90/91	98.9%
Weak positive	117	2.6×10^6	30/30	30/30	27/29 ^A	87/89	97.8%
Positive	800	2.6×10^6	30/30	30/30	30/30	90/90	100.0%
Strong positive	2.6×10^4	2.6×10^6	30/30	30/30	30/30	90/90	100.0%
Total Agreement			120/120	120/120	117/120	357/360	99.2%
% Agreement			100.0%	100.0%	97.5%		

^A Xpert MRSA assay was inadvertently performed on one additional negative specimen and one less weak positive specimen

References

1. Mainous AG, Hueston WJ, Everett, CJ, Vanessa A. Diaz VA. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in the United States, 2001-2002. *An Family Medicine*. 2006;4(2):132-137.
2. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004;32:470-85.
3. Chaix C, Durand-Zileski I, Alberti C, Buisson B. Control of Endemic Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *JAMA* 1999;282(19):1745-51.
4. Shopsis B, Kreiswirth BN. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases* 2001;7(2) 323-6.
5. Salgado CD et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-analysis of Prevalence and Risk Factors. *CID* 2003;36:131.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).

Assistance

For assistance, contact Cepheid using one of the following contact details. Make sure you provide the instrument serial number and reagent lot ID when you call or email.

North America

For technical support, use the following contact details:

Tel: +1.888.838.3222 Option 2

Email: techsupport@cepheid.com

You can reach Cepheid Technical Support by telephone Monday through Friday, from 5 A.M. to 5 P.M. Pacific Time.

European Union

For technical support, use the following contact details:

Tel: +33.563.82.53.19

Fax: +33.563.82.53.01

Email: support@cepheideurope

Other Locations

Contact your local Cepheid representative.

Table of Symbols

Symbol	Meaning
	Catalog number
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	CE marking – European Conformity
	Authorized representative in the European Community
	Do not reuse
	Caution, consult accompanying document
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
	Control
	Temperature limitation
	Biological hazard



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
USA

Phone: +1.408.541.4191

Fax: +1.408.541.4192



Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
Email: cepheid@cepheideurope



Réservé à un usage diagnostique *in vitro*

Nom de marque

Xpert® MRSA

Dénomination commune

Xpert MRSA Assay

Usage prévu

Cepheid Xpert MRSA Assay effectué avec le GeneXpert® Dx System (Xpert MRSA) est un test qualitatif de diagnostic *in vitro* conçu pour la détection rapide de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) sur écouvillon nasal chez les patients à risque de colonisation nasale. Le test utilise une méthode de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en temps réel automatisée pour détecter l'ADN de SARM. Xpert MRSA Assay est prévu pour contribuer à la prévention et au contrôle des infections à SARM dans les établissements de santé. Xpert MRSA Assay n'est pas prévu pour diagnostiquer le SARM ni pour guider ou surveiller le traitement des infections à SARM. Des cultures concomitantes sont nécessaires uniquement pour récupérer les organismes en vue d'effectuer un typage épidémiologique et des tests de susceptibilité supplémentaires.

Résumé et explication du test

Le *Staphylococcus aureus* (SA) est un pathogène nosocomial majeur qui est à l'origine de maladies diverses, dont l'endocardite, l'ostéomyélite, le syndrome de choc toxique, les intoxications alimentaires, l'anthrax et les furoncles. Au début des années 1950, l'acquisition et la propagation de plasmides codant pour les bêta-lactamases ont entravé l'efficacité de la pénicilline à traiter les infections à *S. aureus*. La méticilline, une pénicilline synthétique, a été introduite en 1959. Les premières souches de *S. aureus* résistant à la méticilline ont été identifiées en 1960, suite à l'acquisition du gène *mecA* par *S. aureus*. Aux États-Unis aujourd'hui, le SARM est responsable d'environ 25 % des infections nosocomiales et les rapports de SARM acquis dans la communauté augmentent, produisant une morbidité et une mortalité significatives. Pour tenter de limiter la propagation de ces infections, des stratégies et politiques de contrôle sont en cours de développement et de mise en œuvre dans les établissements de santé. Contrôler le SARM est un objectif primaire pour la plupart des programmes hospitaliers de contrôle de l'infection. Actuellement, la culture est la méthode de surveillance standard pour la détection de SARM, ce qui est laborieux et prend du temps.^{1,2,3,4,5} Une méthode de surveillance plus rapide et plus sensible pour le SARM représente un avantage notable pour les programmes de contrôle de l'infection.

Principe de la procédure

Le GeneXpert Dx System automatise et intègre la purification des échantillons, l'amplification de l'acide nucléique et la détection de la séquence cible dans des échantillons simples ou complexes, par PCR en temps réel et par PCR après transcription inverse. Le système se compose d'un instrument, d'un ordinateur personnel et d'un logiciel préinstallé pour l'exécution des tests sur les échantillons prélevés et l'affichage des résultats. Le système exige l'utilisation des cartouches GeneXpert jetables à usage unique qui contiennent les réactifs PCR et qui hébergent le processus de PCR. Les cartouches étant closes, la contamination croisée entre les échantillons est éliminée. Pour une description complète du système, consulter le *manuel d'utilisation du GeneXpert Dx System*.

Xpert MRSA Assay comprend les réactifs nécessaires pour la détection de SARM ainsi que pour le contrôle du traitement de l'échantillon (CTE), pour confirmer le traitement adéquat de la bactérie cible et surveiller la présence d'inhibiteur(s) lors de la réaction PCR. Le contrôle de vérification de la sonde (CVS) confirme la réhydratation des réactifs, le remplissage des tubes de PCR dans la cartouche, l'intégrité de la sonde et la stabilité du fluorophore.

Les amorces et les sondes de Xpert MRSA Assay détectent une séquence codant pour la présence d'une cassette insérée dans le chromosome *S. aureus*.

Réactifs et instruments

Matériel fourni

-  Xpert MRSA(GXMRSA-100N-10) contient suffisamment de réactifs pour traiter 10 prélèvements ou échantillons de contrôle qualité.
 Xpert MRSA(GXMRSA-120) contient suffisamment de réactifs pour traiter 120 prélèvements ou échantillons de contrôle qualité.

Le kit contient les articles suivants :

Cartouches Xpert MRSA Assay avec tubes réactionnels intégrés	10	120
Bille 1 (lyophilisée)	1 par cartouche	1 par cartouche
Polymérase		
dNTP		
Sérum-albumine bovine (BSA)		
Bille 2 (lyophilisée)	1 par cartouche	1 par cartouche
Amorces		
Sondes		
BSA		
Bille 3 (lyophilisée)	1 par cartouche	1 par cartouche
Contrôle du traitement de l'échantillon (CTE)		
~6 000 spores de contrôle non infectieux pour la préparation des échantillons		
Réactif 1 (hydroxyde de sodium)	3,0 ml par cartouche	3,0 ml par cartouche
Réactif 2 (tampon Tris, EDTA, surfactants)	3,0 ml par cartouche	3,0 ml par cartouche
Sachet de réactif Xpert MRSA	1	1
Réactif d'élution (thiocyanate de guanidinium, surfactants)	10 × 1,5 ml par sachet	125 × 1,5 ml par sachet

Remarques :

Des fiches techniques santé/sécurité (FTSS) pour tous les réactifs fournis dans ce test sont disponibles sur demande auprès du service d'assistance technique de Cepheid, et sont disponibles sur les sites Web de Cepheid (www.cepheid.com et www.cepheidinternational.com).

La sérum-albumine bovine (BSA) dans ce produit est dérivée exclusivement de plasma bovin d'origine américaine. La fabrication de la BSA est aussi effectuée aux États-Unis. Aucune protéine d'origine ruminante ou autre protéine animale n'a été donnée aux animaux ; les animaux ont fait l'objet d'analyses ante- et post-mortem. Aucun contact du matériel avec d'autres matériels d'origine animale ne s'est produit au cours du traitement.

Stockage et manipulation

-  ⁺²/₋₈ °C • Conserver les cartouches et réactifs Xpert MRSA à une température comprise entre 2 et 28 °C.
- Ne pas utiliser des réactifs ou cartouches dont la date de péremption est dépassée.
 - Ne pas ouvrir une cartouche avant d'être prêt à effectuer le test.
 - Ne pas utiliser des réactifs visiblement troubles ou ayant changé de couleur.

Matériel requis mais non fourni

- GeneXpert Dx System (le numéro de référence varie selon la configuration) : Instrument GeneXpert, ordinateur, lecteur de codes barres à main et manuel d'utilisation
- Imprimante (consulter le *manuel d'utilisation du GeneXpert Dx System* pour les directives de compatibilité)
- Cepheid Sample Collection Device (dispositif de prélèvement Cepheid) (numéro de référence 900-0370)
- Mélangeur Vortex
- Pipettes de transfert jetables stériles
- Gaze stérile

Matériel disponible mais non fourni

Écouvillons prêts à l'emploi KWIK-STIK™ de MicroBiologics n° de réf. 0158 MRSA comme contrôle positif et n° de réf. 0371 MSSE (*Staphylococcus epidermis* sensible à la méticilline) comme contrôle négatif.

Avertissements et mises en garde



- Traiter tous les prélèvements biologiques, y compris les cartouches usagées, comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Puisqu'il est souvent impossible de savoir ce qui peut être infectieux, tous les échantillons biologiques doivent être traités en respectant les précautions standard. Les Centers for Disease Control and Prevention⁶ (Centres américains pour le contrôle et la prévention des maladies) et le Clinical and Laboratory Standards Institute (Institut des normes cliniques et de laboratoire ; anciennement le National Committee for Clinical Laboratory Standards) tiennent à disposition des directives concernant la manipulation des prélèvements.⁷
- Observer les procédures de sécurité de l'établissement pour la manipulation de produits chimiques et d'échantillons biologiques.
- Xpert MRSA Assay ne donne pas de résultats de susceptibilité. La culture et les tests de susceptibilité nécessitent du temps supplémentaire.
- Ne pas substituer les réactifs Xpert MRSA par d'autres réactifs.
- Ne pas ouvrir le couvercle de la cartouche Xpert MRSA, sauf pour l'ajout de l'échantillon.
- Ne pas utiliser une cartouche qui est tombée ou qui a été agitée après avoir ajouté l'échantillon.
- Ne pas utiliser une cartouche dont le tube réactionnel est endommagé.



- Chaque cartouche Xpert MRSA à usage unique doit être utilisée pour effectuer un seul test. Ne pas réutiliser des cartouches usagées.
- Consulter le service de gestion des déchets de l'établissement concernant l'élimination correcte des cartouches usagées et des réactifs inutilisés. Ce matériel peut avoir certaines des caractéristiques des déchets dangereux précisées dans le Resource Conservation and Recovery Act (loi nationale sur la gestion des déchets, RCRA) de l'Environmental Protection Agency (agence américaine de protection de l'environnement, EPA), exigeant des modalités d'élimination spécifiques. Consulter la réglementation d'état et locale sur l'élimination des déchets, car celles-ci peuvent différer de la réglementation nationale. Les établissements en dehors des États-Unis doivent consulter les exigences de leur pays relatives à l'élimination des déchets dangereux.



- Conserver le kit Xpert MRSA à une température comprise entre 2 et 28 °C.



- Le réactif 1 contient de l'hydroxyde de sodium (pH > 12,5) ; (risque R34) qui est corrosif pour les yeux et la peau, et exige une protection oculaire et cutanée.



- Le réactif d'élution contient du thiocyanate de guanidinium (risque R32 ; 52/53), qui est toxique pour les organismes aquatiques.

Prélèvement et transport des échantillons



Pour obtenir un prélèvement adéquat, suivre scrupuleusement les instructions dans cette section.

1. Ouvrir le Cepheid Collection Device en pelant l'emballage externe.
2. Demander au patient de pencher la tête en arrière. Introduire les écouvillons secs d'environ 1 à 2 cm dans chaque narine.
3. Tourner les écouvillons pendant 3 secondes au contact de la paroi intérieure de la narine. Du doigt, appliquer une pression légère à l'extérieur du nez pour assurer un bon contact entre l'écouvillon et la paroi intérieure du nez.
4. En utilisant les mêmes écouvillons, répéter ce processus pour la deuxième narine en veillant à ne toucher que la paroi intérieure du nez.
5. Retirer le tube de transport en plastique. Dévisser le capuchon du tube et le jeter. Placer les écouvillons dans le tube de transport en plastique. Les écouvillons doivent pénétrer complètement à l'intérieur du tube jusqu'à ce qu'ils reposent sur l'éponge qui se trouve au fond du tube. Vérifier que le capuchon rouge est bien serré.

Remarque : Les écouvillons doivent rester fixés en permanence au capuchon rouge.

6. Étiqueter le tube de transport en plastique avec le numéro d'identification du patient, puis l'envoyer au laboratoire.
7. Conserver le prélèvement par écouvillon à température ambiante (15 à 30 °C) s'il doit être traité dans les 24 heures, sinon le conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C. Le prélèvement par écouvillon est stable jusqu'à 5 jours lorsqu'il est conservé entre 2 et 8 °C.

Procédure

Préparation de la cartouche

Important : Démarrer le test dans les 15 minutes qui suivent l'ajout de l'échantillon à la cartouche.

Remarque : N'utiliser qu'un seul écouvillon. Le deuxième écouvillon est nécessaire pour répéter le test.

Pour ajouter l'échantillon à la cartouche (Xpert MRSA) :

1. Retirer la cartouche et le réactif d'élution du kit.
2. Retirer les écouvillons du récipient de transport, puis retirer un écouvillon du capuchon rouge.
3. Introduire l'écouvillon dans le tube qui contient le réactif d'élution.

Remarque : Utiliser un tampon de gaze stérile pour réduire au minimum le risque de contamination.

4. Tenir l'écouvillon par la tige à proximité du bord du tube, sortir l'écouvillon de quelques millimètres pour l'éloigner du fond du tube puis appuyer la tige contre le bord du tube pour la casser. S'assurer que l'écouvillon est suffisamment court pour permettre au capuchon d'être bien refermé.
5. Fermer le capuchon et mélanger au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes.
6. Ouvrir le couvercle de la cartouche. À l'aide d'une pipette de transfert stérile, transférer tout le contenu du réactif d'élution dans la grande ouverture à encoche (n° 1, Figure 1) de la cartouche GeneXpert.
7. Fermer le couvercle de la cartouche.

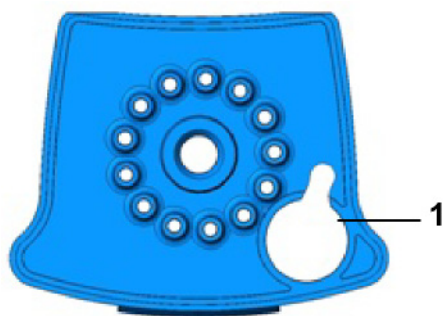


Figure 1. Cartouche Xpert MRSA (vue de dessus).

Démarrage du test

Important : Avant de démarrer le test, s'assurer que la définition du test Xpert MRSA est importé dans le logiciel GeneXpert.

Cette section énumère les étapes de base pour l'exécution du test. Pour des instructions détaillées, consulter le *manuel d'utilisation du GeneXpert Dx System*.

1. Allumer l'ordinateur et allumer ensuite l'instrument GeneXpert Dx.
2. Sur le bureau Windows®, double-cliquer sur l'icône de raccourci GeneXpert Dx.
3. Ouvrir une session du logiciel GeneXpert Dx System en utilisant un identifiant et un mot de passe.
4. Dans la fenêtre du GeneXpert Dx System, cliquer sur **Create Test** (Créer un test). La boîte de dialogue Scan Cartridge Barcode (Lire le code barres de la cartouche) s'affiche.
5. Scanner le code barres sur la cartouche Xpert MRSA. La fenêtre Create Test (Créer un test) s'affiche. En utilisant les informations du code barres, le logiciel renseigne automatiquement les champs suivants : **Select Assay** (Sélectionner un test), **Reagent Lot ID** (ID du lot de réactifs), **Cartridge SN** (NS de la cartouche) et **Expiration Date** (Date de péremption).

6. Dans le champ **Sample ID** (ID de l'échantillon), scanner ou saisir le numéro d'identification de l'échantillon. Veiller à saisir le numéro d'identification correct de l'échantillon. Le numéro d'identification de l'échantillon est associé aux résultats du test et indiqué dans la fenêtre View Results (Afficher les résultats) ainsi que dans tous les rapports.
7. Cliquer sur **Start Test** (Démarrer le test). Dans la boîte de dialogue qui s'affiche, saisir le mot de passe.
8. Ouvrir la porte du module de l'instrument dont le voyant vert clignote et charger la cartouche.
9. Fermer la porte. Le test démarre et le voyant vert cesse de clignoter. Quand le test est terminé, le voyant s'éteint.
10. Attendre que le système déverrouille la porte du module avant de l'ouvrir et de retirer la cartouche.
-  11. Éliminer les cartouches usagées dans un conteneur à déchets pour prélèvements approprié, conformément aux pratiques standard de l'établissement.

Affichage et impression des résultats

Pour des instructions détaillées sur l'affichage et l'impression des résultats, consulter le *manuel d'utilisation du GeneXpert Dx System*.

CONTROL Contrôle qualité

Chaque test comprend un contrôle du traitement de l'échantillon (CTE) et un contrôle de vérification de la sonde (CVS).

Contrôle du traitement de l'échantillon (CTE)—Assure le traitement correct de l'échantillon. Le CTE comprend des spores *Bacillus globigii* sous la forme d'un biscuit sec de spores qui est placé dans chaque cartouche pour vérifier le traitement adéquat de SARM. Le CTE vérifie que la lyse de SARM s'est produite, que les organismes sont présents et que le traitement du prélèvement est adéquat. Ce contrôle détecte également l'inhibition associée au prélèvement du test de PCR en temps réel. Le CTE doit être positif dans un échantillon négatif, et peut être négatif ou positif dans un échantillon positif. Le CTE réussit s'il répond aux critères d'acceptation validés.

Contrôle de vérification de la sonde (CVS)—Avant le début de la PCR, le GeneXpert Dx System mesure le signal de fluorescence des sondes pour surveiller la réhydratation des billes, le remplissage des tubes réactionnels, l'intégrité de la sonde et la stabilité du fluorophore. Le CVS réussit s'il répond aux critères d'acceptation attribués.

Contrôles externes—Des écouvillons prêts à l'emploi KWIK-STIK™ (MicroBioLogics, n° de réf. 0158 MRSA comme contrôle positif et n° de réf. 0371 MSSE comme contrôle négatif) peuvent être utilisés avec le GeneXpert Dx System pour la formation des opérateurs, les épreuves de compétence et le CQ externe. Des contrôles externes peuvent être utilisés conformément aux organisations d'accréditation locales, d'état et nationales, selon les besoins. Suivre la procédure de contrôle externe MicroBiologics décrite ci-dessous :

1. Déchirer le sachet au niveau de l'encoche et retirer le KWIK-STIK.
2. Pincer le bas de l'ampoule dans le capuchon pour libérer le liquide d'hydratation.
3. Tenir à la verticale et tapoter pour faciliter l'écoulement du liquide par la tige dans le fond de l'unité qui contient la pastille.
4. Pour faciliter la dissolution de la pastille de cellules lyophilisées, écraser la pastille et pincer doucement la chambre inférieure.
5. Séparer le KWIK-STIK pour libérer l'écouvillon et introduire ce dernier dans le tube qui contient le réactif d'élution.
6. L'écouvillon KWIK-STIK est maintenant prêt pour effectuer le test Xpert MRSA.

Interprétation des résultats

Les résultats sont interpolés par le GeneXpert DX System à partir de signaux fluorescents mesurés et d'algorithmes de calcul intégrés, puis sont affichés dans la fenêtre View Results (Afficher les résultats). Les résultats possibles sont :

MRSA POSITIVE (POSITIF À SARM)

L'ADN de la cible SARM est détecté (positif présomptif de colonisation par SARM).

- MRSA—POSITIVE (SARM—POSITIF) : La cible de SARM a une valeur Ct (cycle seuil) dans la plage valide et une limite supérieure au réglage minimum.
- SPC—NA (CTE—Non applicable) : Le CTE est ignoré car l'amplification SARM risque de faire concurrence à ce contrôle.
- Probe Check—PASS (Vérification de la sonde—RÉUSSIE) : Toutes les vérifications de la sonde ont réussi.

MRSA NEGATIVE (NÉGATIF À SARM)

L'ADN de la cible SARM n'est pas détecté (présomption de non colonisation par SARM) ; le CTE répond aux critères d'acceptation.

- MRSA—NEGATIVE (SARM—NÉGATIF) : L'ADN de la cible SARM n'est pas détecté.
- SPC—PASS (CTE—RÉUSSI) : Le CTE a une valeur Ct (cycle seuil) dans la plage valide et une limite supérieure au réglage minimum.
- Probe Check—PASS (Vérification de la sonde—RÉUSSIE) : Toutes les vérifications de la sonde ont réussi.

INVALID (NON VALIDE)

La présence ou l'absence de SARM ne peut pas être déterminée ; répéter le test avec l'écouvillon supplémentaire. Le CTE ne répond pas aux critères d'acceptation, l'échantillon n'a pas été correctement traité, ou la PCR est inhibée.

- MRSA—INVALID (SARM—NON VALIDE) : La présence ou l'absence de l'ADN de SARM est impossible à déterminer.
- SPC—FAIL (CTE—ÉCHEC) : Le résultat de la cible de SARM est négatif et la valeur Ct (cycle seuil) du CTE n'est pas dans la plage valide et la limite est inférieure au réglage minimum.
- Probe Check—PASS (Vérification de la sonde—RÉUSSIE) : Toutes les vérifications de la sonde ont réussi.

ERROR (ERREUR)

La présence ou l'absence de SARM ne peut pas être déterminée ; répéter le test avec l'écouvillon supplémentaire. Le contrôle de vérification de la sonde a échoué, probablement en raison d'un tube réactionnel mal rempli, d'un problème d'intégrité de la sonde, ou d'un dépassement des limites de pression maximale.

- MRSA—NO RESULT (SARM—PAS DE RÉSULTAT)
- SPC—NO RESULT (CTE—PAS DE RÉSULTAT)
- Probe Check—FAIL* (Vérification de la sonde—ÉCHEC) ; échec d'un ou plusieurs résultats de vérification de la sonde.

* Si la vérification de la sonde a réussi, l'erreur est due à une défaillance d'un composant du système.

NO RESULT (PAS DE RÉSULTAT)

La présence ou l'absence de SARM ne peut pas être déterminée ; répéter le test avec l'écouvillon supplémentaire. Les données recueillies sont insuffisantes pour produire un résultat de test (par exemple, l'opérateur a interrompu un test en cours).

- MRSA—NO RESULT (SARM—PAS DE RÉSULTAT)
- SPC—NO RESULT (CTE—PAS DE RÉSULTAT)
- Probe Check—NA (Vérification de la sonde—NON APPLICABLE)

Raisons pour lesquelles le test doit être répété

Répéter le test en utilisant une nouvelle cartouche et un nouveau réactif d'élution (ne pas réutiliser la cartouche), ou démarrer d'autres procédures si l'un des résultats de test suivants se produit :

- Un résultat **INVALID** (NON VALIDE) indique que le CTE a échoué. L'échantillon n'a pas été traité correctement, ou la PCR est inhibée.
- Un résultat **ERROR** (ERREUR) indique que le contrôle de vérification de la sonde a échoué et que le test a été annulé, possiblement en raison d'un tube réactionnel mal rempli, de la détection d'un problème d'intégrité de la sonde ou d'un dépassement des limites de pression maximale.
- Un résultat **NO RESULT** (PAS DE RÉSULTAT) indique que les données recueillies sont insuffisantes. Par exemple, l'opérateur a interrompu un test en cours.

Limites du test

Les performances de Xpert MRSA Assay ont été validées en utilisant uniquement les procédures fournies dans cette notice. La modification de ces procédures peut modifier les performances du test. Les résultats du Xpert MRSA Assay doivent être interprétés ensemble avec d'autres données biologiques et cliniques à la disposition du clinicien.

Des résultats de test erronés peuvent résulter d'un prélèvement incorrect, du non respect des procédures recommandées pour le prélèvement ou la manipulation et le stockage des échantillons, d'une erreur technique, d'une confusion dans les échantillons ou d'une concentration d'organismes trop basse pour être détectée dans le prélèvement à l'aide du test. Il est nécessaire de respecter scrupuleusement les instructions de cette notice afin d'éviter des résultats erronés.

La détection de SARM étant dépendante du nombre d'organismes présents dans l'échantillon, l'obtention de résultats fiables dépend d'un prélèvement, d'une manipulation et d'un stockage corrects.

La décision de répéter le test Xpert MRSA quand les résultats sont **INVALID** (NON VALIDE), **ERROR** (ERREUR) et **NO RESULT** (PAS DE RÉSULTAT) doit dépendre des pratiques et réglementations de chaque établissement. D'autres procédures doivent être disponibles (par ex., la culture sur géloses sélectives avec ou sans incubation d'une nuit dans un bouillon d'enrichissement sélectif). Pour la culture, les prélèvements par écouvillon qui restent doivent être placés dans des systèmes de transport appropriés et mis en culture dans un délai de 4 jours.

Un résultat de test positif n'indique pas forcément la présence d'organismes viables. Il constitue toutefois une présomption de la présence de SARM.

Les tests avec Xpert MRSA doivent être utilisés conjointement aux autres méthodes disponibles.

Les résultats du test peuvent aussi être affectés par une antibiothérapie concomitante. Le succès ou l'échec thérapeutique ne peut donc pas être évalué à l'aide de ce test car l'ADN peut persister après le traitement antimicrobien.

Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison d'amorce ou de sonde peuvent affecter la détection de variantes de SARM nouveaux ou inconnus, produisant un résultat faussement négatif.

Substances interférentes

Les substances potentiellement interférentes évaluées comprenaient le sang, le mucus et les sprays nasaux utilisés pour soulager les symptômes de congestion, sécheresse ou irritation nasale. La présence de ces substances n'a pas significativement inhibé la PCR et n'a pas produit des résultats non valides ou erronés.

Dans l'étude expérimentale sur Xpert MRSA Assay, des substances potentiellement interférentes (sang, mucus ou les deux) ont été rapportées dans 45 des 1 077 (4,2 %) prélèvements par écouvillon nasal. Parmi les 31 prélèvements ayant produit un résultat équivoque au test initial, trois avaient du mucus et un avait du sang sur l'écouvillon. Trois des quatre prélèvements ont produit un résultat lorsqu'ils ont été retestés, et un des prélèvements avec mucus est resté indéterminé.

Valeurs attendues

Dans l'étude clinique sur Xpert MRSA, un total de 1 077 prélèvements nasaux ont été recueillis chez 1 077 sujets dans 7 sites d'inscription aux États-Unis. La population de l'étude a été divisée selon les groupes suivants : sujets en centre de soins infirmiers ou soins prolongés, sujets hospitalisés pour 3 jours, sujets hospitalisés pendant 3 jours ou moins, consultations externes et personnel ou autres. Le nombre et le pourcentage des cas positifs et négatifs par la méthode de culture de référence sont calculés et présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1. Valeurs attendues pour le SARM dans l'étude de populations différentes

Groupe	n positif (%)	n négatif (%)	Total (%) ¹
Centre de soins infirmiers ou soins prolongés	62 (25,5)	181 (74,5)	243 (22,6)
Hospitalisation >3 jours	61 (23,0)	204 (77,0)	265 (24,7)
Hospitalisation =3 jours	29 (13,1)	193 (86,9)	222 (20,7)
Consultation externe	46 (17,7)	214 (82,3)	260 (24,2)
Personnel et autres	11 (12,9)	74 (87,1)	85 (7,9)
Total	209 (19,4)	866 (80,6)	1075

¹ Les dates d'admission de deux sujets hospitalisés à culture positive sont inconnues.

Caractéristiques de performance

Performances cliniques

Les caractéristiques de performance de Xpert MRSA Assay ont été déterminées lors d’une étude expérimentale prospective multi-sites réalisée dans sept centres aux États-Unis, en comparant Xpert MRSA Assay sur le GeneXpert System à un deuxième test d’amplification de l’acide nucléique (NAAT) validé par la FDA et à une culture enrichie, qui est la méthode de culture la plus sensible. Les sujets comprenaient des patients et des membres du personnel médical à risque de colonisation nasale. Chaque sujet a été inscrit à l’étude une seule fois. Les sujets ayant reçu des antibiotiques systémiques ou topiques/nasaux dans la période de 48 heures à une semaine précédant l’inscription à l’étude, les sujets âgés de moins de 2 ans et les sujets chez lesquels un prélèvement par écouvillon nasal était contre-indiqué étaient exclus de l’étude. Seuls les sujets répondant aux critères d’inclusion et d’exclusion ont été inscrits.

Des prélèvements par écouvillon nasal ont été réalisés chez chacun des sujets. Un écouvillon a été testé avec Xpert MRSA Assay et l’autre avec le deuxième test NAAT validé par la FDA. Les deux types de test NAAT ont été réalisés sur les lieux de chaque centre participant, et un écouvillon supplémentaire a été envoyé à un laboratoire centralisé pour mise en culture.

Au laboratoire centralisé, l’écouvillon a été étalé directement sur une gélose chromogène sélective à la céfoxitine, qui a ensuite été incubée à 35 ±2 °C pendant 24 à 48 heures. L’écouvillon a été transféré à un bouillon trypticase soja (TSB) avec 6,5 % de chlorure de sodium, et incubé à 35 ±2 °C pendant 18 à 24 heures. Si l’étalement direct était négatif après 24 heures, le TSB enrichi était étalé sur une autre gélose chromogène à la céfoxitine, incubée à 35 ±2 °C pendant 24 à 48 heures. La confirmation des colonies positives présomptives par l’une ou l’autre des méthodes de culture a été effectuée en testant la coagulase en tube et la coloration de Gram.

Les performances de Xpert MRSA Assay et du deuxième test NAAT validé par la FDA ont été calculées relativement aux résultats de culture du laboratoire central (culture de référence).

Résultats d’ensemble

Au total, 1 077 sujets éligibles (un prélèvement par patient) ont été testés pour le SARM avec Xpert MRSA, et un 2^e test NAAT validé par la FDA et une culture. Xpert MRSA a identifié 86,3 % des prélèvements positifs à SARM et 94,9 % des prélèvements négatifs à SARM relativement à la méthode de culture de référence. Pour les sujets testés, la valeur prédictive positive était de 80,5 % et la valeur prédictive négative de 96,6 %.

Tableau 2a. Xpert MRSA comparé à la méthode de culture de référence

		Culture			
		+	-		
Xpert MRSA	+	182	44	226	Concordance positive : 86,3 %
	-	29	819	848	Concordance négative : 94,9 %
		211	863	1 074*	VPP ¹ : 80,5 %
					VPN ² : 96,6 %

* 3 prélèvements n’ont pas produit de résultats avec Xpert à deux reprises

¹ Valeur prédictive positive

² Valeur prédictive négative

Par comparaison avec la méthode de culture directe (écouvillons étalés directement sur une gélose chromogène sélective à la céfoxitine sans enrichissement au TSB, suivi d'une incubation à 35 ± 2 °C pendant 24 à 48 heures), Xpert MRSA a identifié 94,3 % des prélèvements positifs à SARM et 93,2 % des prélèvements négatifs à SARM ; la valeur prédictive positive était de 73,0 % et la valeur prédictive négative de 98,8 %.

Tableau 2b. Xpert MRSA comparé à la méthode de culture directe

		Culture directe			
		+	-		
Xpert MRSA	+	165	61	226	Concordance positive : 94,3 %
	-	10	838	848	Concordance négative : 93,2 %
		175	899	1 074	VPP ¹ : 73,0 %
					VPN ² : 98,8 %

¹ Valeur prédictive positive

² Valeur prédictive négative

Les tableaux suivants montrent les performances de Xpert MRSA et la prévalence de SARM dans chaque site clinique par rapport aux méthodes de la culture de référence et de la culture directe.

Tableau 3a. Performances de Xpert MRSA par site par rapport à la méthode de culture de référence

Site	Prévalence de SARM ¹	Concordance positive (n) (IC à 95 %) ²	Concordance négative (n) (IC à 95 %) ³	Nbre de résultats indéterminés
1	20,2 % (78/387)	87,2 % (n=78) (77,7-93,7 %)	93,9 % (n=309) (90,6-96,3 %)	10
2	5,2 % (3/58)	100,0 % (n=3) (29,2-100,0 %)	98,2 % (n=55) (90,3-100,0 %)	3
3	44,4 % (12/27)	91,7 % (n=12) (61,5-99,8 %)	100,0 % (n=15) (78,2-100,0 %)	3
4	12,3 % (20/162)	80,0 % (n=20) (56,3-94,3 %)	97,2 % (n=142) (92,9-99,2 %)	9
5	20,5 % (46/224)	89,1 % (n=46) (76,4-96,4 %)	94,9 % (n=178) (90,6-97,7 %)	1
6	22,3 % (42/188)	81,0 % (n=42) (65,9-91,4 %)	93,2 % (n=146) (87,8-96,7 %)	6
7	35,7 % (10/28)	90,0 % (n=10) (55,5-99,8 %)	94,4 % (n=18) (72,7-99,9 %)	2
Total	19,6 % (211/1 074)	86,3 % (n=211) (80,9-90,6 %)	94,9 % (n=863) (93,2-96,3 %)	34

¹ Déterminée à partir des résultats par la méthode de culture de référence

² Nombre de positifs déterminés par la méthode de culture de référence

³ Nombre de négatifs déterminés par la méthode de culture de référence

Tableau 3b. Performances de Xpert MRSA par site par rapport à la méthode de culture directe

Site	Concordance positive	Concordance négative
1	95,4 % (87,1-99,0 %)	92,2 % (88,8-94,9 %)
2	100,0 % (29,2-100,0 %)	98,2 % (90,3-100,0 %)
3	91,7 % (61,5-99,8 %)	100,0 % (78,2-100,0 %)
4	81,3 % (54,4-96,0 %)	95,2 % (90,4-98,1 %)
5	94,9 % (82,7-99,4 %)	93,0 % (88,3-96,2 %)
6	97,1 % (84,7-99,9 %)	92,9 % (87,6-96,4 %)
7	100,0 % (54,1-100,0 %)	81,8 % (59,7-94,8 %)
Total	94,3 % (89,7-97,2 %)	93,2 % (91,4-94,8 %)

Les performances de Xpert MRSA, du 2^e test NAAT validé par la FDA et de la méthode de culture directe dans les sites individuels par rapport à la méthode de culture de référence sont présentées au tableaux ci-dessous.

Tableau 4a. Résultats de Xpert MRSA, de la méthode de culture directe et du deuxième test NAAT validé par la FDA avec des échantillons positifs à SARM par la méthode de culture de référence

Concordance positive (IC à 95 %)			
Site	Xpert MRSA	2 ^e NAAT	Culture directe ¹
1	87,2 % (77,7-93,7 %)	80,8 % (70,3-88,8 %)	83,3 % (73,2-90,8 %)
2	100,0 % (29,2-100,0 %)	100,0 % (29,2-100,0 %)	100,0 % (29,2-100,0 %)
3	91,7 % (61,5-99,8 %)	83,3 % (51,6-97,9 %)	100,0 % (73,5-100,0 %)
4	80,0 % (56,3-94,3 %)	78,9 % (54,4-93,9 %)	80,0 % (56,3-94,3 %)
5	89,1 % (76,4-96,4 %)	89,1 % (76,4-96,4 %)	84,8 % (71,1-93,7 %)
6	81,0 % (65,9-91,4 %)	78,6 % (63,2-89,7 %)	81,0 % (65,9-91,4 %)
7	90,0 % (55,5-99,7 %)	100,0 % (69,2-100,0 %)	60,0 % (26,2-87,8 %)
Total	86,3 % (80,9-90,6 %)	83,3 % (77,6-88,1 %)	82,9 % (77,2-87,8 %)

¹ Écouvillons étalés directement sur une gélose chromogène sélective à la céfoxitine, et incubés à 35 ±2 °C pendant 24 à 48 heures.

Tableau 4b. Résultats de Xpert MRSA, de la méthode de culture directe et du deuxième test NAAT validé par la FDA avec des échantillons négatifs à SARM par la méthode de culture de référence

Concordance négative (IC à 95 %)			
Site	Xpert MRSA	2^e NAAT	Culture directe¹
1	93,9 % (90,6-96,3 %)	92,2 % (88,7-95,0 %)	100,0 % (98,8-100,0 %)
2	98,2 % (90,3-100,0 %)	98,2 % (90,3-100,0 %)	100,0 % (93,6-100,0 %)
3	100,0 % (78,2-100,0 %)	100,0 % (79,4-100,0 %)	100,0 % (79,4-100,0 %)
4	97,2 % (92,9-99,2 %)	97,9 % (93,9-99,6 %)	100,0 % (97,5-100,0 %)
5	94,9 % (90,6-97,7 %)	93,8 % (89,2-96,9 %)	100,0 % (97,9-100,0 %)
6	93,2 % (87,8-96,7 %)	94,5 % (89,5-97,6 %)	100,0 % (97,5-100,0 %)
7	94,4 % (72,7-99,9 %)	94,4 % (72,7-99,9 %)	100,0 % (81,5-100,0 %)
Total	94,9 % (93,2-96,3 %)	94,4 % (92,7-95,9 %)	100,0 % (99,6-100,0 %)

¹ Écouvillons étalés directement sur une gélose chromogène sélective à la céfoxitine, et incubés à 35 ±2 °C pendant 24 à 48 heures.

Spécificité analytique

Des cultures de 51 souches de l'American Type Culture Collection (ATCC) et du Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA), représentant des espèces phylogénétiquement proches de *S. aureus* et des membres de la flore commensale du nez, 32 souches de staphylocoques coagulase négatifs sensibles à la méticilline et 12 souches de staphylocoques coagulase négatifs résistants à la méticilline ont été testées. Trois réplicats de chaque isolat ont été testés à $\approx 1 \times 10^6$ UFC/écouvillon. Le test n'a détecté aucun de ces isolats. La spécificité était de 100 %.

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique de Xpert MRSA a été déterminée en utilisant 6 souches de SARM représentant les six types et sous-types SCC_{mec} (I, II, III, IV, IVa et V). Des cultures de ces souches ont été quantifiées puis diluées pour obtenir des valeurs représentant une plage de 10 à 1 000 unités formant colonie (UFC) par écouvillon. Toutes les dilutions ont été testées en 4 réplicats. La limite de détection obtenue pour chaque type ou sous-type testé montre la valeur d'UFC/écouvillon la plus basse à laquelle les 4 réplicats étaient rapportés comme positifs. Toutes les souches représentant les types de cassette SCC_{mec} I à V étaient détectées par Xpert MRSA Assay.

Tableau 5. Détection du type SCC_{mec}

SCC _{mec}	(UCF/ écouvillon)
type I	10
type II	10
type III	10
type V	10
type IV	50
type IVa	100

Des études supplémentaires ont été réalisées avec des cellules de type II pour déterminer l'intervalle de confiance à 95 % de la limite de détection (LDD) analytique pour ce test. La limite de détection est définie comme le plus petit nombre d'unités formant colonie (UFC) de SARM par échantillon pouvant être différencié de façon reproductible des échantillons négatifs avec une confiance de 95 %. Les résultats indiquent que Xpert MRSA produira un résultat positif avec une confiance à 95 % pour un écouvillon contenant 80 UFC.

Reproductibilité

Un panel de prélèvements avec diverses concentrations de SARM et de *Staphylococcus epidermidis* sensible à la méthicilline (négatif) a été testé en triple pendant 10 jours différents dans chacun des trois sites (4 prélèvements × 3 fois / jour × 10 jours × 3 sites). Un lot du kit Xpert MRSA a été utilisé dans chacun des 3 sites de test. Les tests Xpert MRSA ont été accomplis conformément à la procédure Xpert MRSA.

Tableau 6. Synthèse des résultats de reproductibilité

Specimen ID (ID de l'échantillon)	SARM en UFC/ écouvillon	MSSE UFC/ écouvillon	Site 1	Site 2	Site 3	Concordance globale	% de concordance globale
Négatif	0	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/31 ^A	90/91	98,9 %
Faiblement positif	117	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	27/29 ^A	87/89	97,8 %
Positif	800	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/30	90/90	100,0 %
Fortement positif	$2,6 \times 10^4$	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/30	90/90	100,0 %
Concordance globale			120/120	120/120	117/120	357/360	99,2 %
% de concordance			100,0 %	100,0 %	97,5 %		

^A Xpert MRSA Assay a été réalisé par erreur sur un prélèvement négatif supplémentaire et un prélèvement faiblement positif en moins

Bibliographie

1. Mainous AG, Hueston WJ, Everett, CJ, Vanessa A. Diaz VA. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in the United States, 2001-2002. *An Family Medicine*. 2006;4(2):132-137.
2. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004;32:470-85.
3. Chaix C, Durand-Zileski I, Alberti C, Buisson B. Control of Endemic Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *JAMA* 1999;282(19):1745-51.
4. Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases* 2001;7(2) 323-6.
5. Salgado CD et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-analysis of Prevalence and Risk Factors. *CID* 2003;36:131.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).

Assistance

Pour obtenir de l'assistance, contacter Cepheid aux coordonnées suivantes. Que ce soit par téléphone ou par e-mail, veiller à fournir le numéro de série de l'instrument et le numéro d'identification du lot de réactifs.

Amérique du Nord

Pour obtenir le service d'assistance technique, utiliser les coordonnées suivantes :

Tél : 888.838.3222 Option 2

E-mail : techsupport@cepheid.com

Le service d'assistance technique de Cepheid est joignable par téléphone du lundi au vendredi, de 5h00 à 17h00 (heure normale du Pacifique).

Union européenne

Pour obtenir le service d'assistance technique, utiliser les coordonnées suivantes :

Tél : +33.563.82.53.19

Fax : +33.563.82.53.01

E-mail : support@cepheideurope

Autres bureaux

Contacter un représentant Cepheid local.

Tableau des symboles

Symbole	Signification
	Numéro de référence
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Marquage CE – Conformité européenne
	Mandataire agréé pour la Communauté européenne
	Ne pas réutiliser
	Attention, consulter la documentation jointe
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
	Contrôle
	Limites de température
	Risque biologique


 Cepheid
 904 Caribbean Drive
 Sunnyvale, CA 94089-1189
 États-Unis

Téléphone : +1.408.541.4191
 Fax : +1.408.541.4192


 Cepheid Europe
 Vira Solelh
 81470 Maurens-Scopont
 France

Tél : +33.563.82.53.00
 Fax : +33.563.82.53.01
 E-mail : cepheid@cepheideurope



Deutsch

Nur zum Gebrauch als *In-vitro*-Diagnostikum

Geschützte Bezeichnung

Xpert® MRSA

Allgemein übliche Bezeichnung

Xpert MRSA Assay

Verwendungszweck

Der Cepheid Xpert MRSA Assay zur Durchführung auf dem GeneXpert® Dx System (Xpert MRSA) ist ein qualitativer Test zur *In-vitro*-Diagnostik, der auf den raschen Nachweis von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in nasalen Abstrichproben von Patienten, bei denen das Risiko einer Besiedlung der Nase besteht, ausgelegt ist. Der Test verwendet das Prinzip der automatisierten Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) in Echtzeit zum Nachweis von MRSA-DNA. Der Xpert MRSA Assay ist zur Verwendung als Hilfsmittel bei der Vorbeugung gegen bzw. Eindämmung von MRSA-Infektionen in medizinischen Einrichtungen bestimmt. Der Xpert MRSA Assay ist nicht zur Diagnose oder Behandlungsführung bzw. -überwachung bei MRSA-Infektionen bestimmt. Gleichzeitige Kulturen sind nur erforderlich, um Organismen für eine epidemiologische Typisierung oder weitergehende Sensitivitätstests zu gewinnen.

Zusammenfassung und Erläuterung

Staphylococcus aureus (SA) ist einer der wichtigsten nosokomialen Erreger und verursacht eine Reihe von Krankheiten wie z.B. Endokarditis, Osteomyelitis, toxisches Schock-Syndrom, Lebensmittelvergiftungen, Karbunkel und Furunkel. In den frühen 1950-er Jahren vereitelte die Akquisition und Verbreitung von β -Lactamasen produzierenden Plasmiden die Wirksamkeit von Penicillin für die Behandlung von Infektionen mit *S. aureus*. Im Jahr 1959 wurde Methicillin, ein synthetisches Penicillin, eingeführt. Bereits 1960 wurden Methicillin-resistente *S.-aureus*-Stämme identifiziert. Als Ursache dafür wurde festgestellt, dass *S. aureus* das Gen *mecA* erworben hatte. Heute ist MRSA in den USA für etwa 25% der nosokomialen Infektionen verantwortlich, während immer häufiger von MRSA-Infektionen in der nicht hospitalisierten Bevölkerung („community-acquired“) mit signifikanter Morbidität und Mortalität berichtet wird. Im Bestreben, die Ausbreitung derartiger Infektionen zu limitieren, werden in medizinischen Einrichtungen Kontrollstrategien und -richtlinien erarbeitet und praktisch umgesetzt. Die meisten Infektionskontrollprogramme an Krankenhäusern konzentrieren sich primär auf die Eindämmung von MRSA. Zurzeit ist die Standardmethode für den Nachweis von MRSA die Kultur. Dies ist mit hohem Arbeits- und Zeitaufwand verbunden.^{1,2,3,4,5} Eine rasche und empfindlichere Überwachungsmethode für MRSA stellt einen klaren Vorteil für Infektionskontrollprogramme dar.

Funktionsprinzip

Das GeneXpert Dx System automatisiert und integriert Probenreinigung, Nukleinsäureamplifikation und Nachweis der Zielsequenz in einfachen oder komplexen Proben mithilfe von Echtzeit-PCR und RT-PCR-Assays. Das System besteht aus einem Instrument, einem PC und einer bereits vorgeladenen Software zur Durchführung von Tests an entnommenen Proben und zum Anzeigen der Ergebnisse. Das System beruht auf der Anwendung von GeneXpert-Einwegkartuschen, die die PCR-Reagenzien enthalten und in denen der PCR-Prozess abläuft. Da die Kartuschen abgeschlossene Einheiten darstellen, wird die Kreuzkontamination zwischen Proben eliminiert. Eine vollständige Beschreibung des Systems findet sich im *GeneXpert Dx System-Benutzerhandbuch*.

Der Xpert MRSA Assay enthält Reagenzien für den Nachweis von MRSA sowie eine Probenbearbeitungskontrolle (Sample Processing Control, SPC) für die Kontrolle der adäquaten Bearbeitung der Zielbakterien sowie die Überwachung von vorhandenen Hemmsubstanzen in der PCR-Reaktion. Die Sondenprüfungskontrolle (Probe Check Control, PCC) verifiziert die Rehydrierung der Reagenzien, Füllung des PCR-Behälters in der Kartusche, Unversehrtheit der Sonden und Stabilität des Fluorophors.

Die Primer und Sonden im Xpert MRSA Assay untersuchen eine proprietäre Sequenz auf das Vorhandensein einer in das *S.-aureus*-Chromosom eingebauten Genkassette.

Reagenzien und Instrumente

Enthaltene Materialien

Der Xpert MRSA(GXM RSA-100N-10) enthält genügend Reagenzien zur Verarbeitung von 10 Patienten- oder Qualitätskontrollproben. The Xpert MRSA(GXM RSA-120) enthält genügend Reagenzien zur Verarbeitung von 120 Patienten- oder Qualitätskontrollproben.

Das Kit enthält die folgenden Materialien:

	10	120
Xpert MRSA Assay-Kartuschen mit integrierten Reaktionsbehältern		
Kügelchen 1 (gefriergetrocknet)	1 pro Kartusche	1 pro Kartusche
Polymerase		
dNTPs		
Bovines Serumalbumin (BSA)		
Kügelchen 2 (gefriergetrocknet)	1 pro Kartusche	1 pro Kartusche
Primer		
Sonden		
BSA		
Kügelchen 3 (gefriergetrocknet)	1 pro Kartusche	1 pro Kartusche
Probenbearbeitungskontrolle (Sample Processing Control, SPC)		
~6000 nicht infektiöse Sporen für die Probenvorbereitungskontrolle		
Reagens 1 (Natriumhydroxid)	3,0 ml pro Kartusche	3,0 ml pro Kartusche
Reagens 2 (Tris-Puffer, EDTA und Tenside)	3,0 ml pro Kartusche	3,0 ml pro Kartusche
Xpert MRSA-Reagenzienbeutel	1	1
Elutionsreagens (Guanidiniumthiocyanat und Tenside)	10 × 1,5 ml pro Beutel	125 × 1,5 ml pro Beutel

Hinweise:

Sicherheitsdatenblätter (MSDS) für alle in diesem Assay enthaltenen Reagenzien sind auf Anfrage vom technischen Kundendienst von Cepheid erhältlich und stehen auch auf den Websites von Cepheid (www.cepheid.com und www.cepheidinternational.com) zur Verfügung.

Das bovine Serumalbumin (BSA) in diesem Produkt wurde ausschließlich aus bovinem Plasma hergestellt, das aus den USA stammt. Die Herstellung des BSA erfolgt ebenfalls in den USA. Die Rinder wurden weder mit Wiederkäuerprotein noch anderen tierischen Proteinen gefüttert und wurden vor und nach der Schlachtung erfolgreich Tests unterzogen. Während der Verarbeitung kam es nicht zu einer Vermischung des Materials mit anderen Materialien tierischer Herkunft.

Aufbewahrung und Handhabung

- Xpert MRSA-Kartuschen und Reagenzien bei 2 °C – 28 °C aufbewahren.
- Keine Reagenzien oder Kartuschen verwenden, deren Verfallsdatum abgelaufen ist.
- Die Kartusche erst dann öffnen, wenn die Testdurchführung unmittelbar bevorsteht.
- Keine Reagenzien verwenden, die trübe geworden sind oder sich verfärbt haben.

Erforderliche, jedoch nicht enthaltene Materialien

- GeneXpert Dx System (verschiedene Bestellnummern, je nach Konfiguration): GeneXpert Instrument, Computer, Hand-Strichcodescanner und Benutzerhandbuch
- Drucker (Kompatibilitätshinweise siehe *GeneXpert Dx System-Benutzerhandbuch*)
- Cepheid Sample Collection Device (Teile-Nummer 900-0370)
- Vortex-Mixer
- Sterile Einweg-Transferpipetten
- Steriler Mull

Erhältliche, jedoch nicht enthaltene Materialien

KWIK-STIKs™ von MicroBioLogics, Bestellnr. 0158 MRSA, als Positivkontrolle und Bestellnr. 0371 MSSE (Methicillin-sensible *Staphylococcus epidermidis*) als Negativkontrolle.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

-  • Alle biologischen Patientenproben einschließlich der gebrauchten Kartuschen müssen wie potenziell infektiöses Material behandelt werden. Da es oft unmöglich ist, potenziell infektiöse Proben zu erkennen, sind alle biologischen Proben gemäß den üblichen Vorsichtsmaßnahmen zu behandeln. Richtlinien für den Umgang mit Proben sind von den U.S. Centers for Disease Control and Prevention⁶ und vom Clinical and Laboratory Standards Institute (vormals National Committee for Clinical Laboratory Standards) erhältlich.⁷
- Die Sicherheitsvorkehrungen der jeweiligen Einrichtung für den Umgang mit Chemikalien und biologischen Proben sind zu befolgen.
- Der Xpert MRSA Assay liefert keine Ergebnisse zur Antibiotikasensitivität. Für Kulturen und Sensitivitätstests ist zusätzlicher Zeitaufwand erforderlich.
- Keine Reagenzien des Xpert MRSA Assays durch andere Reagenzien ersetzen.
- Der Deckel der Xpert MRSA Assay-Kartusche darf nur für die Zugabe der Probe geöffnet werden.
- Keine Kartuschen verwenden, die nach der Zugabe der Probe fallen gelassen oder geschüttelt wurden.
- Keine Kartuschen mit beschädigtem Reaktionsbehälter verwenden.
-  • Jede Xpert MRSA Assay-Einwegkartusche wird für die Bearbeitung eines Einzeltests verwendet. Verbrauchte Kartuschen nicht wiederverwenden.
- Die sachgemäße Entsorgung von verbrauchten Kartuschen und unverbrauchten Reagenzien muss mit dem Umwelt-/Abfallbeauftragten der jeweiligen Einrichtung abgesprochen werden. Dieses Material weist eventuell Eigenschaften eines gefährlichen Abfallstoffs im Sinne des Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) der US-Umweltbehörde EPA auf. Bundesstaatliche und lokale Bestimmungen können von den bundesweiten Bestimmungen abweichen und sind ebenfalls zu beachten. Einrichtungen außerhalb der USA müssen sich an die Bestimmungen zur Entsorgung von gefährlichen Abfällen des jeweiligen Landes halten.
-  • Das Xpert MRSA Assay-Kit bei 2 °C – 28 °C aufbewahren.
-  • Reagens 1 enthält Natriumhydroxid (pH > 12,5; R-Satz R34), das ätzend auf Augen und Haut wirkt. Augen- und Hautschutz ist erforderlich.
-  • Das Elutionsreagens enthält Guanidiniumthiocyanat (R-Sätze R32; R52/53), das schädlich für Wasserorganismen ist.

Entnahme und Transport der Patientenproben



Zur Gewinnung adäquater Patientenproben müssen die Anweisungen in diesem Abschnitt genau befolgt werden.

1. Das Cepheid Collection Device durch Abziehen der äußeren Verpackung öffnen.
 2. Den Patienten auffordern, den Kopf in den Nacken zu legen. Die trockenen Tupfer jeweils etwa 1 bis 2 cm weit in beide Nasenlöcher einführen.
 3. Die Tupfer 3 Sekunden lang in Kontakt mit der Innenseite des Nasenlochs drehen. Dabei leicht mit einem Finger von außen auf das Nasenloch drücken, damit der Tupfer guten Kontakt mit dem Naseninneren hat.
 4. Den Vorgang mit den gleichen Tupfern am anderen Nasenloch wiederholen. Dabei darauf achten, nur die Innenseite der Nase zu berühren.
 5. Das Kunststoff-Transportröhrchen entnehmen. Den Deckel des Röhrchens abdrehen und entsorgen. Die Tupfer in das Kunststoff-Transportröhrchen stecken. Dabei sollten die Tupfer ganz in das Röhrchen eingeführt werden, bis sie auf dem Schwamm am Boden des Röhrchens aufliegen. Darauf achten, dass der rote Deckel fest sitzt.
- Hinweis:** Die Tupfer müssen zu jedem Zeitpunkt fest mit dem roten Deckel verbunden bleiben.
6. Das Kunststoff-Transportröhrchen mit der Patienten-ID beschriften und an das Labor senden.
 7. Den Tupfer mit der Abstrichprobe bei Raumtemperatur (15 °C – 30 °C) aufbewahren, wenn die Probe innerhalb von 24 Stunden bearbeitet wird. Andernfalls den Tupfer bei 2 °C – 8 °C aufbewahren. Der Tupfer mit der Abstrichprobe ist bei Aufbewahrung bei 2 °C – 8 °C bis zu 5 Tage lang stabil.

Testverfahren

Vorbereitung der Kartusche

Wichtig: Der Test muss innerhalb von 15 Minuten nach der Zugabe der Probe zur Kartusche begonnen werden.

Hinweis: Nur einen der Tupfer verwenden. Der zweite Tupfer ist für einen Wiederholungstest erforderlich.

Zugabe der Probe in die Kartusche (Xpert MRSA):

1. Kartusche und Elutionsreagens aus dem Kit nehmen.
2. Die Tupfer aus dem Transportbehälter nehmen und anschließend einen Tupfer vom roten Deckel abnehmen.
3. Den Tupfer in das Röhrchen mit Elutionsreagens einführen.

Hinweis: Ein Stück sterilen Mull verwenden, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

4. Den Tupfer dicht am Rand des Röhrchens am Stiel anfassen, den Tupfer einige Millimeter vom Boden des Röhrchens abheben und den Stiel abbrechen, indem er gegen den Rand des Röhrchens gedrückt wird. Darauf achten, dass der Tupfer kurz genug ist, sodass der Deckel fest verschlossen werden kann.
5. Mit dem Deckel verschließen und 10 Sekunden lang bei hoher Geschwindigkeit im Vortex mixen.
6. Den Kartuschendeckel öffnen. Mit einer sterilen Transferpipette den gesamten Inhalt des Elutionsreagens in die große, mit einer Aussparung versehene Öffnung (siehe Nr. 1 in Abbildung 1) in der GeneXpert-Kartusche transferieren.
7. Den Kartuschendeckel schließen.

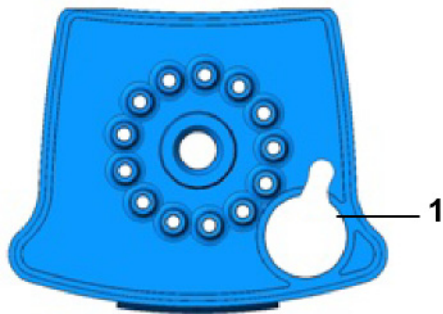


Abbildung 1. Xpert MRSA-Kartusche (Ansicht von oben).

Start des Tests

Wichtig: Sicherstellen, dass die Assay-Definitionsdatei für den Xpert MRSA Assay in die GeneXpert Software importiert wurde, bevor der Test gestartet wird.

In diesem Abschnitt werden die grundlegenden Schritte der Testdurchführung beschrieben. Detaillierte Anweisungen sind im *GeneXpert Dx System-Benutzerhandbuch* zu finden.

1. Den Computer und anschließend das GeneXpert Dx-Instrument einschalten.
2. Auf dem Windows®-Desktop das Verknüpfungssymbol für GeneXpert Dx doppelklicken.
3. Mit dem eigenen Benutzernamen und Kennwort in die GeneXpert Dx System-Software einloggen.
4. Im GeneXpert Dx System-Fenster auf **Create Test** (Test erstellen) klicken. Das Dialogfenster „Scan Cartridge Barcode“ (Strichcode der Kartusche einscannen) öffnet sich.
5. Den Strichcode der Xpert MRSA Assay-Kartusche einscannen. Das Fenster „Create Test“ (Test erstellen) öffnet sich. Die Software füllt die folgenden Felder anhand der im Strichcode enthaltenen Informationen selbsttätig aus: **Select Assay** (Assay wählen), **Reagent Lot ID** (ID der Reagenziencharge), **Cartridge SN** (Seriennummer der Kartusche) und **Expiration Date** (Verfallsdatum).

6. Im Feld **Sample ID** (Proben-ID) die ID der Probe einscannen bzw. eintippen. Bei manueller Eingabe darauf achten, die Proben-ID korrekt einzugeben. Die Proben-ID ist mit den Testergebnissen verknüpft und erscheint im Fenster „View Results“ (Ergebnisse anzeigen) sowie in allen Berichten.
7. Auf **Start Test** (Test starten) klicken. Im Dialogfenster, das sich daraufhin öffnet, das eigene Kennwort eintippen.
8. Die Tür des Instrumentenmoduls, deren Anzeigeleuchte grün blinkt, öffnen und die Kartusche einsetzen.
9. Die Tür schließen. Der Test beginnt und die grüne Anzeigeleuchte blinkt nicht mehr. Sobald der Test abgeschlossen ist, erlischt die Anzeigeleuchte.
10. Abwarten, bis das System die Türverriegelung freigibt. Anschließend die Modultür öffnen und die Kartusche entnehmen.
-  11. Verbrauchte Kartuschen müssen entsprechend den üblichen Praktiken der jeweiligen Einrichtung in einem geeigneten Proben-Abfallbehälter entsorgt werden.

Ergebnisse anzeigen und ausdrucken

Detaillierte Anweisungen zum Anzeigen und Ausdrucken von Ergebnissen sind im *GeneXpert Dx System-Benutzerhandbuch* zu finden.

CONTROL Qualitätskontrolle

Alle Tests verwenden eine Probenbearbeitungskontrolle (Sample Processing Control, SPC) und eine Sondenprüfungskontrolle (Probe Check Control, PCC).

Probenbearbeitungskontrolle (Sample Processing Control, SPC)—Stellt sicher, dass die Probe korrekt bearbeitet wurde. Die SPC enthält Sporen von *Bacillus globigii* in Form einer trockenen Sporentablette und ist in jeder Kartusche enthalten, um die sachgemäße Bearbeitung des MRSA zu verifizieren. Die SPC verifiziert, dass die Lyse von MRSA eingetreten ist, sofern diese Organismen vorhanden sind, und dass die Bearbeitung der Patientenprobe adäquat ist. Darüber hinaus stellt diese Kontrolle eine probenbedingte Hemmung des Echtzeit-PCR-Assays fest. Die SPC muss bei negativen Proben positiv ausfallen. Bei positiven Proben kann sie negativ oder positiv sein. Die SPC gilt als erfolgreich, wenn sie die validierten Akzeptanzkriterien erfüllt.

Sondenprüfungskontrolle (Probe Check Control, PCC)—Vor Beginn der PCR-Reaktion verifiziert das GeneXpert Dx System anhand des gemessenen Fluoreszenzsignals von den Sonden die Rehydrierung der Kügelchen, Füllung des Reaktionsbehälters, Unversehrtheit der Sonden und Stabilität des Fluorophors. Die Sondenprüfung gilt als erfolgreich, wenn sie die zugewiesenen Akzeptanzkriterien erfüllt.

Externe Kontrollen—KWIK-STIK™ (MicroBioLogics, Bestellnr. 0158 MRSA als Positivkontrolle und Bestellnr. 0371 MSSE als Negativkontrolle) können für Schulungszwecke, Fähigkeitstests und zur externen QK des GeneXpert Dx Systems eingesetzt werden. Zur Einhaltung von lokalen, bundesstaatlichen und bundesweiten Akkreditierungsvorschriften können ggf. externe Kontrollen verwendet werden. Dazu ist die nachstehend beschriebene Vorgehensweise für MicroBioLogics externe Kontrollen zu befolgen:

1. Den Beutel an der Kerbe aufreißen und den KWIK-STIK entnehmen.
2. Zur Freisetzung der Hydrierungsflüssigkeit den Boden der Ampulle im Deckel zusammendrücken.
3. Senkrecht halten und leicht anklopfen, damit die Flüssigkeit leichter durch den Schaft zum Boden der Einheit fließen kann, in dem das Pellet enthalten ist.
4. Damit das gefriergetrocknete Pellet sich leichter auflöst, sollte es zerdrückt und die Bodenkammer vorsichtig zusammengedrückt werden.
5. Den KWIK-STIK auseinanderziehen, um den Tupfer freizugeben. Anschließend den Tupfer in das Röhrchen mit Elutionsreagens einführen.
6. Der KWIK-STIK-Tupfer ist nun bereit für den Test mit dem Xpert MRSA Assay.

Interpretation der Ergebnisse

Das GeneXpert Dx System interpoliert die Ergebnisse anhand der gemessenen Fluoreszenzsignale und eingebauten Berechnungsalgorithmen. Die Ergebnisse werden im Fenster „View Results“ (Ergebnisse anzeigen) angezeigt. Die folgenden Ergebnisse sind möglich:

MRSA POSITIVE (MRSA positiv)

MRSA-Ziel-DNA nachgewiesen (vermutet positiv für eine Besiedlung mit MRSA).

- **MRSA—POSITIVE:** Die MRSA-Zielsequenz weist einen Ct-Wert innerhalb des gültigen Bereichs sowie einen Endpunkt oberhalb der Minimumeinstellung auf.
- **SPC – NA („not applicable“, nicht zutreffend):** SPC wird ignoriert, da die MRSA-Amplifikation u.U. mit dieser Kontrolle konkurriert.
- **Probe Check – PASS (Sondenprüfung – erfolgreich):** Alle Ergebnisse mit Sondenprüfung waren erfolgreich.

MRSA NEGATIVE (MRSA negativ)

MRSA-Ziel-DNA nicht nachgewiesen (vermutlich keine Besiedlung mit MRSA), SPC erfüllt die Akzeptanzkriterien.

- **MRSA – NEGATIVE (MRSA – negativ):** MRSA-Ziel-DNA nicht nachgewiesen.
- **SPC – PASS (SPC – erfolgreich):** SPC weist einen Ct-Wert innerhalb des gültigen Bereichs sowie einen Endpunkt oberhalb der Minimumeinstellung auf.
- **Probe Check – PASS (Sondenprüfung – erfolgreich):** Alle Ergebnisse mit Sondenprüfung waren erfolgreich.

INVALID (ungültig)

Vorliegen oder Abwesenheit von MRSA ist nicht zu bestimmen. Den Test mit dem zweiten Tupfer wiederholen. SPC erfüllt nicht die Akzeptanzkriterien, die Probe wurde nicht sachgemäß bearbeitet oder die PCR war gehemmt.

- **MRSA – INVALID (MRSA – ungültig):** Vorliegen oder Abwesenheit von MRSA-DNA ist nicht zu bestimmen.
- **SPC – FAIL (SPC – fehlgeschlagen):** das MRSA-Zielergebnis ist negativ und der SPC-Ct-Wert liegt nicht innerhalb des gültigen Bereichs und der Endpunkt liegt unterhalb der Minimumeinstellung.
- **Probe Check – PASS (Sondenprüfung – erfolgreich):** Alle Ergebnisse mit Sondenprüfung waren erfolgreich.

ERROR (Fehler)

Vorliegen oder Abwesenheit von MRSA ist nicht zu bestimmen. Den Test mit dem zweiten Tupfer wiederholen. Die Sondenprüfungskontrolle ist fehlgeschlagen. Dies ist wahrscheinlich auf eine unzureichende Füllung des Reaktionsbehälters, ein Problem mit der Unversehrtheit der Sonden oder eine Überschreitung der maximalen Druckgrenzwerte zurückzuführen.

- **MRSA – NO RESULT (kein Ergebnis)**
- **SPC – NO RESULT (kein Ergebnis)**
- **Probe Check – FAIL*** (Sondenprüfung – fehlgeschlagen); alle Sondenprüfungsergebnisse sind bzw. ein Sondenprüfungsergebnis ist fehlgeschlagen.

* Bei erfolgreicher Sondenprüfung geht der Fehler auf den Ausfall einer Systemkomponente zurück.

NO RESULT (kein Ergebnis)

Vorliegen oder Abwesenheit von MRSA ist nicht zu bestimmen. Den Test mit dem zweiten Tupfer wiederholen. Es wurden nicht genügend Daten gesammelt, um ein Testergebnis zu erzielen (zum Beispiel hat der Benutzer einen laufenden Test abgebrochen).

- **MRSA – NO RESULT (kein Ergebnis)**
- **SPC – NO RESULT (kein Ergebnis)**
- **Probe Check – NA (Sondenprüfung – nicht zutreffend)**

Anlässe für eine Wiederholung des Assays

Den Test mit einer neuen Kartusche und frischem Elutionsreagens (Kartusche nicht wiederverwenden) wiederholen oder auf Alternativmethoden ausweichen, wenn eines der folgenden Testergebnisse eintritt:

- Das Ergebnis **INVALID** (ungültig) zeigt an, dass die SPC fehlgeschlagen ist. Die Probe wurde nicht sachgemäß bearbeitet oder die PCR wurde gehemmt.
- Das Ergebnis **ERROR** (Fehler) zeigt an, dass die Sondenprüfungskontrolle fehlgeschlagen ist und der Assay abgebrochen wurde. Mögliche Ursachen: unzureichende Füllung des Reaktionsbehälters, Problem mit der Unversehrtheit der Sonden oder Überschreitung der maximalen Druckgrenzwerte.
- **NO RESULT** (kein Ergebnis) bedeutet, dass nicht genügend Daten gesammelt wurden. Zum Beispiel hat der Benutzer einen laufenden Test abgebrochen.

Einschränkungen

Die Leistungsdaten für den Xpert MRSA Assay wurden ausschließlich anhand der in dieser Packungsbeilage angegebenen Vorgehensweisen validiert. Bei Änderungen dieser Vorgehensweisen kann sich die Leistung des Tests ändern. Die mit dem Xpert MRSA Assay erzielten Ergebnisse müssen in Verbindung mit anderen dem Arzt vorliegenden Labordaten und klinischen Daten interpretiert werden.

Falsche Testergebnisse können durch unsachgemäße Probenentnahme, Nichtbefolgung der empfohlenen Vorgehensweisen für Probenentnahme, -handhabung und -aufbewahrung, Technikfehler, Verwechslung von Proben oder für den Nachweis mit diesem Test zu geringe Anzahl der in der Probe vorhandenen Organismen zustande kommen. Zur Vermeidung falscher Ergebnisse ist die sorgfältige Einhaltung der Anweisungen in dieser Packungsbeilage erforderlich.

Da der Nachweis von MRSA von der Anzahl der in der Probe enthaltenen Organismen abhängt, hängen zuverlässige Ergebnisse von der sachgemäßen Probenentnahme, -handhabung und -aufbewahrung ab.

Eine Wiederholung des Xpert MRSA bei den Ergebnissen **INVALID** (ungültig), **ERROR** (Fehler) und **NO RESULT** (kein Ergebnis) richtet sich nach den Praktiken und Vorschriften der jeweiligen Einrichtung. Es sollten Alternativmethoden (z.B. Kultur auf selektiven Agarplatten, mit oder ohne Inkubation über Nacht in einer selektiven Anreicherungsbouillon) zur Verfügung stehen. Für die Kultur sollten die verbleibenden Tupfer mit Abstrichproben in geeignete Transportbehälter gesteckt und innerhalb von 4 Tagen zur Beimpfung der Kultur verwendet werden.

Ein positives Testergebnis deutet nicht notwendigerweise auf das Vorhandensein von lebensfähigen Organismen hin. Jedoch muss vermutet werden, dass MRSA vorhanden sind.

Die Tests mit dem Xpert MRSA Assay sollten als Ergänzung zu anderen verfügbaren Methoden eingesetzt werden.

Darüber hinaus kann eine gleichzeitige Antibiotikagabe die Testergebnisse beeinflussen. Es ist daher nicht möglich, den Erfolg bzw. Misserfolg einer Behandlung anhand dieses Tests zu beurteilen, da nach einer antimikrobiellen Therapie DNA zurückbleiben kann.

Mutationen oder Polymorphismen in Primer oder Sonden bindenden Regionen wirken sich eventuell auf den Nachweis von neuen oder unbekannten MRSA-Varianten aus, sodass es zu falsch negativen Ergebnissen kommt.

Störsubstanzen

Zu den bewerteten potenziellen Störsubstanzen gehören Blut, Mucus und Nasensprays zur Anwendung bei verstopfter, trockener oder gereizter Nase. Das Vorhandensein dieser Substanzen führte zu keiner signifikanten Hemmung der PCR und verursachte keine ungültigen oder falschen Ergebnisse.

In der Forschungsstudie zum Xpert MRSA Assay wurden in 45 der 1077 nasalen Abstrichproben (4,2%) potenzielle Störsubstanzen (Blut, Mucus oder beides) gefunden. Von den 31 Patientenproben, die im ersten Test ein unbestimmtes Ergebnis erzielten, waren die Tupfer bei drei Proben mit Mucus und bei einer Probe mit Blut kontaminiert. Drei dieser vier Patientenproben erzielten beim Wiederholungstest ein Ergebnis, während eine der mit Mucus kontaminierten Proben unbestimmt blieb.

Erwartete Werte

Für die klinische Studie zum Xpert MRSA wurden insgesamt 1077 nasale Proben von 1077 Probanden an 7 Aufnahmезentren in den gesamten USA entnommen. Die Studienpopulation wurde in die folgenden Gruppen eingeteilt: Bewohner von Alten- oder Pflegeheimen, Krankenhausaufenthalt von mehr als 3 Tagen, Krankenhausaufenthalt von höchstens 3 Tagen, ambulante Klinik und Personal bzw. Sonstige. Anzahl und Prozentanteil der positiven und negativen Fälle relativ zur Referenzkulturmethode wurden berechnet und sind in der nachstehenden Tabelle wiedergegeben.

Tabelle 1. Erwartete Werte für MRSA in Studien unter verschiedenen Populationen

Gruppe	Positiv n (%)	Negativ n (%)	Insgesamt (%) ¹
Alten- oder Pflegeheime	62 (25,5)	181 (74,5)	243 (22,6)
Krankenhausaufenthalt >3 Tage	61 (23,0)	204 (77,0)	265 (24,7)
Krankenhausaufenthalt =3 Tage	29 (13,1)	193 (86,9)	222 (20,7)
Ambulante Klinik	46 (17,7)	214 (82,3)	260 (24,2)
Personal und Sonstige	11 (12,9)	74 (87,1)	85 (7,9)
Insgesamt	209 (19,4)	866 (80,6)	1075

¹ Bei zwei Krankenhauspatienten mit positiver Kultur war das Aufnahmedatum unbekannt

Leistungsmerkmale

Klinische Leistungsfähigkeit

Die Leistungsmerkmale des Xpert MRSA Assays wurden in einer multizentrischen, prospektiven, investigativen Studie an sieben Einrichtungen durch Vergleich des MRSA Assays auf dem GeneXpert System (Xpert MRSA Assay) mit einem zweiten Nukleinsäure-Amplifikationstest (Nucleic Acid Amplification Test, NAAT) mit FDA-Zulassung sowie mit einer angereicherten Kultur – also der empfindlichsten Kulturmethode – ermittelt. Unter den Probanden waren auch Personen und medizinische Mitarbeiter, die einem Risiko einer nasalen Besiedlung ausgesetzt sind. Jeder Proband wurde nur einmal in die Studie aufgenommen. Probanden, die zwischen 48 Stunden und einer Woche vor der Aufnahme in die Studie systemische oder topische nasale Antibiotika erhalten hatten, weniger als 2 Jahre alt waren oder bei denen eine Kontraindikation gegen eine nasale Abstrichprobe bestand, waren von der Aufnahme in die Studie ausgeschlossen. Es wurden nur die Probanden aufgenommen, die sowohl die Einschluss- als auch die Ausschlusskriterien bestanden.

Von jedem Probanden wurden nasale Abstrichproben genommen. Ein Tupfer wurde mit dem Xpert MRSA Assay und einer mit dem zweiten NAAT mit FDA-Zulassung getestet. Die beiden NAAT-Typen wurden an allen teilnehmenden Einrichtungen durchgeführt, und es wurde ein weiterer Tupfer zu Kulturtests an ein Zentrallabor geschickt.

Im Zentrallabor wurde der Tupfer direkt auf einer selektiven, chromogenen Agarplatte mit Cefoxitin ausgestrichen und die Platte daraufhin 24 – 48 Stunden lang bei 35 °C ± 2 °C inkubiert. Der Tupfer wurde in Tryptikase-Soja-Bouillon (Tryptikase Soy Broth, TSB) mit 6,5% Natriumchlorid transferiert und 18 – 24 Stunden lang bei 35 °C ± 2 °C inkubiert. Falls der direkte Ausstrich nach 24 Stunden negativ war, wurde die angereicherte TSB auf einer weiteren chromogenen Agarplatte mit Cefoxitin ausgestrichen und die Platte daraufhin 24 – 48 Stunden lang bei 35 °C ± 2 °C inkubiert. Die Bestätigung vermutet positiver Kolonien aus einer der beiden Kulturmethoden erfolgte mit einem Tube-Koagulase-Test und Gram-Färbung.

Die Leistungsfähigkeit des Xpert MRSA Assays und des zweiten NAAT mit FDA-Zulassung wurde relativ zu den Kulturergebnissen des Zentrallabors (Referenzkultur) berechnet.

Gesamtergebnisse

Insgesamt 1077 aufnahmefähige Probanden (eine Probe pro Patient) wurden mit dem Xpert MRSA sowie einem zweiten NAAT mit FDA-Zulassung und einer Kultur auf MRSA getestet. Der Xpert MRSA konnte im Vergleich zur Referenzkulturmethode 86,3% der für MRSA positiven Patientenproben und 94,9% der für MRSA negativen Patientenproben identifizieren. Für die getesteten Probanden betrugen der positive prädiktive Wert (PPV) 80,5% und der negative prädiktive Wert (NPV) 96,6%.

Tabelle 2a. Xpert MRSA im Vergleich zur Referenzkulturmethode

		Kultur			
		+	-		
Xpert MRSA	+	182	44	226	Positive Übereinstimmung: 86,3%
	-	29	819	848	Negative Übereinstimmung: 94,9%
		211	863	1074*	PPV ¹ : 80,5%
					NPV ² : 96,6%

* Bei 3 Patientenproben wurde in zwei Versuchen mit dem Xpert kein Ergebnis erzielt.

¹ Positiver prädiktiver Wert

² Negativer prädiktiver Wert

Im Vergleich zur Direktkulturmethode (Ausstreichen der Tupfer direkt auf selektive, chromogene Agarplatten mit Cefoxitin ohne TSB-Anreicherung und Inkubation bei 35 °C ± 2 °C über 24 – 48 Stunden) identifizierte der Xpert MRSA 94,3% der für MRSA positiven Patientenproben und 93,2% der für MRSA negativen Patientenproben; der positive prädiktive Wert betrug 73,0% und der negative prädiktive Wert 98,8%.

Tabelle 2b. Xpert MRSA im Vergleich zur Direktkulturmethode

		Direktkultur			
		+	-		
Xpert MRSA	+	165	61	226	Positive Übereinstimmung: 94,3%
	-	10	838	848	Negative Übereinstimmung: 93,2%
		175	899	1074	PPV ¹ : 73,0%
					NPV ² : 98,8%

¹ Positiver prädiktiver Wert

² Negativer prädiktiver Wert

Die folgenden Tabellen zeigen die Leistung des Xpert MRSA sowie die Prävalenz von MRSA an allen klinischen Zentren im Vergleich zur Referenz- und zur Direktkulturmethode.

Tabelle 3a. Leistung des Xpert MRSA im Vergleich zur Referenzkulturmethode nach Zentren

Zentrum	Prävalenz von MRSA ¹	Positive Übereinstimmung (n) (95%-KI) ²	Negative Übereinstimmung (n) (95%-KI) ³	Anz. unbestimmter Ergebnisse
1	20,2% (78/387)	87,2% (n=78) (77,7-93,7%)	93,9% (n=309) (90,6-96,3%)	10
2	5,2% (3/58)	100,0% (n=3) (29,2-100,0%)	98,2% (n=55) (90,3-100,0%)	3
3	44,4% (12/27)	91,7% (n=12) (61,5-99,8%)	100,0% (n=15) (78,2-100,0%)	3
4	12,3% (20/162)	80,0% (n=20) (56,3-94,3%)	97,2% (n=142) (92,9-99,2%)	9
5	20,5% (46/224)	89,1% (n=46) (76,4-96,4%)	94,9% (n=178) (90,6-97,7%)	1
6	22,3% (42/188)	81,0% (n=42) (65,9-91,4%)	93,2% (n=146) (87,8-96,7%)	6
7	35,7% (10/28)	90,0% (n=10) (55,5-99,8%)	94,4% (n=18) (72,7-99,9%)	2
Insgesamt	19,6% (211/1074)	86,3% (n=211) (80,9-90,6%)	94,9% (n=863) (93,2-96,3%)	34

¹Aus den Ergebnissen der Referenzkulturmethode bestimmt

²Anzahl der mit der Referenzkulturmethode bestimmten positiven Ergebnisse

³Anzahl der mit der Referenzkulturmethode bestimmten negativen Ergebnisse

Tabelle 3b. Leistung des Xpert MRSA nach Zentren – Vergleich zur Direktkulturmethode

Zentrum	Positive Übereinstimmung	Negative Übereinstimmung
1	95,4% (87,1-99,0%)	92,2% (88,8-94,9%)
2	100,0% (29,2-100,0%)	98,2% (90,3-100,0%)
3	91,7% (61,5-99,8%)	100,0% (78,2-100,0%)
4	81,3% (54,4-96,0%)	95,2% (90,4-98,1%)
5	94,9% (82,7-99,4%)	93,0% (88,3-96,2%)
6	97,1% (84,7-99,9%)	92,9% (87,6-96,4%)
7	100,0% (54,1-100,0%)	81,8% (59,7-94,8%)
Insgesamt	94,3% (89,7-97,2%)	93,2% (91,4-94,8%)

Die folgenden Tabellen zeigen die Leistung des Xpert MRSA, des zweiten NAAT mit FDA-Zulassung sowie der Direktkulturmethode von den einzelnen Zentren im Vergleich zur Referenzkulturmethode.

Tabelle 4a. Ergebnisse mit dem Xpert MRSA, der Direktkulturmethode sowie dem zweiten NAAT mit FDA-Zulassung bei mit der Referenzkulturmethode für MRSA positiven Patientenproben

Positive Übereinstimmung (95%-KI)			
Zentrum	Xpert MRSA	2. NAAT	Direktkultur¹
1	87,2% (77,7-93,7%)	80,8% (70,3-88,8%)	83,3% (73,2-90,8%)
2	100,0% (29,2-100,0%)	100,0% (29,2-100,0%)	100,0% (29,2-100,0%)
3	91,7% (61,5-99,8%)	83,3% (51,6-97,9%)	100,0% (73,5-100,0%)
4	80,0% (56,3-94,3%)	78,9% (54,4-93,9%)	80,0% (56,3-94,3%)
5	89,1% (76,4-96,4%)	89,1% (76,4-96,4%)	84,8% (71,1-93,7%)
6	81,0% (65,9-91,4%)	78,6% (63,2-89,7%)	81,0% (65,9-91,4%)
7	90,0% (55,5-99,7%)	100,0% (69,2-100,0%)	60,0% (26,2-87,8%)
Insgesamt	86,3% (80,9-90,6%)	83,3% (77,6-88,1%)	82,9% (77,2-87,8%)

¹ Direkt auf selektiven, chromogenen Agarplatten mit Cefoxitin ausgestrichene Tupfer und anschließende 24- bis 48-stündige Inkubation der Platten bei 35 °C ± 2 °C.

Tabelle 4b. Ergebnisse mit dem Xpert MRSA, der Direktkulturmethode sowie dem zweiten NAAT mit FDA-Zulassung bei mit der Referenzkulturmethode für MRSA negativen Patientenproben

Negative Übereinstimmung (95%-KI)			
Zentrum	Xpert MRSA	2. NAAT	Direktkultur¹
1	93,9% (90,6-96,3%)	92,2% (88,7-95,0%)	100,0% (98,8-100,0%)
2	98,2% (90,3-100,0%)	98,2% (90,3-100,0%)	100,0% (93,6-100,0%)
3	100,0% (78,2-100,0%)	100,0% (79,4-100,0%)	100,0% (79,4-100,0%)
4	97,2% (92,9-99,2%)	97,9% (93,9-99,6%)	100,0% (97,5-100,0%)
5	94,9% (90,6-97,7%)	93,8% (89,2-96,9%)	100,0% (97,9-100,0%)
6	93,2% (87,8-96,7%)	94,5% (89,5-97,6%)	100,0% (97,5-100,0%)
7	94,4% (72,7-99,9%)	94,4% (72,7-99,9%)	100,0% (81,5-100,0%)
Insgesamt	94,9% (93,2-96,3%)	94,4% (92,7-95,9%)	100,0% (99,6-100,0%)

¹ Direkt auf selektiven, chromogenen Agarplatten mit Cefoxitin ausgestrichene Tupfer und anschließende 24- bis 48-stündige Inkubation der Platten bei 35 °C ± 2 °C.

Analytische Spezifität

Kulturen von 51 Stämmen, die von der American Type Culture Collection (ATCC) und dem Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA) bezogen wurden und repräsentativ für phylogenetisch mit *S. aureus* und mit Mitgliedern der Kommensalfloora der Nase verwandte Spezies waren, 32 Stämme von Methicillin-sensiblen, Koagulase-negativen Staphylokokken und 12 Stämme von Methicillin-resistenten, Koagulase-negativen Staphylokokken wurden getestet. Für jedes Isolat wurden drei Replikate bei $\approx 1 \times 10^6$ CFU/Tupfer getestet. Der Assay wies keines dieser Isolate nach. Die Spezifität betrug 100%.

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Xpert MRSA wurde anhand von 6 MRSA-Stämmen, die repräsentativ für die sechs SCC_{mec}-Typen und -Subtypen (I, II, III, IV, IVa und V) waren, bestimmt. Kulturen dieser Stämme wurden zunächst quantifiziert und anschließend auf Werte über den gesamten Bereich von 10 bis 1000 koloniebildenden Einheiten (Colony Forming Units, CFU) pro Tupfer verdünnt. Alle Verdünnungen wurden in 4 Replikaten getestet. Die für jeden getesteten Typ bzw. Subtyp erhaltene Nachweisgrenze entspricht der niedrigsten Anzahl CFU/Tupfer, bei der alle 4 Replikate als positiv ausgegeben wurden. Alle Stämme, die repräsentativ für die SCC_{mec}-Kassettentypen I - V waren, wurden vom Xpert MRSA Assay nachgewiesen.

Tabelle 5. Nachweis von SCC_{mec}-Typens

SCC _{mec}	(CFU/Tupfer)
Typ I	10
Typ II	10
Typ III	10
Typ V	10
Typ IV	50
Typ IVa	100

Weitere Studien an Typ-II-Zellen wurden durchgeführt, um das 95%-Konfidenzintervall für die analytische Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) dieses Assays zu bestimmen. Die Nachweisgrenze ist definiert als die niedrigste Anzahl koloniebildender MRSA-Einheiten (Colony Forming Units, CFU) pro Probe, die sich mit einer Konfidenz von 95% reproduzierbar von negativen Proben unterscheiden lässt. Die Ergebnisse bedeuten, dass der Xpert MRSA bei einem Tupfer mit 80 CFU mit 95%iger Konfidenz ein positives Ergebnis erzielt.

Reproduzierbarkeit

Ein Panel aus Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen von MRSA und Methicillin-sensiblen *Staphylococcus epidermidis* (negativ) wurde dreifach an 10 verschiedenen Tagen an den drei Zentren getestet (4 Proben $\times$ 3 Mal/Tag $\times$ 10 Tage $\times$ 3 Zentren). An jedem der 3 Testzentren wurde jeweils eine Charge des Xpert MRSA-Kits verwendet. Die Xpert MRSA Assays wurden entsprechend der Xpert MRSA-Vorgehensweise durchgeführt.

Tabelle 6. Zusammenfassung der Reproduzierbarkeitsergebnisse

Proben-ID	MRSA in CFU/ Tupfer	MSSE in CFU/ Tupfer	Zentrum 1	Zentrum 2	Zentrum 3	Gesamtüberein- stimmung	Gesamtüberein- stimmung in %
Negativ	0	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/31 ^A	90/91	98,9%
Schwach positiv	117	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	27/29 ^A	87/89	97,8%
Positiv	800	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/30	90/90	100,0%
Stark positiv	$2,6 \times 10^4$	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/30	90/90	100,0%
Gesamtüberein- stimmung			120/120	120/120	117/120	357/360	99,2%
Übereinstimmung in %			100,0%	100,0%	97,5%		

^A Der Xpert MRSA Assay wurde versehentlich bei einer negativen Patientenprobe zu viel und bei einer schwach positiven Patientenprobe zu wenig durchgeführt.

Literaturangaben

1. Mainous AG, Hueston WJ, Everett, CJ, Vanessa A. Diaz VA. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in the United States, 2001-2002. *An Family Medicine*. 2006;4(2):132-137.
2. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004;32:470-85.
3. Chaix C, Durand-Zileski I, Alberti C, Buisson B. Control of Endemic Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *JAMA* 1999;282(19):1745-51.
4. Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases* 2001;7(2) 323-6.
5. Salgado CD et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-analysis of Prevalence and Risk Factors. *CID* 2003;36:131.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).

Unterstützung

Wenn Sie Hilfe benötigen, verständigen Sie bitte Cepheid. Die nötigen Kontaktinformationen sind unten aufgeführt. Geben Sie beim Anruf bzw. in Ihrer E-Mail bitte die Seriennummer des Instruments und die ID der Reagenziencharge an.

Nordamerika

Sie erreichen den technischen Kundendienst wie folgt:

Tel.: 888.838.3222 Option 2

E-Mail: techsupport@cepheid.com

Sie erreichen den technischen Kundendienst von Cepheid montags bis freitags von 5.00 bis 17.00 Uhr (Pazifikzeit).

Europäische Union

Sie erreichen den technischen Kundendienst wie folgt:

Tel.: +33.563.82.53.19

Fax: +33.563.82.53.01

E-Mail: support@cepheideurope

Andere Regionen:

Bitte wenden Sie sich an Ihre zuständige Cepheid-Vertretung.

Symboldabelle

Symbol	Bedeutung
	Bestellnummer
	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	CE-Kennzeichnung – Einhaltung der EU-Richtlinien
	Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	Nicht zur Wiederverwendung
	Vorsicht, Begleitunterlagen beachten
	Hersteller
	Inhalt ausreichend für <n> Tests
	Kontrolle
	Temperaturgrenze
	Biologische Gefahr


Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
USA

Telefon: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192



Cepheid Europa
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Frankreich

Tel.: +33.563.82.53.00

Fax: +33.563.82.53.01

E-Mail: cepheid@cepheideurope



Solo para uso diagnóstico *in vitro*

Nombre comercial

Xpert® MRSA

Nombre común o habitual

Xpert MRSA Assay

Uso previsto

El Cepheid Xpert MRSA Assay realizado en el GeneXpert® Dx System (Xpert MRSA) es una prueba cualitativa de diagnóstico *in vitro* diseñada para la detección rápida de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en hisopos nasales de pacientes con riesgo de colonización nasal. La prueba utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real automatizada para detectar el ADN del SARM. El Xpert MRSA Assay está indicado como una ayuda para la prevención y el control de las infecciones por SARM en entornos sanitarios. El Xpert MRSA Assay no está indicado para diagnosticar el SARM, ni para guiar o monitorizar el tratamiento de las infecciones por SARM. Los cultivos concomitantes solo son necesarios para la recuperación de microorganismos para su tipificación epidemiológica o para pruebas de sensibilidad adicionales.

Resumen y explicación

El *Staphylococcus aureus* (SA) es un patógeno hospitalario importante que causa una variedad de enfermedades, como endocarditis, osteomielitis, síndrome de choque tóxico, intoxicación con alimentos, ántrax y forúnculos. A principios de los años cincuenta del siglo pasado, la obtención y propagación de plásmidos productores de beta-lactamasas frustró la eficacia de la penicilina para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus*. En 1959 se introdujo la meticilina, una penicilina sintética. En 1960, se identificaron cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina. Se determinó que esto era el resultado de la adquisición por el *S. aureus* del gen *mecA*. Actualmente, en Estados Unidos, el SARM es responsable de aproximadamente el 25% de las infecciones hospitalarias y cada vez hay más informes de SARM de adquisición comunitaria, que ocasiona una morbilidad significativa. En un intento por limitar la propagación de estas infecciones, se han desarrollado y puesto en práctica estrategias y políticas de control en el entorno sanitario. El control del SARM es uno de los objetivos principales de la mayoría de los programas de control de las infecciones hospitalarias. Actualmente, el método de vigilancia habitual para la detección de SARM es el cultivo, que es muy laborioso y lleva mucho tiempo.^{1,2,3,4,5} Un método rápido y más sensible para la vigilancia del SARM representará una clara ventaja para los programas de control de infecciones.

Principio del procedimiento

El GeneXpert Dx System automatiza e integra la purificación de muestras, la amplificación de ácidos nucleicos y la detección de la secuencia diana en muestras simples y complejas mediante ensayos de PCR y RT-PCR en tiempo real. El sistema está formado por un instrumento, ordenador personal y software precargado para realizar pruebas en las muestras recogidas y ver los resultados. El sistema requiere el uso de cartuchos GeneXpert desechables de un solo uso que contengan los reactivos para la PCR y alojen el proceso de la PCR. Al tratarse de cartuchos autónomos, se elimina la contaminación cruzada entre muestras. Para ver una descripción completa del sistema, consulte el *Manual del usuario del GeneXpert Dx System*.

El Xpert MRSA Assay incluye reactivos para la detección de SARM así como un control de procesamiento de muestras (CPM) para controlar el procesamiento adecuado de las bacterias diana y monitorizar la presencia de inhibidores en la reacción PCR. El control de comprobación de sondas (CCS) verifica la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de PCR en el cartucho, la integridad de las sondas y la estabilidad de los fluoróforos.

Los cebadores y las sondas del Xpert MRSA Assay detectan una secuencia patentada para determinar la presencia de un cassette insertado en el cromosoma del *S. aureus*.

Reactivos e instrumentos

Material suministrado

El Xpert MRSA (GXMRSA-100N-10) contiene reactivos suficientes para procesar 10 muestras de hisopo o de control de calidad. El Xpert MRSA (GXMRSA-120) contiene reactivos suficientes para procesar 120 muestras de hisopo o de control de calidad.

El kit contiene lo siguiente:

Cartuchos del Xpert MRSA Assay con tubos de reacción integrados	10	120
Microesfera 1 (lío-filizada)	1 por cartucho	1 por cartucho
Polimerasa		
dNTP (desoxirribonucleótidos trifosfato)		
Albúmina sérica bovina (BSA)		
Microesfera 2 (lío-filizada)	1 por cartucho	1 por cartucho
Cebadores		
Sondas		
BSA		
Microesfera 3 (lío-filizada)	1 por cartucho	1 por cartucho
Control de procesamiento de muestras (CPM)		
~6000 esporas no infecciosas de control de preparación de muestras		
Reactivo 1 (hidróxido sódico)	3,0 ml por cartucho	3,0 ml por cartucho
Reactivo 2 (tampón Tris, EDTA y tensioactivos)	3,0 ml por cartucho	3,0 ml por cartucho
Bolsa de reactivo del Xpert MRSA	1	1
Reactivo de elución (tiocianato de guanidina y tensioactivos)	10 × 1,5 ml por bolsa	125 × 1,5 ml por bolsa

Notas:

Existen Fichas de Datos de Seguridad del Material (FDS) para todos los reactivos suministrados en este ensayo, disponibles a petición del interesado a través del servicio técnico de Cepheid y en los sitios web de Cepheid (www.cepheid.com y www.cepheidinternational.com).

La albúmina sérica bovina (BSA) de este producto procede exclusivamente de plasma bovino de origen estadounidense. La fabricación de la BSA también se lleva a cabo en los Estados Unidos. Los animales no fueron alimentados con ninguna proteína de rumiante ni de ningún otro animal; los animales pasaron las pruebas ante- y post-mortem. Durante el procesamiento, el material no se mezcló con ningún otro material de origen animal.

Conservación y manipulación

- Conserve los cartuchos y los reactivos del Xpert MRSA a una temperatura entre 2 °C y 28 °C.
- No utilice los reactivos y cartuchos después de su fecha de caducidad.
- No abra un cartucho hasta que no esté listo para realizar la prueba.
- No utilice ningún reactivo que presente turbidez o un cambio de color.

Materiales requeridos pero no suministrados

- GeneXpert Dx System (el número de catálogo varía según la configuración): Instrumento GeneXpert, ordenador, lápiz lector de códigos de barras y manual del usuario
- Impresora (consulte las directrices de compatibilidad en el *Manual del usuario del GeneXpert Dx System*)
- Cepheid Sample Collection Device (dispositivo de recogida de muestras de Cepheid) (REF 900-0370)
- Mezclador vortex
- Pipetas de transferencia estériles desechables
- Gasa estéril

Materiales disponibles pero no suministrados

KWIK-STIK™ de MicroBioLogics n.º de catálogo 0158 MRSA como control positivo y n.º de catálogo 0371 MSSE (*Staphylococcus epidermidis* sensible a meticilina) como control negativo.

Advertencias y precauciones



- Trate todas las muestras biológicas, incluidos los cartuchos usados, como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Con frecuencia es imposible saber qué muestras podrían ser infecciosas, por lo que todas las muestras biológicas deben tratarse tomando las precauciones habituales. Las directrices para la manipulación de las muestras están disponibles en los Centros para el Control y la Prevención de las Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention)⁶ de EE.UU. y en el Instituto de Normas de Laboratorio y Clínicas (Clinical and Laboratory Standards Institute), anteriormente el Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (National Committee for Clinical Laboratory Standards).⁷

- Siga los procedimientos de seguridad de su centro para trabajar con productos químicos y manipular muestras biológicas.
- El Xpert MRSA Assay no proporciona resultados de sensibilidad. Se requiere tiempo adicional para realizar el cultivo y las pruebas de sensibilidad.
- No sustituya los reactivos del Xpert MRSA por otros reactivos.
- No abra la tapa del cartucho del Xpert MRSA excepto cuando vaya a añadir la muestra.
- No utilice un cartucho que se haya caído o agitado después de haber añadido la muestra.
- No utilice un cartucho que tenga un tubo de reacción dañado.



- Cada cartucho de un solo uso del Xpert MRSA se utiliza para procesar una prueba. No vuelva a utilizar los cartuchos gastados.
- Consulte con el personal encargado de los residuos ambientales de su centro para saber cómo eliminar correctamente los cartuchos usados y los reactivos sin utilizar. Este material puede tener características que coincidan con la descripción de residuos peligrosos de la Ley federal de Conservación y Recuperación de Recursos (Resource Conservation and Recovery Act, RCRA) de la EPA y requerir una forma de eliminación específica. Compruebe las normativas de eliminación estatales y locales, ya que podrían diferir de las nacionales. Los centros fuera de los EE.UU. deben comprobar los requisitos para la eliminación de residuos peligrosos de su país.



- Conserve el kit del Xpert MRSA a una temperatura entre 2 °C y 28 °C.



- El reactivo 1 contiene hidróxido sódico (pH > 12,5); (riesgo UE R34), que se considera corrosivo para los ojos y la piel, y requiere el uso de protección ocular y cutánea.



- El reactivo de elución contiene tiocianato de guanidina (riesgo UE R32; 52/53), que es nocivo para los organismos acuáticos.

Recogida y transporte de muestras



Para recoger una muestra adecuada, siga las instrucciones de este apartado al pie de la letra.

1. Abra el dispositivo de recogida de Cepheid despegando el envoltorio exterior.
2. Pida al paciente que incline la cabeza hacia atrás. Introduzca hisopos secos aproximadamente 1 a 2 cm en cada fosa nasal.
3. Gire los hisopos contra el interior de la fosa nasal durante 3 segundos. Aplique una ligera presión con un dedo en el exterior de la nariz para ayudar a garantizar un buen contacto entre el hisopo y el interior de la nariz.
4. Usando los mismos hisopos, repita el procedimiento en la segunda fosa nasal, intentando tocar únicamente el interior de la nariz.
5. Retire el tubo de transporte de plástico. Desenrosque la tapa del tubo y deséchela. Coloque los hisopos en el tubo de transporte de plástico. Los hisopos deben introducirse por completo en el tubo hasta que queden sobre la esponja en el fondo del tubo. Asegúrese de que la tapa roja esté colocada y bien apretada.

Nota: Los hisopos deben permanecer sujetos a la tapa roja en todo momento.

6. Etiquete el tubo de transporte de plástico con la ID del paciente y envíelo al laboratorio.
7. Si la muestra del hisopo se va a procesar en las próximas 24 horas, consérvela a temperatura ambiente (15 °C a 30 °C); en caso contrario, conserve el hisopo a una temperatura entre 2 °C y 8 °C. La muestra del hisopo es estable durante un máximo de 5 días si se conserva a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.

Procedimiento

Preparación del cartucho

Importante: Inicie la prueba antes de que transcurran 15 minutos después de añadir la muestra al cartucho.

Nota: Utilice solo uno de los hisopos. El segundo hisopo se utiliza para repetir la prueba.

Para añadir la muestra en el cartucho (Xpert MRSA):

1. Retire el cartucho y el reactivo de elución del kit.
2. Retire los hisopos del recipiente de transporte y luego separe un hisopo de la tapa roja.
3. Introduzca el hisopo en el tubo que contiene el reactivo de elución.

Nota: Utilice una gasa estéril para reducir al mínimo los riesgos de contaminación.

4. Sujete el hisopo por el vástago cerca del borde del tubo, levante el hisopo unos milímetros del fondo del tubo y presione el vástago contra el borde del tubo para romperlo. Asegúrese de que el hisopo sea lo suficiente corto como permitir que la tapa se cierre bien apretada.
5. Cierre la tapa y agite en el mezclador vortex a alta velocidad durante 10 segundos.
6. Abra la tapa del cartucho. Con una pipeta de transferencia estéril, transfiera todo el contenido del reactivo de elución a la abertura entallada grande (n.º 1 en la Figura 1) del cartucho GeneXpert.
7. Cierre la tapa del cartucho.

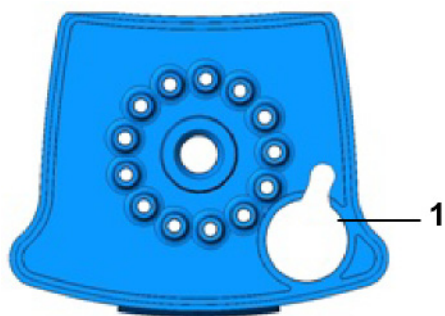


figura 1. Cartucho del Xpert MRSA (vista superior).

Inicio de la prueba

Importante: Antes de iniciar la prueba, compruebe que se ha importado al software GeneXpert el archivo de definición del ensayo Xpert MRSA Assay.

Este apartado incluye los pasos básicos para realizar la prueba. Para obtener instrucciones detalladas, consulte el *Manual del usuario del GeneXpert Dx System*.

1. Encienda el ordenador y luego encienda el instrumento GeneXpert Dx.
2. En el escritorio de Windows®, haga doble clic en el icono de acceso rápido de GeneXpert Dx.
3. Inicie una sesión en el software del GeneXpert Dx System utilizando su nombre de usuario y su contraseña.
4. En la ventana GeneXpert Dx System, haga clic en **Create Test** (Crear prueba). Aparecerá el cuadro de diálogo Scan Cartridge Barcode (Leer código de barras del cartucho)
5. Escanee el código de barras del cartucho del Xpert MRSA. Aparecerá la ventana Create Test (Crear prueba). El software llena automáticamente las casillas de los siguientes campos con la información del código de barras: **Select Assay** (Seleccionar ensayo), **Reagent Lot ID** (ID del lote de reactivos), **Cartridge SN** (NS del cartucho) y **Expiration Date** (Fecha de caducidad).

6. En el cuadro **Sample ID** (ID de la muestra), escanee o teclee la ID de la muestra. Asegúrese de teclear correctamente la ID de la muestra. La ID de la muestra se asocia al resultado de la prueba, y se muestra en la ventana View Results (Ver resultados) y en todos los informes.
7. Haga clic en **Start Test** (Iniciar prueba). En el cuadro de diálogo que aparece, teclee su contraseña.
8. Abra la puerta del módulo del instrumento con la luz verde parpadeante y cargue el cartucho.
9. Cierre la puerta. La prueba comenzará y la luz verde dejará de parpadear. Cuando la prueba termine, se apagará la luz.
10. Espere hasta que el sistema desbloquee la puerta del módulo antes de abrirla y retirar el cartucho.
-  11. Elimine los cartuchos usados en los recipientes de residuos de muestras adecuados de acuerdo con las prácticas habituales de su centro.

Visualización e impresión de los resultados

Para obtener instrucciones detalladas sobre cómo visualizar e imprimir los resultados, consulte el *Manual del usuario del GeneXpert Dx System*.

CONTROL Control de calidad

Cada prueba incluye un control de procesamiento de muestras (CPM) y un control de comprobación de sondas (CCS).

Control de procesamiento de muestras (CPM)—Garantiza que la muestra se procesó correctamente. El CPM contiene esporas de *Bacillus globigii* en forma de una torta de esporas secas que se incluye en cada cartucho para verificar el procesamiento adecuado del SARM. El CPM comprueba que se ha producido la lisis del SARM, si los microorganismos están presentes, y verifica que el procesamiento de la muestra es adecuado. Aparte de lo anterior, este control detecta la inhibición asociada a las muestras del ensayo de PCR en tiempo real. El CPM deberá ser positivo en una muestra negativa, y puede ser negativo o positivo en una muestra positiva. El CPM pasa si cumple los criterios de aceptación validados.

Control de comprobación de sondas (CCS)—Antes del inicio de la reacción PCR, el GeneXpert Dx System mide la señal de fluorescencia de las sondas para monitorizar la rehidratación de las microesferas, el llenado del tubo de reacción, la integridad de las sondas y la estabilidad de los fluoróforos. La comprobación de sondas pasa si cumple los criterios de aceptación asignados.

Controles externos—Puede utilizarse KWIK-STIK™ (MicroBioLogics, n.º de catálogo 0158 MRSA como control positivo y n.º de catálogo 0371 MSSE como control negativo) para la formación de usuarios, para pruebas de aptitud y como CC externo del GeneXpert Dx System. Se pueden utilizar controles externos de acuerdo con las organizaciones de acreditación locales, estatales y nacionales, según corresponda. Siga el procedimiento para controles externos de MicroBioLogics que se describe a continuación:

1. Abra la bolsa rasgándola por la muesca y retire el KWIK-STIK.
2. Comprima la parte inferior de la ampolla del tapón para que salga el líquido hidratante.
3. Sujete verticalmente y de golpecitos para facilitar el flujo del líquido a través del cilindro hasta el fondo de la unidad que contiene el gránulo.
4. Para facilitar la disolución del gránulo de células liofilizado, aplaste el gránulo y comprima suavemente la cámara inferior.
5. Abra el KWIK-STIK para liberar el hisopo, e introduzca el hisopo en el tubo que contiene el reactivo de elución.
6. El hisopo KWIK-STIK está ahora listo para la prueba Xpert MRSA.

Interpretación de los resultados

El GeneXpert Dx System interpola los resultados a partir de las señales fluorescentes medidas y los algoritmos de cálculo incorporados, y los muestra en la ventana View Results (Ver resultados). Los resultados posibles son:

MRSA POSITIVE (SARM POSITIVO)

Se detecta ADN diana de SARM (presunto positivo para colonización por SARM).

- **MRSA—POSITIVE (SARM—POSITIVO)**: La diana de SARM tiene un Ct dentro del rango válido y un valor extremo por encima del valor mínimo configurado.
- **SPC—NA (CPM—NC, no corresponde)**: El CPM se omite, ya que la amplificación del SARM podría competir con este control.
- **Probe Check—PASS (Comprobación de sondas—PASA)**: Todos los resultados de comprobación de sondas pasan.

MRSA NEGATIVE (SARM NEGATIVO)

No se detecta ADN diana de SARM (se supone no colonizado con SARM), el CPM cumple los criterios de aceptación.

- MRSA—NEGATIVE (SARM—NEGATIVO): No se detecta el ADN diana de SARM.
- SPC—PASS (CPM—PASA): El CPM tiene un Ct dentro del rango válido y un valor extremo por encima del valor mínimo configurado.
- Probe Check—PASS (Comprobación de sondas—PASA): Todos los resultados de comprobación de sondas pasan.

INVALID (NO VÁLIDO)

No puede determinarse la presencia o ausencia de SARM, repita la prueba con un hisopo extra. El CPM no satisface los criterios de aceptación, la muestra no se procesó correctamente o la PCR se ha inhibido.

- MRSA—INVALID (SARM—NO VÁLIDO): No puede determinarse la presencia o ausencia de ADN de SARM.
- SPC—FAIL (CPM—NO PASA): el resultado de la diana del SARM es negativo, el Ct del CPM no está dentro del rango válido y el valor extremo está por debajo del valor mínimo configurado.
- Probe Check—PASS (Comprobación de sondas—PASA): Todos los resultados de comprobación de sondas pasan.

ERROR

No puede determinarse la presencia o ausencia de SARM, repita la prueba con un hisopo extra. El control de comprobación de sondas falló, lo cual se debe probablemente a un tubo de reacción llenado incorrectamente, a un problema con la integridad de las sondas o a que se excedieron los límites de presión máximos.

- MRSA—NO RESULT (SARM—SIN RESULTADO)
- SPC—NO RESULT (CPM—SIN RESULTADO)
- Probe Check—FAIL (Comprobación de sondas—NO PASA)*; todos o alguno de los resultados de la comprobación de sonda no han pasado.

* Si la comprobación de sondas pasó, el error se debe a un fallo en los componentes del sistema.

NO RESULT (SIN RESULTADO)

No puede determinarse la presencia o ausencia de SARM, repita la prueba con un hisopo extra. No se obtuvieron suficientes datos para producir un resultado de la prueba (por ejemplo, el usuario paró la prueba que estaba en curso).

- MRSA—NO RESULT (SARM—SIN RESULTADO)
- SPC—NO RESULT (CPM—SIN RESULTADO)
- Probe Check—NA (Comprobación de sondas—NC), (no corresponde)

Razones para repetir el ensayo

Repita la prueba usando un cartucho nuevo y reactivo de elución nuevo (no vuelva a utilizar el cartucho), o inicie los procedimientos alternativos si obtiene uno de los siguientes resultados de la prueba:

- Un resultado **INVALID** (NO VÁLIDO) indica que el CPM falló. La muestra no se procesó correctamente o la PCR está inhibida.
- Un resultado de **ERROR** indica que el control de comprobación de sondas falló y que el ensayo se interrumpió posiblemente debido a que el tubo de reacción no se había llenado bien, a la detección de un problema de integridad de la sonda de reactivo o a que se excedieron los límites máximos de presión.
- **NO RESULT** (SIN RESULTADO) indica que no se recogieron suficientes datos. Por ejemplo, el usuario paró una prueba que estaba en curso.

Limitaciones

El rendimiento del Xpert MRSA Assay se validó únicamente con los procedimientos descritos en este prospecto. Las modificaciones a estos procedimientos podrían afectar al rendimiento de la prueba. Los resultados del Xpert MRSA Assay deben interpretarse junto con otros datos de laboratorio y clínicos de los que disponga el médico.

Pueden obtenerse resultados de la prueba erróneos debido a la recogida incorrecta de la muestra, a no seguirse los procedimientos recomendados para la recogida, manipulación y conservación de las muestras, a un error técnico, a la confusión de la muestra o a que la prueba no detecte el número de microorganismos en la muestra. La observación atenta de las instrucciones de este prospecto es necesaria para evitar resultados erróneos.

Dado que la detección de SARM depende de la cantidad de microorganismos presentes en la muestra, la fiabilidad de los resultados dependerá de la recogida, manipulación y conservación correctas de las muestras.

Para la repetición del Xpert MRSA en caso de resultados **INVALID** (NO VÁLIDO), **ERROR** y **NO RESULT** (SIN RESULTADO) deben seguirse las prácticas y políticas de cada centro. Deberá contarse con procedimientos alternativos (por ejemplo, cultivo en placas de agar escogidas con o sin incubación durante toda la noche en un caldo de enriquecimiento selectivo). Para el cultivo, las muestras de hisopo restantes deberán colocarse en sistemas de transporte adecuados y cultivarse en un plazo de 4 días.

Un resultado positivo de la prueba no indica necesariamente la presencia de un microorganismo viable. Sin embargo, se presupone la presencia de SARM.

La prueba con el Xpert MRSA Assay deberá utilizarse como complemento de otros métodos disponibles.

Los resultados de la prueba también podrían verse afectados por un tratamiento antibiótico simultáneo. Por lo tanto, el éxito o fracaso terapéutico no pueden evaluarse con esta prueba porque el ADN podría persistir tras el tratamiento antimicrobiano.

Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión de sondas o cebadores pueden afectar a la detección de variantes de SARM nuevas o desconocidas, y producir un resultado negativo falso.

Sustancias interferentes

Las sustancias potencialmente interferentes evaluadas incluyeron: sangre, mucosidad y aerosoles nasales utilizados para aliviar la congestión, la sequedad nasal o la irritación. La presencia de estas sustancias no inhibió significativamente la PCR, y no produjo resultados no válidos o erróneos.

En el estudio de investigación del Xpert MRSA Assay, se observaron posibles sustancias interferentes (sangre, mucosidad o ambas) en 45 de las 1077 (4,2%) muestras de hisopos nasales. De las 31 muestras que dieron un resultado equivoco en la prueba inicial, tres muestras tenían mucosidad y una muestra tenía sangre en el hisopo. Tres de las cuatro muestras produjeron resultados al repetir la prueba, mientras que una que contenía mucosidad permaneció indeterminada.

Valores esperados

En el estudio clínico del Xpert MRSA, se recogió un total de 1077 muestras nasales de 1077 sujetos en 7 centros de inclusión de todo Estados Unidos. La población del estudio se agrupó en sujetos de asilos de ancianos o centros de estancia prolongada, hospitalizados más de 3 días, hospitalizados 3 días o menos, clínica ambulatoria, y personal u otros. Se calculó el número y el porcentaje de casos positivos y negativos en relación con el método del cultivo de referencia; los resultados se presentan en la tabla siguiente.

tabla 1. Valores esperados para SARM en estudios de diferentes poblaciones

Grupo	N positivos (%)	N negativos (%)	Total (%) ¹
Residencias de ancianos, centros de media y larga estancia	62 (25,5)	181 (74,5)	243 (22,6)
Hospitalizado > 3 días	61 (23,0)	204 (77,0)	265 (24,7)
Hospitalizado = 3 días	29 (13,1)	193 (86,9)	222 (20,7)
Clínica ambulatoria	46 (17,7)	214 (82,3)	260 (24,2)
Personal y otros	11 (12,9)	74 (87,1)	85 (7,9)
Total	209 (19,4)	866 (80,6)	1075

¹ Dos sujetos hospitalizados que habían dado positivo en el cultivo tenían fechas de ingreso desconocidas

Características de rendimiento

Rendimiento clínico

Las características de rendimiento del Xpert MRSA Assay se determinaron en un estudio de investigación prospectivo multicéntrico en siete instituciones por comparación del ensayo de SARM en el GeneXpert System (Xpert MRSA Assay) con una segunda prueba de amplificación de ácidos nucleicos (nucleic acid amplification test, NAAT) aprobada por la FDA, y cultivo enriquecido, el método de cultivo más sensible. Los sujetos incluyeron personas y personal médico con riesgo de colonización nasal. Cada sujeto se incluyó en el estudio solo una vez. Se excluyeron del estudio los sujetos que habían recibido antibióticos nasales tópicos o sistémicos en el período de

48 horas a una semana antes de la inclusión en el estudio, los menores de 2 años y los sujetos para quienes la recogida de exudados nasales estaba contraindicada. Solo se incluyó a los sujetos que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión.

Se recogieron hisopos nasales de cada sujeto. Un hisopo se analizó mediante el Xpert MRSA Assay y el otro con la segunda prueba NAAT aprobada por la FDA. Se realizaron los dos tipos de pruebas NAAT en cada centro participante y un hisopo adicional se envió a un laboratorio centralizado para la prueba de cultivo.

En el laboratorio centralizado, el hisopo se frotó directamente en una placa de agar cromógeno selectivo con cefoxitina y la placa se incubó durante 24 a 48 horas a 35 °C ± 2 °C. El hisopo se transfirió a un caldo de soja tripticasa (TSB) con un 6,5% de cloruro sódico y se incubó durante 18 a 24 horas a 35 °C ± 2 °C. Si la inoculación directa fue negativa a las 24 horas, se frotó TSB enriquecido sobre otra placa de agar cromógeno con cefoxitina y se incubó durante 24 a 48 horas a 35 °C ± 2 °C. La confirmación de las colonias presuntamente positivas de cualquiera de los dos métodos de cultivo se realizó con una prueba de coagulasa en tubo y tinción de Gram.

El rendimiento del Xpert MRSA Assay y de la segunda prueba NAAT aprobada por la FDA se calculó en relación con los resultados del cultivo del laboratorio central (cultivo de referencia).

Resultados generales

Un total de 1077 sujetos aptos (una muestra por paciente) se sometieron a análisis de SARM con el Xpert MRSA, y una 2ª prueba NAAT aprobada por la FDA y cultivo. El Xpert MRSA identificó el 86,3% de las muestras positivas para SARM y el 94,9% de las muestras negativas para SARM en relación con el método del cultivo de referencia. Para los sujetos analizados, el valor predictivo positivo fue del 80,5% y el valor predictivo negativo fue del 96,6%.

tabla 2a. Xpert MRSA frente al método del cultivo de referencia

		Cultivo			
		+	-		
Xpert MRSA	+	182	44	226	Concordancia positiva: 86,3%
	-	29	819	848	Concordancia negativa: 94,9%
		211	863	1074*	VPP ¹ : 80,5%
					VPN ² : 96,6%

* 3 muestras no produjeron resultados con el ensayo Xpert tras dos intentos

¹ Valor predictivo positivo

² Valor predictivo negativo

Cuando se comparó con el método de cultivo directo (los hisopos se frotran directamente sobre placas de agar cromógeno selectivo con cefoxitina sin enriquecer con TSB y se incuban durante 24 a 48 horas a 35 °C ± 2 °C), el Xpert MRSA identificó el 94,3% de las muestras positivas para SARM y el 93,2% de las muestras negativas para SARM; el valor predictivo positivo fue del 73,0% y el valor predictivo negativo fue del 98,8%.

tabla 2b. Xpert MRSA frente al método de cultivo directo

		Cultivo directo			
		+	-		
Xpert MRSA	+	165	61	226	Concordancia positiva: 94,3%
	-	10	838	848	Concordancia negativa: 93,2%
		175	899	1074	VPP ¹ : 73,0%
					VPN ² : 98,8%

¹ Valor predictivo positivo

² Valor predictivo negativo

Las tablas siguientes muestran el rendimiento del Xpert MRSA y la prevalencia de SARM en cada centro clínico en comparación con los métodos de cultivo de referencia y cultivo directo.

tabla 3a. Rendimiento del Xpert MRSA por centro en comparación con el método del cultivo de referencia

Centro	Prevalencia de SARM ¹	Concordancia positiva (n) (IC del 95%) ²	Concordancia negativa (n) (IC del 95%) ³	Núm. de resultados indeterminados
1	20,2% (78/387)	87,2% (n=78) (77,7-93,7%)	93,9% (n=309) (90,6-96,3%)	10
2	5,2% (3/58)	100,0% (n=3) (29,2-100,0%)	98,2% (n=55) (90,3-100,0%)	3
3	44,4% (12/27)	91,7% (n=12) (61,5-99,8%)	100,0% (n=15) (78,2-100,0%)	3
4	12,3% (20/162)	80,0% (n=20) (56,3-94,3%)	97,2% (n=142) (92,9-99,2%)	9
5	20,5% (46/224)	89,1% (n=46) (76,4-96,4%)	94,9% (n=178) (90,6-97,7%)	1
6	22,3% (42/188)	81,0% (n=42) (65,9-91,4%)	93,2% (n=146) (87,8-96,7%)	6
7	35,7% (10/28)	90,0% (n=10) (55,5-99,8%)	94,4% (n=18) (72,7-99,9%)	2
Total	19,6% (211/1074)	86,3% (n=211) (80,9-90,6%)	94,9% (n=863) (93,2-96,3%)	34

¹Determinado a partir de los resultados obtenidos con el método del cultivo de referencia

²Número de positivos determinado por el método del cultivo de referencia

³Número de negativos determinado por el método del cultivo de referencia

tabla 3b. Rendimiento del Xpert MRSA por centro — Comparación con el método de cultivo directo

Centro	Concordancia positiva	Concordancia negativa
1	95,4% (87,1-99,0%)	92,2% (88,8-94,9%)
2	100,0% (29,2-100,0%)	98,2% (90,3-100,0%)
3	91,7% (61,5-99,8%)	100,0% (78,2-100,0%)
4	81,3% (54,4-96,0%)	95,2% (90,4-98,1%)
5	94,9% (82,7-99,4%)	93,0% (88,3-96,2%)
6	97,1% (84,7-99,9%)	92,9% (87,6-96,4%)
7	100,0% (54,1-100,0%)	81,8% (59,7-94,8%)
Total	94,3% (89,7-97,2%)	93,2% (91,4-94,8%)

El rendimiento del Xpert MRSA, la 2ª NAAT aprobada por la FDA y el método de cultivo directo en centros individuales en relación con el método del cultivo de referencia se presenta en las tablas siguientes.

tabla 4a. Resultados del Xpert MRSA, el método de cultivo directo y la segunda prueba NAAT aprobada por la FDA con muestras positivas para SARM por el método del cultivo de referencia

Concordancia positiva (IC del 95%)			
Centro	Xpert MRSA	2ª NAAT	Cultivo directo¹
1	87,2% (77,7-93,7%)	80,8% (70,3-88,8%)	83,3% (73,2-90,8%)
2	100,0% (29,2-100,0%)	100,0% (29,2-100,0%)	100,0% (29,2-100,0%)
3	91,7% (61,5-99,8%)	83,3% (51,6-97,9%)	100,0% (73,5-100,0%)
4	80,0% (56,3-94,3%)	78,9% (54,4-93,9%)	80,0% (56,3-94,3%)
5	89,1% (76,4-96,4%)	89,1% (76,4-96,4%)	84,8% (71,1-93,7%)
6	81,0% (65,9-91,4%)	78,6% (63,2-89,7%)	81,0% (65,9-91,4%)
7	90,0% (55,5-99,7%)	100,0% (69,2-100,0%)	60,0% (26,2-87,8%)
Total	86,3% (80,9-90,6%)	83,3% (77,6-88,1%)	82,9% (77,2-87,8%)

¹ Hisopos frotados directamente sobre placas de agar cromógeno selectivo con cefoxitina e incubados durante 24 a 48 horas a 35 °C ± 2 °C.

tabla 4b. Resultados del Xpert MRSA, el método de cultivo directo y la segunda prueba NAAT aprobada por la FDA con muestras negativas para SARM por el método del cultivo de referencia

Concordancia negativa (IC del 95%)			
Centro	Xpert MRSA	2ª NAAT	Cultivo directo¹
1	93,9% (90,6-96,3%)	92,2% (88,7-95,0%)	100,0% (98,8-100,0%)
2	98,2% (90,3-100,0%)	98,2% (90,3-100,0%)	100,0% (93,6-100,0%)
3	100,0% (78,2-100,0%)	100,0% (79,4-100,0%)	100,0% (79,4-100,0%)
4	97,2% (92,9-99,2%)	97,9% (93,9-99,6%)	100,0% (97,5-100,0%)
5	94,9% (90,6-97,7%)	93,8% (89,2-96,9%)	100,0% (97,9-100,0%)
6	93,2% (87,8-96,7%)	94,5% (89,5-97,6%)	100,0% (97,5-100,0%)
7	94,4% (72,7-99,9%)	94,4% (72,7-99,9%)	100,0% (81,5-100,0%)
Total	94,9% (93,2-96,3%)	94,4% (92,7-95,9%)	100,0% (99,6-100,0%)

¹ Hisopos frotados directamente sobre placas de agar cromógeno selectivo con cefoxitina e incubados durante 24 a 48 horas a 35 °C ± 2 °C.

Especificidad analítica

Se analizaron cultivos de 51 cepas de la American Type Culture Collection (ATCC) y la Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA) que representaban especies filogenéticamente relacionadas con *S. aureus* y miembros de la flora comensal nasal, 32 cepas de estafilococos coagulasa negativos sensibles a meticilina y 12 cepas de estafilococos coagulasa negativos resistentes a meticilina. Se analizaron tres réplicas de cada aislado a $\approx 1 \times 10^6$ UFC/hisopo. El ensayo no detectó ninguno de estos aislados. La especificidad fue del 100%.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del Xpert MRSA se determinó utilizando 6 cepas de SARM que representaban los seis tipos y subtipos del SCC_{mec} (I, II, III, IV, IVa y V). Los cultivos de estas cepas se cuantificaron y luego se diluyeron a valores que abarcaban el rango de 10 a 1000 unidades formadoras de colonias (UFC) por hisopo. Todas las diluciones se analizaron en réplicas de 4. El límite de detección obtenido para cada tipo o subtipo analizado muestra el número mínimo de UFC/hisopo al que las 4 réplicas dieron positivas. El Xpert MRSA Assay detectó todas las cepas que representaban cassettes de SCC_{mec} de tipo I - V.

tabla 5. Detección del tipo de SCC_{mec}

SCC _{mec}	(UFC/hisopo)
tipo I	10
tipo II	10
tipo III	10
tipo V	10
tipo IV	50
tipo IVa	100

Se realizaron estudios adicionales con células de tipo II para determinar el intervalo de confianza del 95% para el límite de detección analítico (LD) de este ensayo. El límite de detección se define como el número mínimo de unidades formadoras de colonias (UFC) de SARM por hisopo que pueden distinguirse de forma reproducible de las muestras negativas con una confianza del 95%. Los resultados indican que el Xpert MRSA producirá un resultado positivo con una confianza del 95% para un hisopo con 80 UFC.

Reproducibilidad

Un grupo de muestras con concentraciones variables de SARM y *Staphylococcus epidermidis* sensible a meticilina (negativo) se analizó por triplicado en 10 días diferentes en cada uno de los tres centros (4 muestras $\times$ 3 veces/día $\times$ 10 días $\times$ 3 centros). Se utilizó un lote del kit Xpert MRSA en cada uno de los 3 centros de análisis. Los Xpert MRSA Assay se realizaron de acuerdo con el procedimiento del Xpert MRSA.

tabla 6. Resumen de los resultados de reproducibilidad

ID de la muestra	SARM UFC/ hisopo	MSSE UFC/ hisopo	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Concordancia total	% de concordancia total
Negativo	0	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/31 ^A	90/91	98,9%
Positivo débil	117	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	27/29 ^A	87/89	97,8%
Positivo	800	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/30	90/90	100,0%
Positivo intenso	$2,6 \times 10^4$	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/30	90/90	100,0%
Concordancia total			120/120	120/120	117/120	357/360	99,2%
% de concordancia			100,0%	100,0%	97,5%		

^A El Xpert MRSA Assay se realizó accidentalmente en una muestra negativa adicional y una muestra positiva débil menos

Bibliografía

1. Mainous AG, Hueston WJ, Everett, CJ, Vanessa A. Diaz VA. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in the United States, 2001-2002. *An Family Medicine*. 2006;4(2):132-137.
2. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004;32:470-85.
3. Chaix C, Durand-Zileski I, Alberti C, Buisson B. Control of Endemic Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *JAMA* 1999;282(19):1745-51.
4. Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases* 2001;7(2) 323-6.
5. Salgado CD et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-analysis of Prevalence and Risk Factors. *CID* 2003;36:131.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).

Asistencia

Para obtener asistencia, póngase en contacto con Cepheid utilizando uno de los medios de contacto siguientes. Cuando llame o envíe un correo electrónico, no olvide indicar el número de serie del instrumento y la ID del lote de reactivos.

Norteamérica

Para el servicio técnico, utilice la información de contacto siguiente:

Tel: 888.838.3222, opción 2

Correo electrónico: techsupport@cepheid.com

Puede ponerse en contacto con el servicio técnico de Cepheid por teléfono, de lunes a viernes, de 5.00 a 17.00, hora de la costa del Pacífico de EE.UU.

Unión Europea

Para el servicio técnico, utilice la información de contacto siguiente:

Tel: +33.563.82.53.19

Fax: +33.563.82.53.01

Correo electrónico: support@cepheideurope

Otros lugares

Póngase en contacto con su representante local de Cepheid.

Tabla de símbolos

Símbolo	Significado
	Número de catálogo
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Marca CE – Conformidad europea
	Representante autorizado en la Comunidad Europea
	No volver a utilizar
	Precaución, consultar el documento adjunto
	Fabricante
	Contiene suficiente cantidad para <n> pruebas
	Control
	Límites de temperatura
	Peligro biológico



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
EE.UU.

Teléfono: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192



Cepheid Europe

Vira Solelh

81470 Maurens-Scopont

Francia

Tel: +33.563.82.53.00

Fax: +33.563.82.53.01

Correo electrónico: cepheid@cepheideurope



Italiano

Solo per uso diagnostico *in vitro*

Nome commerciale

Xpert® MRSA

Nome di uso comune

Xpert MRSA Assay

Finalità d'uso

Il saggio Cepheid Xpert MRSA Assay eseguito sul GeneXpert® Dx System (Xpert MRSA) è un test diagnostico qualitativo *in vitro* previsto per il rilevamento rapido dello *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) dai tamponi nasali dei pazienti a rischio di colonizzazione nasale. Il test utilizza la reazione a catena della polimerasi (PCR), automatica e in tempo reale, per il rilevamento del DNA dell'MRSA. Il saggio Xpert MRSA Assay è previsto come ausilio nella prevenzione e nel controllo delle infezioni da MRSA in ambito sanitario. Il saggio Xpert MRSA Assay non è previsto per la diagnosi delle infezioni da MRSA, né può essere usato per indirizzare o monitorare il trattamento delle infezioni da MRSA. Sono necessarie colture concomitanti mirate solo al recupero degli organismi per la tipizzazione epidemiologica o per ulteriori test di sensibilità.

Sommario e spiegazione

Lo *Staphylococcus aureus* (SA) è uno dei principali patogeni nosocomiali, responsabile di una vasta gamma di malattie, tra cui endocardite, osteomielite, sindrome da shock tossico, intossicazioni alimentari, foruncolosi e carbonchio. Nei primi anni cinquanta, l'acquisizione e la diffusione dei plasmidi che producono la beta-lattamasi ostacolò l'efficacia della penicillina nel trattamento delle infezioni da *S. aureus*. Nel 1959 fu introdotta la meticillina, un tipo di penicillina sintetica. Intorno al 1960, tuttavia, furono identificati ceppi di *S. aureus* resistenti alla meticillina. Si stabilì che tale resistenza era la conseguenza dell'acquisizione, da parte dello *Staphylococcus aureus*, del gene *mecA*. Oggi, negli USA, l'MRSA è responsabile di circa il 25% delle infezioni nosocomiali e le segnalazioni di infezioni da MRSA in ambiente comunitario stanno aumentando, con un conseguente significativo incremento della morbidità e della mortalità. Nel tentativo di limitare la diffusione di queste infezioni, si stanno sviluppando politiche e strategie di controllo da implementarsi in ambiente sanitario. Il controllo dell'MRSA è uno dei principali obiettivi della maggior parte dei programmi di monitoraggio delle infezioni nosocomiali. Attualmente, il metodo standard per il rilevamento dell'MRSA è la coltura, che risulta però assai laborioso e dispendioso in termini di tempo.^{1,2,3,4,5} Un metodo più rapido e sensibile per il monitoraggio dell'MRSA sancirà un vantaggio concreto per i programmi di controllo delle infezioni.

Principi della procedura

Il GeneXpert Dx System automatizza e integra la purificazione dei campioni, l'amplificazione degli acidi nucleici e il rilevamento della sequenza bersaglio in campioni semplici o complessi, usando i saggi di PCR in tempo reale e RT-PCR (reazione a catena della polimerasi dopo retrotrascrizione). Il sistema è composto da uno strumento, un personal computer e un software precaricato per l'esecuzione dei test sui campioni raccolti e per la visualizzazione dei risultati. Il sistema richiede l'impiego delle cartucce monouso GeneXpert contenenti i reagenti della PCR, dentro le quali si svolge l'omonimo processo (reazione a catena della polimerasi). Essendo le cartucce chiuse, il rischio di contaminazione crociata tra i campioni è escluso. Per una descrizione completa del sistema, consultare il *Manuale dell'operatore di GeneXpert Dx System*.

Il saggio Xpert MRSA Assay include i reagenti per il rilevamento dell'MRSA, oltre a un controllo per il trattamento dei campioni (SPC) utilizzato per verificare che i batteri bersaglio siano stati trattati in modo adeguato e monitorare la presenza di sostanze inibitrici nella reazione PCR. Il controllo per la verifica della sonda (PCC) accerta la reidratazione dei reagenti, il riempimento delle provette della PCR nelle cartucce, l'integrità della sonda e la stabilità dei fluorofori.

I primer e le sonde del saggio Xpert MRSA Assay rilevano le sequenze proprietarie indicanti la presenza di una cassetta inserita nel cromosoma dello *S. aureus*.

Reagenti e strumenti

Materiali in dotazione

Il saggio Xpert MRSA (GXMRSA-100N-10) contiene una quantità di reagenti sufficiente per il trattamento di 10 campioni di analisi o campioni di controllo qualità. Il saggio Xpert MRSA (GXMRSA-120) contiene una quantità di reagenti sufficiente per il trattamento di 120 campioni di analisi o campioni di controllo qualità.

Il contenuto del kit è il seguente:

Cartucce Xpert MRSA Assay con annesse provette di reazione	10	120
Microsfera 1 (liofilizzata)	1 per cartuccia	1 per cartuccia
Polimerasi		
dNTP (deossinucleotidi trifosfato)		
Albumina di siero bovino (BSA)		
Microsfera 2 (liofilizzata)	1 per cartuccia	1 per cartuccia
Primer		
Sonde		
BSA		
Microsfera 3 (liofilizzata)	1 per cartuccia	1 per cartuccia
Controllo per il trattamento dei campioni (SPC)		
~6.000 spore di controllo non infettive per la preparazione del campione		
Reagente 1 (idrossido di sodio)	3,0 mL per cartuccia	3,0 mL per cartuccia
Reagente 2 (tampone Tris, EDTA e surfattanti)	3,0 mL per cartuccia	3,0 mL per cartuccia
Sacca reagenti Xpert MRSA	1	1
Reagente di eluizione (tiocianato di guanidina e surfattanti)	10 × 1,5 mL per sacca	125 × 1,5 mL per sacca

Note:

Schede dati di sicurezza (MSDS) per tutti i reagenti forniti con il presente saggio sono disponibili su richiesta presso l'Assistenza Tecnica e sui siti web di Cepheid (www.cepheid.com e www.cepheidinternational.com).

L'albumina di siero bovino (BSA) presente in questo prodotto è stata ricavata esclusivamente da plasma di bovini allevati negli USA. La stessa produzione di BSA viene effettuata negli USA. Nessuna proteina di ruminanti o altri animali è stata somministrata ai bovini utilizzati; gli animali sono stati sottoposti a test sia prima che dopo la morte. Durante il trattamento non c'è stata commistione tra il materiale in questione e sostanze provenienti da altri animali.

Conservazione e manipolazione

- Le cartucce e i reagenti del saggio Xpert MRSA vanno conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 28 °C.
- Non utilizzare i reagenti o le cartucce dopo la data di scadenza.
- Non aprire le cartucce fino al momento in cui si dovrà eseguire il test.
- Non utilizzare i reagenti se appaiono torbidi o scoloriti.

Materiali necessari non in dotazione

- GeneXpert Dx System (il numero di catalogo varia a seconda della configurazione): strumento GeneXpert, computer, penna ottica per codici a barre e Manuale per l'operatore
- Stampante (per indicazioni sulla compatibilità, consultare il *Manuale dell'operatore di GeneXpert Dx System*)
- Cepheid Sample Collection Device (numero di parte 900-0370)
- Miscelatore vortex
- Pipette di trasferimento sterili monouso
- Garza sterile

Materiali disponibili non in dotazione

KWIK-STIK™ di MicroBioLogics con numero di catalogo 0158 MRSA come controllo positivo e con numero di catalogo 0371 MSSE (*Staphylococcus epidermidis* meticillino-sensibile) come controllo negativo.

Avvertenze e precauzioni



- Trattare tutti i campioni biologici di analisi, comprese le cartucce usate, come potenziali portatori di agenti infettivi. Poiché, nella maggior parte dei casi, è impossibile distinguere i potenziali veicoli di infezione, tutti i campioni biologici di analisi devono essere trattati attenendosi alle precauzioni standard. Per indicazioni sul trattamento dei campioni di analisi, rivolgersi ai CDC (Centers for Disease Control and Prevention)⁶ statunitensi e al Clinical and Laboratory Standards Institute (ex National Committee for Clinical Laboratory Standards).⁷

- Durante il trattamento di sostanze chimiche e la manipolazione di campioni biologici, attenersi alle procedure di sicurezza del proprio presidio.
- Il saggio Xpert MRSA Assay non fornisce risultati sulla sensibilità. Colture e test di sensibilità richiedono infatti tempi di esecuzione più lunghi.
- Non sostituire i reagenti del saggio Xpert MRSA con altri reagenti.
- Non aprire il coperchio della cartuccia Xpert MRSA se non per l'aggiunta dei campioni.
- Non utilizzare le cartucce dopo averle fatte cadere o agitate in seguito all'aggiunta del campione.
- Non utilizzare cartucce con provette di reazione danneggiate.



- Utilizzare una cartuccia monouso Xpert MRSA per l'esecuzione di ogni test. Non riutilizzare le cartucce usate.
- Per un corretto smaltimento delle cartucce usate e dei reagenti non utilizzati, chiedere consiglio al personale preposto allo smaltimento dei rifiuti del proprio presidio. Tali materiali possono presentare caratteristiche analoghe a quelle previste per i rifiuti pericolosi dal Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) dell'EPA (agenzia federale per la protezione ambientale), che in quanto tali hanno requisiti specifici di smaltimento. Verificare le normative locali e nazionali, in quanto potrebbero differire dalle normative statunitensi per lo smaltimento dei rifiuti. I presidi ubicati al di fuori degli USA dovranno attenersi ai requisiti per lo smaltimento dei rifiuti pericolosi in vigore nel rispettivo Paese.



- Il kit Xpert MRSA va conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 28 °C.



- Il reagente 1 contiene idrossido di sodio (pH > 12,5) (frase di rischio UE R34), sostanza corrosiva per gli occhi e la pelle che richiede l'impiego di adeguate protezioni.



- Il reagente di eluizione contiene tiocianato di guanidina (frase di rischio UE R32, 52/53), nocivo per gli organismi acquatici.

Raccolta e trasporto dei campioni di analisi



Per raccogliere campioni di analisi adeguati, attenersi rigorosamente alle istruzioni fornite in questa sezione.

1. Aprire il Cepheid Collection Device ripiegando l'involucro esterno.
2. Chiedere al paziente di inclinare la testa all'indietro. Inserire tamponi asciutti all'interno di ogni narice per circa 1–2 cm.
3. Ruotare i tamponi contro la parete interna della narice per 3 secondi. Applicare una leggera pressione con un dito sull'esterno del naso per favorire un buon contatto tra il tampone e l'interno della narice.
4. Usando gli stessi tamponi, ripetere l'operazione nella seconda narice cercando di non toccare nient'altro oltre all'interno del naso.
5. Rimuovere la provetta di trasporto di plastica. Svitare il tappo della provetta e gettarlo. Collocare i tamponi nella provetta di trasporto di plastica. I tamponi devono essere inseriti completamente nella provetta fino ad appoggiarsi sulla superficie della spugna posta sul fondo della stessa. Verificare che il tappo rosso sia ben stretto.

Nota - I tamponi devono rimanere sempre attaccati al tappo rosso.

6. Etichettare la provetta di trasporto di plastica con l'ID del paziente e inviarla al laboratorio.
7. Conservare i campioni di analisi dei tamponi a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C) qualora il trattamento sia previsto entro 24 ore o tra 2 °C e 8 °C in caso contrario. I campioni di analisi dei tamponi sono stabili fino a 5 giorni se conservati tra 2 °C e 8 °C.

Procedura

Preparazione della cartuccia

Importante - Iniziare il test entro 15 minuti dall'introduzione del campione nella cartuccia.

Nota - Usare un solo tampone. Il secondo tampone deve essere usato in caso di necessità per la ripetizione del test.

Per inserire il campione nella cartuccia (Xpert MRSA), procedere nel modo seguente.

1. Estrarre la cartuccia e il reagente di eluizione dal kit.
2. Rimuovere i tamponi dal contenitore di trasporto, quindi staccare uno dei tamponi dal tappo rosso.
3. Inserire il tampone nella provetta contenente il reagente di eluizione.

Nota - Usare una garza sterile per ridurre al minimo il rischio di contaminazione.

4. Tenere il tampone per lo stelo vicino al bordo della provetta, sollevare il tampone di alcuni millimetri dal fondo della provetta, quindi spingere lo stelo contro il bordo della provetta per romperlo. Verificare che il tampone sia abbastanza corto da permettere la chiusura ermetica del tappo.
5. Chiudere il tappo e miscelare in vortex ad alta velocità per 10 secondi.
6. Aprire il coperchio della cartuccia. Usando una pipetta di trasferimento sterile, trasferire l'intero contenuto del reagente di eluizione nell'ampia apertura dentellata (elemento nr. 1 nella Figura 1) della cartuccia GeneXpert.
7. Chiudere il coperchio della cartuccia.

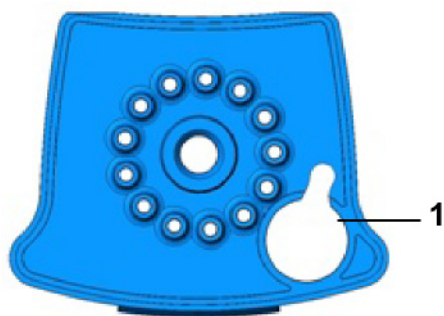


Figura 1. Cartuccia Xpert MRSA (vista superiore)

Avvio del test

Importante - Prima di iniziare il test, verificare che il file di definizione del saggio Xpert MRSA Assay sia stato importato nel software GeneXpert.

Questa sezione elenca le fasi principali di esecuzione del test. Per istruzioni dettagliate, consultare il *Manuale dell'operatore di GeneXpert Dx System*.

1. Accendere prima il computer e successivamente lo strumento GeneXpert Dx.
2. Sul desktop di Windows® fare doppio clic sull'icona del collegamento GeneXpert Dx.
3. Connettersi al software del GeneXpert Dx System usando il proprio nome utente e la password.
4. Nella finestra GeneXpert Dx System, selezionare **Create Test** (Crea test). Verrà visualizzata la finestra di dialogo Scan Cartridge Barcode (Scansione codice a barre cartuccia).
5. Eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia Xpert MRSA. Verrà visualizzata la finestra Create Test (Crea test). Usando le informazioni del codice a barre, il software compilerà automaticamente le caselle dei campi seguenti: **Select Assay** (Seleziona saggio), **Reagent Lot ID** (ID lotto reagente), **Cartridge SN** (Nr. di serie cartuccia) e **Expiration Date** (Data di scadenza).

6. Eseguire la scansione o digitare l'ID del campione nella casella **Sample ID** (ID campione). Verificare che l'ID del campione digitato sia corretto. L'ID del campione sarà associato ai risultati del test e riportato nella finestra View Results (Visualizza risultati) e su tutti i rapporti.
7. Selezionare **Start Test** (Inizia test). Digitare la propria password nella finestra di dialogo visualizzata.
8. Aprire lo sportello del modulo dello strumento la cui spia verde lampeggia e caricare la cartuccia.
9. Chiudere lo sportello. Una volta iniziato il test, la spia verde smetterà di lampeggiare, per spegnersi al termine del test.
10. Attendere che il sistema abbia sbloccato lo sportello del modulo prima di aprirlo, quindi rimuovere la cartuccia.
-  11. Smaltire le cartucce usate negli appositi contenitori per rifiuti biologici attenendosi alla prassi standard del proprio presidio.

Visualizzazione e stampa dei risultati

Per istruzioni dettagliate sulla visualizzazione e la stampa dei risultati, consultare il *Manuale dell'operatore di GeneXpert Dx System*.

CONTROL Controllo qualità

Ciascun test comprende un controllo per il trattamento dei campioni (SPC) e un controllo per la verifica della sonda (PCC).

Controllo per il trattamento dei campioni (SPC)—Verificare che i campioni siano stati trattati correttamente. Il controllo SPC contiene spore di *Bacillus globigii*, presenti in ogni cartuccia sotto forma di pellet di spore essiccate, per verificare il corretto trattamento dell'MRSA. Il controllo SPC accerta l'avvenuta lisi dell'MRSA, qualora gli organismi siano presenti, e verifica che il trattamento dei campioni di analisi sia adeguato. Questo controllo rileva inoltre l'inibizione del saggio di PCR in tempo reale associata ai campioni di analisi. Il controllo SPC deve essere positivo con i campioni negativi e può essere negativo o positivo con i campioni positivi. L'SPC si considera riuscito qualora siano soddisfatti i criteri di accettazione convalidati.

Controllo per la verifica della sonda (PCC)—Prima che inizi la reazione PCR, GeneXpert Dx System misura il segnale di fluorescenza emesso dalle sonde allo scopo di monitorare la reidratazione della microsfera, il riempimento delle provette di reazione, l'integrità della sonda e la stabilità dei fluorofori. La verifica della sonda si considera riuscita qualora siano soddisfatti i criteri di accettazione assegnati.

Controlli esterni—Possono essere usati KWIK-STIK™ (MicroBioLogics, numero di catalogo 0158 MRSA come controllo positivo e 0371 MSSE come controllo negativo) a scopo di addestramento, prova valutativa e controllo di qualità esterno di GeneXpert Dx System. Possono essere usati controlli esterni, in conformità con gli organismi di accreditamento locali, regionali e nazionali pertinenti. Per i controlli esterni, attenersi alla procedura MicroBioLogics descritta di seguito.

1. Strappare il sacchetto in corrispondenza della tacca ed estrarre il KWIK-STIK.
2. Premere il fondo del flacone all'interno del tappo per fare fuoriuscire il fluido idratante.
3. Tenere il flacone verticalmente e picchiare per facilitare il passaggio del fluido attraverso il condotto fino alla base dell'unità contenente il pellet.
4. Per facilitare lo scioglimento del pellet di cellule liofilizzate, frantumare il pellet e premere leggermente la camera inferiore.
5. Rimuovere il cappuccio dal KWIK-STIK per esporre il tampone, quindi inserire il tampone nella provetta contenente il reagente di eluizione.
6. Il tampone KWIK-STIK è pronto per il test Xpert MRSA.

Interpretazione dei risultati

I risultati vengono interpolati automaticamente da GeneXpert Dx System, dai segnali fluorescenti misurati e dagli algoritmi di calcolo incorporati e vengono visualizzati nella finestra View Results (Visualizza risultati). I risultati possibili sono:

MRSA POSITIVE (MRSA POSITIVO)

È stato rilevato il DNA bersaglio per MRSA (positività presuntiva di colonizzazione da MRSA).

- **MRSA—POSITIVE (POSITIVO):** Il bersaglio per MRSA presenta un Ct entro il range di validità e un endpoint al di sopra del valore minimo.
- **SPC—NA (NON APPLICABILE):** L'SPC viene ignorato dato che l'amplificazione dell'MRSA può competere con questo controllo.
- **Verifica della sonda—PASS (RIUSCITA):** Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.

MRSA NEGATIVE (MRSA NEGATIVO)

Il DNA bersaglio per MRSA non è stato rilevato (presunta assenza di colonizzazione da MRSA); l'SPC soddisfa i criteri di accettazione.

- MRSA—NEGATIVE (NEGATIVO): Il DNA bersaglio per MRSA non è stato rilevato.
- SPC—PASS (RIUSCITO): L'SPC presenta un Ct entro il range di validità e un endpoint al di sopra del valore minimo.
- Verifica della sonda—PASS (RIUSCITA): Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.

INVALID (NON VALIDO)

Non è possibile determinare la presenza o l'assenza di MRSA; ripetere il test con il tampone di riserva. L'SPC non soddisfa i criteri di accettazione, il campione non è stato trattato correttamente o la PCR è stata inibita.

- MRSA—INVALID (NON VALIDO): La presenza o l'assenza di DNA dell'MRSA non può essere determinata.
- SPC—FAIL (NON RIUSCITO): Il risultato del bersaglio per MRSA è negativo, il Ct per SPC non rientra nel range di validità e l'endpoint è al di sotto del valore minimo.
- Verifica della sonda—PASS (RIUSCITA): Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.

ERROR (ERRORE)

Non è possibile determinare la presenza o l'assenza di MRSA; ripetere il test con il tampone di riserva. Il controllo per la verifica della sonda non ha avuto esito positivo, probabilmente a causa del riempimento inadeguato della provetta di reazione, di un problema a livello di integrità della sonda o del superamento dei limiti massimi di pressione.

- MRSA—NO RESULT (NESSUN RISULTATO)
 - SPC—NO RESULT (NESSUN RISULTATO)
 - Verifica della sonda—FAIL* (NON RIUSCITA); uno o tutti i risultati della verifica della sonda non sono validi.
- * Se la verifica della sonda ha avuto esito positivo, l'errore è probabilmente dovuto a un guasto di un componente del sistema.

NO RESULT (NESSUN RISULTATO)

Non è possibile determinare la presenza o l'assenza di MRSA; ripetere il test con il tampone di riserva. La quantità di dati raccolta non è sufficiente per generare i risultati del test (l'operatore, per esempio, ha interrotto l'esecuzione del test in corso).

- MRSA—NO RESULT (NESSUN RISULTATO)
- SPC—NO RESULT (NESSUN RISULTATO)
- Verifica della sonda—NA (NON APPLICABILE)

Motivazioni per la ripetizione del saggio

Ripetere il test utilizzando una nuova cartuccia e un nuovo reagente di eluizione (non riutilizzare la cartuccia già usata), oppure applicare le procedure alternative nel caso in cui il test abbia prodotto uno dei seguenti risultati:

- Un risultato del test **INVALID** (NON VALIDO) indica la non riuscita del controllo SPC. Il campione non è stato trattato correttamente o la PCR è stata inibita.
- Il risultato **ERROR** (ERRORE) indica che il controllo per la verifica della sonda non ha avuto esito positivo e il saggio è stato interrotto, probabilmente a causa del riempimento inadeguato della provetta di reazione, dell'individuazione di un problema a livello di integrità della sonda o del superamento dei limiti massimi di pressione.
- La dicitura **NO RESULT** (NESSUN RISULTATO) indica che la quantità di dati raccolta è insufficiente. L'operatore, per esempio, ha interrotto l'esecuzione di un test in corso.

Limiti

Le prestazioni del saggio Xpert MRSA Assay sono state convalidate usando unicamente le procedure specificate nel presente foglietto illustrativo. Le variazioni alle procedure in questione possono alterare le prestazioni del test. I risultati del saggio Xpert MRSA Assay devono essere interpretati insieme ad altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico.

Si possono ottenere risultati erranei come conseguenza di una raccolta dei campioni di analisi inadeguata, della mancata osservanza delle procedure consigliate per la raccolta, la manipolazione o la conservazione dei campioni, di errori tecnici, di commistione dei campioni o a causa di una presenza di organismi nel campione di analisi troppo esigua per essere rilevata dai test. La stretta osservanza delle istruzioni del presente foglietto illustrativo è necessaria per evitare risultati erranei.

Poiché il rilevamento di MRSA è subordinato al numero di organismi presenti nel campione, l'affidabilità dei risultati dipende da un'adeguata raccolta, manipolazione e conservazione dei campioni di analisi.

La ripetizione del saggio Xpert MRSA in presenza dei risultati **INVALID** (NON VALIDO), **ERROR** (ERRORE) e **NO RESULT** (NESSUN RISULTATO) dipende dalla prassi e dai protocolli dei singoli presidi. Devono essere disponibili procedure alternative, (quali l'impiego di colture su piastre di agar selettive, con o senza incubazione notturna, in un brodo di arricchimento selettivo). Per la coltura si dovranno collocare i rimanenti campioni di analisi dei tamponi in opportuni sistemi di trasporto, per un periodo massimo di 4 giorni.

Un risultato positivo non presuppone necessariamente la presenza di organismi vitali. Può comunque essere indicativo della presenza di MRSA.

Il test con il saggio Xpert MRSA Assay deve essere utilizzato come ausilio, in aggiunta agli altri metodi disponibili.

I risultati del test possono anche essere influenzati da terapie antibiotiche concomitanti. Questo test non può quindi essere usato per valutare il successo o il fallimento di una terapia, dato che il DNA potrebbe persistere anche dopo la terapia antimicrobica.

Mutazioni o polimorfismi nelle regioni leganti il primer o la sonda possono compromettere il rilevamento di varianti nuove o sconosciute di MRSA, con conseguenti risultati falsi negativi.

Sostanze interferenti

Tra le sostanze potenzialmente interferenti analizzate sono inclusi il sangue, il muco e gli spray nasali usati per decongestionare le vie aeree o alleviare la secchezza o l'irritazione del naso. La presenza di queste sostanze non è stata però determinante ai fini dell'inibizione della PCR né ha prodotto risultati erranei o non validi.

Nello studio analitico relativo al saggio Xpert MRSA Assay, sono state rilevate sostanze potenzialmente interferenti (sangue, muco o entrambi) in 45 su 1.077 (4,2%) campioni di analisi di tamponi nasali. Dei 31 campioni di analisi con risultati equivoci a un primo test, tre campioni di analisi presentavano muco e uno sangue sul tampone. Tre dei quattro campioni di analisi hanno prodotto un risultato alla ripetizione del test, mentre quello contenente muco è rimasto indeterminato.

Valori attesi

Nello studio clinico su Xpert MRSA sono stati inclusi un totale di 1.077 campioni di analisi nasali raccolti da 1.077 soggetti in sette diversi siti di arruolamento sul territorio statunitense. La popolazione dello studio è stata divisa in soggetti residenti in case di cura o centri di lunga degenza, pazienti ospedalizzati da più di 3 giorni, pazienti ospedalizzati da 3 giorni o meno, pazienti ambulatoriali e personale sanitario o altro. Il numero e la percentuale di casi positivi e negativi rispetto al metodo della coltura di riferimento sono stati calcolati e riportati nella tabella seguente.

Tabella 1. Valori attesi per MRSA negli studi su popolazioni diverse

Gruppo	Nr. positivi (%)	Nr. negativi (%)	Totale (%) ¹
Case di cura, centri di lunga degenza e residenze per soggiorni prolungati	62 (25,5)	181 (74,5)	243 (22,6)
Ospedalizzazione > 3 giorni	61 (23,0)	204 (77,0)	265 (24,7)
Ospedalizzazione = 3 giorni	29 (13,1)	193 (86,9)	222 (20,7)
Pazienti ambulatoriali	46 (17,7)	214 (82,3)	260 (24,2)
Personale e altro	11 (12,9)	74 (87,1)	85 (7,9)
Totale	209 (19,4)	866 (80,6)	1.075

¹ Per due soggetti ospedalizzati con colture positive non è stato possibile individuare la data di accettazione.

Caratteristiche prestazionali

Prestazioni cliniche

Uno studio analitico prospettico multi-centrico, articolato su sette presidi, ha determinato le caratteristiche prestazionali del saggio Xpert MRSA Assay, confrontando il saggio per MRSA su GeneXpert System (Xpert MRSA Assay) con un secondo test di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT) approvato dalla FDA e una coltura arricchita, attualmente il metodo di coltura più sensibile. Tra i soggetti sono stati inclusi individui e personale sanitario a rischio di colonizzazione nasale. Tutti i soggetti sono stati arruolati nello studio una sola volta. I soggetti di età inferiore a 2 anni sottoposti a terapia antibiotica sistemica o topica per via nasale in un periodo compreso tra 48 ore e una settimana prima dell'arruolamento nello studio presentavano controindicazioni alla raccolta dei tamponi nasali e sono stati esclusi dallo studio. Nello studio sono stati arruolati solo i soggetti conformi ai criteri di inclusione ed esclusione.

Da ogni soggetto sono stati raccolti due tamponi nasali. Un tampone è stato testato con il saggio Xpert MRSA Assay e l'altro con il test NAAT approvato dalla FDA. I due tipi di test NAAT sono stati condotti in tutti i presidi partecipanti e un ulteriore tampone è stato inviato a un laboratorio centrale per essere testato con la coltura.

Presso il laboratorio centrale, il tampone è stato strisciato direttamente su una piastra di agar cromogenica selettiva addizionata di cefoxitina, che è stata incubata per 24–48 ore a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Il tampone è stato trasferito in un brodo di soia triptico (TSB) con cloruro di sodio al 6,5% e incubato per 18–24 ore a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Laddove la strisciata diretta era risultata negativa dopo 24 ore, il TSB arricchito era stato strisciato su un'altra piastra di agar cromogenica addizionata di cefoxitina e incubato per 24–48 ore a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Per la conferma di colonie positive presuntive, in entrambi i metodi di coltura sono stati usati il test della coagulasi in provetta e la colorazione di Gram.

Le prestazioni del saggio Xpert MRSA Assay e del secondo test NAAT approvato dalla FDA sono state calcolate con riferimento ai risultati della coltura del laboratorio centrale (coltura di riferimento).

Risultati globali

Un totale di 1.077 soggetti idonei (un campione di analisi per paziente) sono stati testati per MRSA con il saggio Xpert MRSA e con un 2° test NAAT approvato dalla FDA, oltre che con la coltura di riferimento. Il saggio Xpert MRSA ha individuato l'86,3% dei campioni di analisi positivi per MRSA e il 94,9% dei campioni di analisi negativi per MRSA rispetto al metodo della coltura di riferimento. Per i soggetti testati, il valore predittivo positivo era dell'80,5% e il valore predittivo negativo del 96,6%.

Tabella 2a. Confronto tra il saggio Xpert MRSA e il metodo della coltura di riferimento

		Coltura			
		+	-		
Xpert MRSA	+	182	44	226	Concordanza positivi: 86,3%
	-	29	819	848	Concordanza negativi: 94,9%
		211	863	1.074*	PPV ¹ : 80,5%
					NPV ² : 96,6%

* 3 campioni di analisi non hanno generato risultati con il saggio Xpert in due tentativi

¹ Valore predittivo positivo

² Valore predittivo negativo

Se confrontato con il metodo della coltura diretta (striscio diretto dei tamponi sulle piastre di agar cromogeniche selettive addizionate di cefoxitina, senza arricchimento del TSB e incubazione per 24–48 ore a 35 °C $\pm$ 2 °C), il saggio Xpert MRSA ha individuato il 94,3% dei campioni di analisi positivi per MRSA e il 93,2% dei campioni di analisi negativi per MRSA; il valore predittivo positivo era del 73,0% e il valore predittivo negativo del 98,8%.

Tabella 2b. Confronto tra il saggio Xpert MRSA e il metodo della coltura diretta

		Coltura diretta		
		+	-	
Xpert MRSA	+	165	61	226
	-	10	838	848
		175	899	1.074
				Concordanza positivi: 94,3%
				Concordanza negativi: 93,2%
				PPV ¹ : 73,0%
				NPV ² : 98,8%

¹ Valore predittivo positivo

² Valore predittivo negativo

Le tabelle seguenti mostrano le prestazioni del saggio Xpert MRSA e la prevalenza di MRSA nei diversi siti clinici rispetto ai metodi della coltura di riferimento e della coltura diretta.

Tabella 3a. Prestazioni del saggio Xpert MRSA per sito rispetto al metodo della coltura di riferimento

Sito	Prevalenza di MRSA ¹	Concordanza positivi (n) (IC del 95%) ²	Concordanza negativi (n) (IC del 95%) ³	Nr. risultati indeterminati
1	20,2% (78/387)	87,2% (n=78) (77,7-93,7%)	93,9% (n=309) (90,6-96,3%)	10
2	5,2% (3/58)	100,0% (n=3) (29,2-100,0%)	98,2% (n=55) (90,3-100,0%)	3
3	44,4% (12/27)	91,7% (n=12) (61,5-99,8%)	100,0% (n=15) (78,2-100,0%)	3
4	12,3% (20/162)	80,0% (n=20) (56,3-94,3%)	97,2% (n=142) (92,9-99,2%)	9
5	20,5% (46/224)	89,1% (n=46) (76,4-96,4%)	94,9% (n=178) (90,6-97,7%)	1
6	22,3% (42/188)	81,0% (n=42) (65,9-91,4%)	93,2% (n=146) (87,8-96,7%)	6
7	35,7% (10/28)	90,0% (n=10) (55,5-99,8%)	94,4% (n=18) (72,7-99,9%)	2
Totale	19,6% (211/1.074)	86,3% (n=211) (80,9-90,6%)	94,9% (n=863) (93,2-96,3%)	34

¹ Determinata dai risultati del metodo della coltura di riferimento

² Numero di positivi determinato con il metodo della coltura di riferimento

³ Numero di negativi determinato con il metodo della coltura di riferimento

Tabella 3b. Prestazioni del saggio Xpert MRSA per sito: confronto con il metodo della coltura diretta

Sito	Concordanza positivi	Concordanza negativi
1	95,4% (87,1-99,0%)	92,2% (88,8-94,9%)
2	100,0% (29,2-100,0%)	98,2% (90,3-100,0%)
3	91,7% (61,5-99,8%)	100,0% (78,2-100,0%)
4	81,3% (54,4-96,0%)	95,2% (90,4-98,1%)
5	94,9% (82,7-99,4%)	93,0% (88,3-96,2%)
6	97,1% (84,7-99,9%)	92,9% (87,6-96,4%)
7	100,0% (54,1-100,0%)	81,8% (59,7-94,8%)
Totale	94,3% (89,7-97,2%)	93,2% (91,4-94,8%)

Le tabelle seguenti mostrano le prestazioni del saggio Xpert MRSA, di un 2° test NAAT approvato dalla FDA e del metodo della coltura diretta, nei diversi siti, rispetto al metodo della coltura di riferimento.

Tabella 4a. Risultati del saggio Xpert MRSA, del metodo della coltura diretta e di un secondo test NAAT approvato dalla FDA con campioni di analisi positivi per MRSA secondo il metodo della coltura di riferimento

Concordanza positivi (IC del 95%)			
Sito	Xpert MRSA	2° test NAAT	Coltura diretta ¹
1	87,2% (77,7-93,7%)	80,8% (70,3-88,8%)	83,3% (73,2-90,8%)
2	100,0% (29,2-100,0%)	100,0% (29,2-100,0%)	100,0% (29,2-100,0%)
3	91,7% (61,5-99,8%)	83,3% (51,6-97,9%)	100,0% (73,5-100,0%)
4	80,0% (56,3-94,3%)	78,9% (54,4-93,9%)	80,0% (56,3-94,3%)
5	89,1% (76,4-96,4%)	89,1% (76,4-96,4%)	84,8% (71,1-93,7%)
6	81,0% (65,9-91,4%)	78,6% (63,2-89,7%)	81,0% (65,9-91,4%)
7	90,0% (55,5-99,7%)	100,0% (69,2-100,0%)	60,0% (26,2-87,8%)
Totale	86,3% (80,9-90,6%)	83,3% (77,6-88,1%)	82,9% (77,2-87,8%)

¹ Striscio diretto dei tamponi sulle piastre di agar cromogeniche selettive addizionate di cefoxitina e incubazione per 24-48 ore a 35 °C ± 2 °C

Tabella 4b. Risultati del saggio Xpert MRSA, del metodo della coltura diretta e di un secondo test NAAT approvato dalla FDA con campioni di analisi negativi per MRSA secondo il metodo della coltura di riferimento

Concordanza negativi (IC del 95%)			
Sito	Xpert MRSA	2° test NAAT	Coltura diretta¹
1	93,9% (90,6-96,3%)	92,2% (88,7-95,0%)	100,0% (98,8-100,0%)
2	98,2% (90,3-100,0%)	98,2% (90,3-100,0%)	100,0% (93,6-100,0%)
3	100,0% (78,2-100,0%)	100,0% (79,4-100,0%)	100,0% (79,4-100,0%)
4	97,2% (92,9-99,2%)	97,9% (93,9-99,6%)	100,0% (97,5-100,0%)
5	94,9% (90,6-97,7%)	93,8% (89,2-96,9%)	100,0% (97,9-100,0%)
6	93,2% (87,8-96,7%)	94,5% (89,5-97,6%)	100,0% (97,5-100,0%)
7	94,4% (72,7-99,9%)	94,4% (72,7-99,9%)	100,0% (81,5-100,0%)
Totale	94,9% (93,2-96,3%)	94,4% (92,7-95,9%)	100,0% (99,6-100,0%)

¹ Striscio diretto dei tamponi sulle piastre di agar cromogeniche selettive addizionate di cefoxitina e incubazione per 24-48 ore a 35 °C ± 2 °C

Specificità analitica

Nello studio sono state incluse colture provenienti da 51 ceppi dell'ATCC (American Type Culture Collection) e del NARSA (Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*) rappresentanti specie filogeneticamente correlate allo *S. aureus* e componenti della flora nasale commensale, oltre a 32 ceppi di stafilococchi meticillino-sensibili negativi alla coagulasi e 12 ceppi di stafilococchi meticillino-resistenti negativi alla coagulasi. Tre replicati di ciascun isolato sono stati testati con concentrazioni di $\approx 1 \times 10^6$ CFU/tampone. Nessuno degli isolati in questione è stato rilevato dal saggio. La specificità era del 100%.

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del saggio Xpert MRSA è stata determinata usando 6 ceppi di MRSA rappresentativi di sei tipi esototipi *SCC_{mec}* (I, II, III, IV, IVa e V). Le colture di questi ceppi sono state quantificate e poi diluite a concentrazioni comprese nel range da 10 a 1000 unità formanti colonia (CFU) per tampone. Tutte le diluizioni sono state testate in replicati di 4. Il limite di rilevamento ottenuto per ogni tipo o sottotipo testato mostra il numero minimo di CFU/tampone sulla cui base tutti e 4 i replicati sono stati segnalati come positivi. Il saggio Xpert MRSA Assay ha rilevato tutti i ceppi rappresentativi dei tipi I - V della cassetta *SCC_{mec}*.

Tabella 5. Rilevamento dei tipi *SCC_{mec}*

<i>SCC_{mec}</i>	(CFU/tampone)
Tipo I	10
Tipo II	10
Tipo III	10
Tipo V	10
Tipo IV	50
Tipo IVa	100

Sono stati condotti ulteriori studi con cellule di tipo II per determinare l'intervallo di confidenza al 95% per il limite di rilevamento analitico (LoD) del saggio. Il limite di rilevamento viene definito come il minor numero di unità MRSA formanti colonia (CFU) per tampone che possono essere riproducibilmente distinte dai campioni negativi con un livello di confidenza del 95%. I risultati indicano che il saggio Xpert MRSA genererà risultati positivi con una confidenza del 95% per i tamponi contenenti 80 CFU.

Riproducibilità

Un pannello di campioni di analisi con diverse concentrazioni di MRSA e *Staphylococcus epidermidis* meticillino-sensibile (negativo) sono stati testati in triplicato in 10 diversi giorni in ciascuno dei tre siti (4 campioni di analisi × 3 volte/giorno × 10 giorni × 3 siti). In ognuno dei 3 siti di test è stato usato un lotto di kit Xpert MRSA. I saggi Xpert MRSA Assay sono stati condotti in conformità con le procedure Xpert MRSA.

Tabella 6. Riepilogo dei risultati di riproducibilità

ID campione di analisi	MRSA CFU/tampone	MSSE CFU/tampone	Sito 1	Sito 2	Sito 3	Concordanza totale	% concordanza totale
Negativo	0	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/31 ^A	90/91	98,9%
Positivo basso	117	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	27/29 ^A	87/89	97,8%
Positivo	800	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/30	90/90	100,0%
Positivo alto	$2,6 \times 10^4$	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/30	90/90	100,0%
Concordanza totale			120/120	120/120	117/120	357/360	99,2%
% concordanza			100,0%	100,0%	97,5%		

^A Il saggio Xpert MRSA Assay è stato inavvertitamente eseguito su un ulteriore campione di analisi negativo e un campione positivo con valori meno bassi

Bibliografia

1. Mainous AG, Hueston WJ, Everett, CJ, Vanessa A. Diaz VA. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in the United States, 2001-2002. *An Family Medicine*. 2006;4(2):132-137.
2. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004;32:470-85.
3. Chaix C, Durand-Zileski I, Alberti C, Buisson B. Control of Endemic Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *JAMA* 1999;282(19):1745-51.
4. Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases* 2001;7(2) 323-6.
5. Salgado CD et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-analysis of Prevalence and Risk Factors. *CID* 2003;36:131.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).

Assistenza

Per ricevere assistenza, contattare Cepheid usando uno dei seguenti riferimenti di contatto. All'atto della chiamata o dell'invio dell'e-mail, accertarsi di disporre del numero di serie dello strumento e dell'ID del lotto di reagenti.

Nord America

Per ricevere assistenza tecnica, utilizzare uno dei seguenti riferimenti di contatto:

Tel.: 888.838.3222 opzione 2

E-mail: techsupport@cepheid.com

L'Assistenza Tecnica di Cepheid può essere contattata telefonicamente dal lunedì al venerdì dalle 5 alle 17 (fuso orario del Pacifico, UTC -8).

Unione Europea

Per ricevere assistenza tecnica, utilizzare uno dei seguenti riferimenti di contatto:

Tel.: +33.563.82.53.19

Fax: +33.563.82.53.01

E-mail: support@cepheideurope

Altre località

Contattare il rappresentante Cepheid di zona.

Tabella dei simboli

Simbolo	Significato
	Numero di catalogo
	Dispositivo medico per uso diagnostico <i>in vitro</i>
	Marchio CE – Conformità europea
	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
	Non riutilizzare
	Attenzione, consultare la documentazione allegata
	Produttore
	Contenuto sufficiente per <n> test
	Controllo
	Temperatura limite
	Rischio biologico



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
USA

Tel.: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192



Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francia

Tel.: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
E-mail: cepheid@cepheideurope



Português

Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*

Denominação exclusiva

Xpert® MRSA

Denominação comum ou habitual

Xpert MRSA Assay

Utilização prevista

O Cepheid Xpert MRSA Assay realizado no GeneXpert® Dx System (Xpert MRSA) é um teste qualitativo para diagnóstico *in vitro* concebido para a rápida detecção de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) a partir de zaragatoas nasais de doentes em risco de colonização nasal. O teste utiliza a reacção em cadeia da polimerase (PCR) automática em tempo real para detectar o ADN de MRSA. O Xpert MRSA Assay destina-se a ajudar na prevenção e controlo de infecções por MRSA em estabelecimentos de cuidados de saúde. O Xpert MRSA Assay não se destina ao diagnóstico de MRSA, nem à orientação ou à monitorização do tratamento de infecções por MRSA. Apenas são necessárias culturas concomitantes para colheita de organismos para tipagem epidemiológica ou testes de susceptibilidade suplementares.

Sumário e explicação

O *Staphylococcus aureus* (SA) é um importante agente patogénico nosocomial que provoca diversas doenças, incluindo endocardite, osteomielite, síndrome de choque tóxico, intoxicação alimentar, carbúnculos e furúnculos. No início da década de 1950, a aquisição e propagação de plasmídeos produtores de beta-lactamase prejudicou a eficácia da penicilina no tratamento de infecções por *S. aureus*. Em 1959, foi introduzida a meticilina, uma penicilina sintética. Por volta de 1960, foram identificadas estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina. Determinou-se que isto resultou da aquisição do gene *mecA* pelo *S. aureus*. Actualmente, nos EUA, o MRSA é responsável por aproximadamente 25% das infecções nosocomiais e os relatos de MRSA adquirido em comunidades estão a aumentar, resultando em morbilidade e mortalidade significativas. Na tentativa de limitar a disseminação destas infecções, estão a ser desenvolvidas e implementadas estratégias e políticas de controlo em estabelecimentos de saúde. O controlo do MRSA é um dos principais objectivos da maioria dos programas de controlo de infecções em hospitais. Actualmente, o método padrão para detectar MRSA é a cultura, que é um método muito trabalhoso e moroso.^{1,2,3,4,5} Um método mais rápido e sensível para a vigilância do MRSA representará uma definitiva vantagem para os programas de controlo de infecções.

Princípio do procedimento

O GeneXpert Dx System automatiza e integra a purificação de amostras, a amplificação de ácidos nucleicos e a detecção da sequência-alvo em amostras simples ou complexas, utilizando ensaios de PCR e RT-PCR em tempo real. O sistema consiste num instrumento, computador pessoal e software pré-carregado para realizar testes nas amostras colhidas e ver os resultados. O sistema exige a utilização de cartuchos descartáveis de utilização única GeneXpert que contêm os reagentes da PCR e onde decorre o processo da PCR. Dado que os cartuchos são independentes, a contaminação cruzada entre amostras é eliminada. Para uma descrição completa do sistema, consulte o *Manual do operador do GeneXpert Dx System*.

O Xpert MRSA Assay inclui reagentes para a detecção de MRSA, bem como um controlo do processamento da amostra (SPC) para controlar o processamento adequado das bactérias-alvo e para monitorizar a presença de inibidor(es) na reacção PCR. O controlo de verificação da sonda (PCC) verifica a reidratação dos reagentes, o enchimento do tubo de PCR no cartucho, a integridade da sonda e a estabilidade do fluoróforo.

Os iniciadores e as sondas no ensaio Xpert MRSA detectam uma sequência exclusiva para a presença de uma cassette inserida no cromossoma de *S. aureus*.

Reagentes e instrumentos

Material fornecido

▽ O Xpert MRSA (GXMRSA-100N-10) contém reagentes suficientes para o processamento de 10 amostras ou amostras de controlo de qualidade. O Xpert MRSA (GXMRSA-120) contém reagentes suficientes para o processamento de 120 amostras ou amostras de controlo de qualidade.

O kit contém o seguinte:

Cartuchos Xpert MRSA com tubos de reacção integrados	10	120
Esfera 1 (liofilizada)	1 por cartucho	1 por cartucho
Polimerase		
dNTP		
Seroalbumina bovina (BSA)		
Esfera 2 (liofilizada)	1 por cartucho	1 por cartucho
Iniciadores		
Sondas		
BSA		
Esfera 3 (liofilizada)	1 por cartucho	1 por cartucho
Controlo de processamento da amostra (SPC)		
~6000 esporos não-infecciosos de controlo de preparação da amostra		
Reagente 1 (hidróxido de sódio)	3,0 ml por cartucho	3,0 ml por cartucho
Reagente 2 (tampão Tris, EDTA e tensioactivos)	3,0 ml por cartucho	3,0 ml por cartucho
Bolsa de reagentes Xpert MRSA	1	1
Reagente de eluição (tiocianato de guanidina, tensioactivos)	10 × 1,5 ml por bolsa	125 × 1,5 ml por bolsa

Notas:

Estão disponíveis mediante pedido fichas de dados de segurança do material (MSDS) de todos os reagentes fornecidos neste ensaio através da assistência técnica da Cepheid, e estão disponíveis nos sítios da Cepheid (www.cepheid.com e www.cepheidinternational.com).

A seroalbumina bovina (BSA) neste produto foi produzida exclusivamente a partir de plasma bovino obtido nos EUA. O fabrico da BSA também é realizado nos EUA. Os animais não foram alimentados com nenhuma proteína de ruminantes ou outra proteína animal; os animais passaram em testes ante- e post-mortem. Durante o processamento, o material não foi misturado com outros materiais animais.

Conservação e manuseamento

-  Conserve os cartuchos e reagentes Xpert MRSA entre 2 e 28 °C.
- Não utilize reagentes ou cartuchos cujo prazo de validade tenha expirado.
- Não abra um cartucho até estar pronto para realizar o teste.
- Não utilize nenhuns reagentes que estejam turvos ou descolorados.

Materiais necessários mas não fornecidos

- GeneXpert Dx System (o número de catálogo varia consoante a configuração): instrumento GeneXpert, computador, lápis óptico para leitura de códigos de barras e manual do operador
- Impressora (Consulte o *Manual do operador do GeneXpert Dx System* para orientações sobre compatibilidade)
- Cepheid Sample Collection Device (referência 900-0370)
- Agitador de vórtice
- Pipetas de transferência estéreis, descartáveis
- Gaze estéril

Materiais disponíveis mas não fornecidos

KWIK-STIK™ da MicroBioLogics, n.º de catálogo 0158 MRSA como controlo positivo e n.º de catálogo 0371 MSSE (*Staphylococcus epidermidis* sensível à meticilina) como controlo negativo.

Avisos e precauções



- Trate todas as amostras biológicas, incluindo cartuchos usados, como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Dado que é frequentemente impossível saber quais as amostras biológicas que poderão ser infecciosas, todas deverão ser tratadas aplicando as precauções padrão. Orientações para o manuseamento de amostras estão disponíveis nos Centers for Disease Control and Prevention⁶ e no Clinical and Laboratory Standards Institute (anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards) dos EUA.⁷

- Siga os procedimentos de segurança da sua instituição quando trabalhar com químicos e manusear amostras biológicas.
- O Xpert MRSA Assay não fornece resultados de susceptibilidade. É necessário tempo adicional para cultura e para realizar testes de susceptibilidade.
- Não substitua os reagentes Xpert MRSA por outros reagentes.
- Não abra a tampa do cartucho Xpert MRSA, excepto ao adicionar a amostra.
- Não utilize um cartucho que tenha caído ou sido agitado depois de ter adicionado a amostra.
- Não utilize um cartucho que contenha um tubo de reacção danificado.



- Cada cartucho de utilização única Xpert MRSA é utilizado para processar um teste. Não reutilize cartuchos gastos.
- Consulte os técnicos de resíduos ambientais da sua instituição sobre a eliminação apropriada de cartuchos usados e reagentes não usados. Este material pode apresentar características de resíduos perigosos, conforme definidas pela EPA (agência federal de protecção ambiental dos EUA) na lei Resource Conservation and Recovery Act (RCRA), tendo requisitos de eliminação específicos. Verifique os regulamentos estatais e locais, uma vez que poderão diferir dos regulamentos federais relativos à eliminação. Instituições fora dos EUA deverão verificar os requisitos para eliminação de resíduos perigosos do respectivo país.



- Conserve o kit Xpert MRSA entre 2 e 28 °C.



- O reagente 1 contém hidróxido de sódio (pH > 12,5; risco R34 da UE), que é corrosivo para os olhos e a pele, exigindo a utilização de protecção dos olhos e da pele.



- O reagente de eluição contém tiocianato de guanidina (riscos R32 e 52/53 da UE), que é nocivo para os organismos aquáticos.

Colheita e transporte de amostras



Para obter uma amostra adequada, siga fielmente as instruções desta secção.

1. Abra o Cepheid Collection Device, destacando a embalagem exterior.
2. Peça ao doente para inclinar a cabeça para trás. Insira as zaragatoas secas aproximadamente 1 a 2 cm dentro de cada narina.
3. Rode as zaragatoas contra o interior da narina durante 3 segundos. Aplique uma ligeira pressão com um dedo no exterior do nariz para ajudar a assegurar um bom contacto entre a zaragatoa e o interior do nariz.
4. Utilizando as mesmas zaragatoas, repita para a segunda narina, tentando tocar apenas no interior do nariz.
5. Retire o tubo de transporte plástico. Remova a tampa do tubo e deite-a fora. Coloque as zaragatoas dentro do tubo de transporte plástico. As zaragatoas deverão ficar completamente dentro do tubo até ficarem em cima da esponja no fundo do tubo. Certifique-se de que a tampa vermelha está bem apertada.

Nota: As zaragatoas deverão estar sempre fixas à tampa vermelha.

6. Etiquete o tubo de transporte plástico com a ID do doente e envie-o para o laboratório.
7. Conserve as amostras de zaragatoa à temperatura ambiente (15 a 30 °C) se serão processadas dentro de 24 horas; caso contrário, conserve entre 2 e 8 °C. A amostra de zaragatoa ficará estável até 5 dias quando conservada entre 2 e 8 °C.

Procedimento

Preparar o cartucho

Importante: Inicie o teste dentro de 15 minutos após a amostra ter sido adicionada ao cartucho.

Nota: Utilize apenas uma das zaragatoas. A segunda zaragatoa é necessária para repetir o teste.

Para adicionar a amostra ao cartucho (Xpert MRSA):

1. Retire o cartucho e o reagente de eluição do kit.
2. Retire as zaragatoas do recipiente de transporte e depois retire uma zaragatoa da tampa vermelha.
3. Insira a zaragatoa no tubo contendo o reagente de eluição.

Nota: Utilize gaze estéril para minimizar os riscos de contaminação.

4. Segure na zaragatoa pela haste perto do bordo do tubo, levante a zaragatoa a alguns milímetros do fundo do tubo e empurre a haste contra o bordo do tubo para a quebrar. Certifique-se de que a zaragatoa é suficientemente curta para permitir que a tampa fique bem apertada.
5. Feche a tampa e coloque no agitador de vórtice na velocidade máxima durante 10 segundos.
6. Abra a tampa do cartucho. Utilizando uma pipeta de transferência estéril, transfira todos os conteúdos do reagente de eluição para a grande abertura em entalhe (item n.º 1 na Figura 1) do cartucho GeneXpert.
7. Feche a tampa do cartucho.

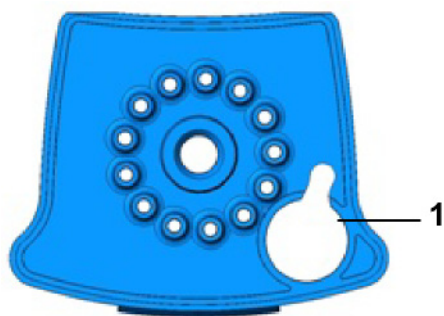


Figura 1. Cartucho Xpert MRSA (vista de cima).

Iniciar o teste

Importante: Antes de iniciar o teste, certifique-se de que a definição do ensaio Xpert MRSA foi importada para o software GeneXpert MRSA.

Esta secção discrimina os passos básicos para realizar o teste. Para obter instruções detalhadas, consulte o *Manual do operador do GeneXpert Dx System*.

1. Ligue o computador e depois ligue o instrumento GeneXpert Dx.
2. No ambiente de trabalho do Windows®, faça duplo clique no ícone de atalho GeneXpert Dx.
3. Inicie sessão no software do GeneXpert Dx System utilizando o seu nome de utilizador e palavra-passe.
4. Na janela do GeneXpert Dx System, clique em **Create Test** (Criar teste). Aparece a caixa de diálogo Scan Cartridge Barcode (Ler código de barras do cartucho).
5. Realize a leitura do código de barras do cartucho Xpert MRSA. Aparece a janela Create Test (Criar teste). Utilizando a informação do código de barras, o software preenche automaticamente as caixas para os seguintes campos: **Select Assay** (Selecionar ensaio), **Reagent Lot ID** (ID de lote do reagente), **Cartridge SN** (NS do cartucho) e **Expiration Date** (Prazo de validade).

6. Na caixa **Sample ID** (ID da amostra), realize a leitura da ID da amostra ou introduza-a. Certifique-se de que introduz a ID da amostra correcta. A ID da amostra é associada aos resultados do teste e é mostrada na janela View Results (Ver resultados) e em todos os relatórios.
7. Clique em **Start Test** (Iniciar teste). Introduza a sua palavra-passe na caixa de diálogo que aparece.
8. Abra a porta do módulo do instrumento com a luz verde intermitente e carregue o cartucho.
9. Feche a porta. O teste inicia-se e a luz verde pára de piscar. Quando o teste estiver concluído, a luz apaga-se.
10. Espere até que o sistema destranque o fecho da porta antes de abrir a porta do módulo e retirar o cartucho.
-  11. Elimine os cartuchos usados no recipiente apropriado para resíduos de amostras, de acordo com as práticas padrão da sua instituição.

Ver e imprimir os resultados

Para obter instruções detalhadas sobre como ver e imprimir os resultados, consulte o *Manual do operador GeneXpert Dx System*.

CONTROL Controlo de qualidade

Cada teste inclui um controlo de processamento da amostra (SPC) e um controlo de verificação da sonda (PCC).

Controlo de processamento da amostra (SPC)—Assegura que a amostra foi correctamente processada. O SPC contém esporos de *Bacillus globigii*, sob a forma de um bolo seco de esporos que está incluído em cada cartucho para verificar o processamento adequado do MRSA. O SPC verifica se ocorreu lise do MRSA, se os organismos estão presentes e se o processamento da amostra é adequado. Adicionalmente, este controlo detecta a inibição do ensaio de PCR em tempo real associada à amostra. O SPC deve ser positivo numa amostra negativa e pode ser negativo ou positivo numa amostra positiva. O SPC passa se corresponder aos critérios de aceitação validados.

Controlo de verificação da sonda (PCC)—Antes do início da reacção PCR, o GeneXpert Dx System mede o sinal de fluorescência das sondas para monitorizar a reidratação da esfera, o enchimento do tubo de reacção, a integridade da sonda e a estabilidade do fluoróforo. A verificação da sonda passa se corresponder aos critérios de aceitação atribuídos.

Controlos externos—Pode ser usado o KWIK-STIK™ (MicroBioLogics, n.º de catálogo 0158 MRSA como controlo positivo e n.º 0371 MSSE como controlo negativo) para formação, testes de proficiência e CQ externo do GeneXpert Dx System. Podem ser utilizados controlos externos de acordo com organizações de acreditação locais, estatais e federais, consoante aplicáveis. Siga o procedimento de controlo externo da MicroBioLogics descrito abaixo:

1. Rasgue a bolsa pelo entalhe e retire o KWIK-STIK.
2. Aperte o fundo da ampola na tampa para libertar o fluido hidratante.
3. Segure verticalmente e bata levemente com o dedo para facilitar o fluxo de fluido através da haste para o fundo da unidade que contém a microesfera.
4. Para facilitar a dissolução da microesfera de células liofilizadas, esmague a microesfera e aperte suavemente a câmara inferior.
5. Desmonte o KWIK-STIK para libertar a zaragatoa e insira-a no tubo que contém o reagente de eluição.
6. A zaragatoa KWIK-STIK está agora pronta para o teste Xpert MRSA.

Interpretação dos resultados

Os resultados são interpolados pelo GeneXpert Dx System através da medição de sinais fluorescentes e algoritmos de cálculo integrados, sendo mostrados na janela View Results (Ver resultados). Os resultados possíveis são:

MRSA POSITIVE (MRSA POSITIVO)

ADN-alvo de MRSA detectado (presumido positivo para colonização por MRSA).

- MRSA — POSITIVE (POSITIVO): O alvo de MRSA tem um Ct (limiar de ciclo) dentro do intervalo válido e um endpoint (ponto final) superior à definição mínima.
- SPC — NA (SPC – não aplicável): O SPC é ignorado, dado que a amplificação do MRSA poderá competir com este controlo.
- Probe Check – PASS (Verificação da sonda – PASSA): Todos os resultados de verificação da sonda passam.

MRSA NEGATIVE (MRSA NEGATIVO)

ADN-alvo de MRSA não detectado (presumido não colonizado por MRSA); o SPC cumpre os critérios de aceitação.

- MRSA — NEGATIVE (NEGATIVO): ADN-alvo de MRSA não detectado.
- SPC – PASS (SPC – PASSA): O SPC tem um Ct (limiar de ciclo) dentro do intervalo válido e um endpoint (ponto final) superior à definição mínima.
- Probe Check – PASS (Verificação da sonda – PASSA): Todos os resultados de verificação da sonda passam.

INVALID (INVÁLIDO)

A presença ou ausência de MRSA não pode ser determinada; repita o teste com uma zaragatoa extra. O SPC não cumpre os critérios de aceitação, a amostra não foi processada adequadamente ou a PCR está inibida.

- MRSA — INVALID (INVÁLIDO): A presença ou ausência de ADN de MRSA não pode ser determinada.
- SPC – FAIL (SPC – FALHA): o resultado do alvo de MRSA é negativo, o Ct (limiar de ciclo) do SPC não está dentro do intervalo válido e o endpoint (ponto final) é inferior à definição mínima.
- Probe Check – PASS (Verificação da sonda – PASSA): Todos os resultados de verificação da sonda passam.

ERROR (ERRO)

A presença ou ausência de MRSA não pode ser determinada; repita o teste com uma zaragatoa extra. O controlo de verificação da sonda falhou, provavelmente devido a um tubo de reacção que não foi enchido adequadamente, a um problema de integridade da sonda ou porque os limites de pressão máxima foram excedidos.

- MRSA — NO RESULT (SEM RESULTADO)
- SPC — NO RESULT (SPC – SEM RESULTADO)
- Probe Check – FAIL* (Verificação da sonda – FALHA); todos ou um dos resultados de verificação da sonda falharam.

* Se a verificação da sonda passou, o erro é causado pela falha de um dos componentes do sistema.

NO RESULT (SEM RESULTADO)

A presença ou ausência de MRSA não pode ser determinada; repita o teste com uma zaragatoa extra. Não foram recolhidos dados suficientes para produzir um resultado de teste (por exemplo, o operador parou um teste que estava em curso).

- MRSA — NO RESULT (SEM RESULTADO)
- SPC — NO RESULT (SPC – SEM RESULTADO)
- Probe Check — NA (Verificação da sonda – não aplicável)

Razões para repetir o ensaio

Repita o teste utilizando um novo cartucho e novo reagente de eluição (não reutilize o cartucho) ou inicie procedimentos alternativos se ocorrer um dos seguintes resultados de teste:

- Um resultado **INVALID** (INVÁLIDO) indica que os controlos SPC falharam. A amostra não foi processada adequadamente ou a PCR foi inibida.
- Um resultado **ERROR** (ERRO) indica que o controlo de verificação da sonda falhou e que o ensaio foi abortado, possivelmente devido ao tubo de reacção não ter sido adequadamente enchido, à detecção de um problema de integridade da sonda de reagente ou a terem sido excedidos os limites de pressão máxima.
- **NO RESULT** (SEM RESULTADO) indica que não foram recolhidos dados suficientes. Por exemplo, o operador parou um teste que estava em curso.

Limitações

O desempenho do Xpert MRSA Assay foi validado utilizando apenas os procedimentos detalhados neste folheto informativo. Modificações a estes procedimentos poderão alterar o desempenho do teste. Os resultados do Xpert MRSA Assay deverão ser interpretados em conjunção com outros dados laboratoriais e clínicos de que o médico disponha.

Resultados de teste incorrectos poderão ser originados por colheita de amostras inadequada, não seguimento dos procedimentos recomendados para recolha, manuseamento ou conservação de amostras, erro técnico, troca de amostras ou porque o número de organismos da amostra não é detectado pelo teste. É necessária uma cuidadosa conformidade com as instruções deste folheto para evitar resultados incorrectos.

Dado que a detecção de MRSA depende do número de organismos presentes na amostra, resultados fiáveis dependem da colheita, manuseamento e conservação de amostras adequados.

Voltar a processar o Xpert MRSA quando os resultados são **INVALID** (INVÁLIDO), **ERROR** (ERRO) e **NO RESULT** (SEM RESULTADO) dependerá das práticas e políticas de cada instalação. Deverão estar disponíveis procedimentos alternativos (por ex., cultura utilizando placas de ágar selectivas com ou sem incubação durante uma noite num meio líquido de enriquecimento selectivo). Para cultura, as restantes amostras de zaragatoa deverão ser colocadas em sistemas de transporte adequados e a cultura deverá ser efectuada dentro de 4 dias.

Um resultado de teste positivo não indica necessariamente a presença de organismo viável. Presume-se, no entanto, a presença de MRSA.

Os testes com o ensaio Xpert MRSA deverão ser utilizados como adjuvantes a outros métodos disponíveis.

Os resultados dos testes poderão ser também afectados por terapia antibiótica concomitante. Portanto, o sucesso ou o fracasso da terapia não podem ser avaliados utilizando este teste, porque o ADN poderá persistir após terapia antimicrobiana.

Mutações ou polimorfismos nas regiões de ligação do iniciador (primer) ou da sonda poderão afectar a detecção de variantes de MRSA novas ou desconhecidas, originando um resultado falso negativo.

Substâncias interferentes

Substâncias potencialmente interferentes avaliadas incluem sangue, muco e sprays nasais utilizados para aliviar a congestão, secura ou irritação nasal. A presença destas substâncias não inibiu significativamente a PCR e não originou resultados inválidos ou incorrectos.

No estudo de investigação do Xpert MRSA Assay foram relatadas potenciais substâncias interferentes (sangue, muco ou ambos) em 45 de 1077 (4,2%) amostras de zaragatoa nasal. Das 31 amostras que apresentaram um resultado equívoco no teste inicial, três continham muco e uma continha sangue na zaragatoa. Três das quatro amostras apresentaram um resultado na repetição do teste, enquanto uma que continha muco permaneceu indeterminada.

Valores esperados

No estudo clínico do Xpert MRSA, foi recolhido um total de 1077 amostras nasais de 1077 sujeitos em 7 locais participantes nos EUA. A população do estudo foi agrupada em sujeitos em lares ou instalações de estadia prolongada, hospitalizados durante mais de 3 dias, hospitalizados durante 3 ou menos dias, clínica de cuidados ambulatoriais e profissionais e outros. O número e a percentagem de casos positivos e negativos em relação ao método de cultura de referência são calculados e apresentados na tabela abaixo.

Tabela 1. Valores de MRSA esperados para os estudos das diferentes populações

Grupo	N positivo (%)	N negativo (%)	Total (%) ¹
Lares, instalações de cuidados de longa duração e de estadia prolongada	62 (25,5)	181 (74,5)	243 (22,6)
Hospitalizados > 3 dias	61 (23,0)	204 (77,0)	265 (24,7)
Hospitalizados = 3 dias	29 (13,1)	193 (86,9)	222 (20,7)
Clínica de cuidados ambulatoriais	46 (17,7)	214 (82,3)	260 (24,2)
Profissionais e outros	11 (12,9)	74 (87,1)	85 (7,9)
Total	209 (19,4)	866 (80,6)	1075

¹ Desconhecem-se as datas de admissão de dois sujeitos hospitalizados com cultura positiva.

Características de desempenho

Desempenho clínico

As características de desempenho do Xpert MRSA Assay foram determinadas num estudo multicêntrico de investigação prospectiva em sete instituições, comparando o ensaio MRSA no GeneXpert System (Xpert MRSA Assay) com um segundo teste de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT) aprovado pela FDA e cultura enriquecida, o método de cultura mais sensível. Os sujeitos incluíram indivíduos e profissionais médicos em risco de colonização nasal. Cada sujeito foi inscrito no estudo apenas uma vez. A recolha de zaragatoa nasal estava contra-indicada em sujeitos que tivessem recebido antibióticos sistémicos ou nasais tópicos num período entre 48 horas e uma semana antes da inscrição no estudo e com idade inferior a 2 anos, tendo estes sujeitos sido excluídos do estudo. Só foram inscritos aqueles sujeitos em conformidade com os critérios de inclusão e exclusão.

Foram recolhidas zaragatoas nasais de cada sujeito. Uma zaragatoa foi testada pelo Xpert MRSA Assay e outra pelo segundo teste de NAAT aprovado pela FDA. Os dois tipos de testes de NAAT foram realizados em cada instituição participante e uma zaragatoa adicional foi enviado para um laboratório central para teste de cultura.

No laboratório central, foi feita uma cultura em riscas da zaragatoa numa placa de ágar cromogénica selectiva com cefoxitina e a placa foi incubada durante 24 a 48 horas a 35 ± 2 °C. A zaragatoa foi transferida para meio líquido de tripticase de soja (TSB) com 6,5% de cloreto de sódio, incubado durante 18 a 24 horas a 35 ± 2 °C. Se a cultura por riscas directa era negativa às 24 horas, o TSB enriquecido foi cultivado em risca noutra placa de ágar cromogénica com cefoxitina, incubada durante 24 a 48 horas a 35 ± 2 °C. A confirmação de colónias presumivelmente positivas em cada método de cultura foi realizada com coagulase em tubo e coloração de Gram.

O desempenho do Xpert MRSA Assay e do segundo teste NAAT aprovado pela FDA foi calculado em relação aos resultados de cultura do laboratório central (cultura de referência).

Resultados globais

Foi testado um total de 1077 sujeitos elegíveis para MRSA (uma amostra por doente) pelo Xpert MRSA e por um 2.º teste de NAAT aprovado pela FDA e cultura. O Xpert MRSA identificou 86,3% das amostras como positivas para MRSA e 94,9% das amostras como negativas para MRSA em relação ao método de cultura de referência. Para os sujeitos testados, o valor preditivo positivo foi de 80,5% e o valor preditivo negativo foi de 96,6%.

Tabela 2a. Comparação do Xpert MRSA com o método de cultura de referência

		Cultura			
		+	-		
Xpert MRSA	+	182	44	226	Concordância positiva: 86,3%
	-	29	819	848	Concordância negativa: 94,9%
		211	863	1074*	VPP ¹ : 80,5%
					VPN ² : 96,6%

* Três amostras não apresentaram resultados Xpert em duas tentativas

¹ Valor preditivo positivo

² Valor preditivo negativo

Quando comparado com o método de cultura directa (zaragatoas directamente cultivadas em risca em placas de ágar cromogénicas selectivas com cefoxitina sem enriquecimento TSB e incubadas durante 24 a 48 horas a 35 °C ± 2 °C), o Xpert MRSA identificou 94,3% das amostras positivas para MRSA e 93,2% das amostras negativas para MRSA; o valor preditivo positivo foi de 73,0% e o valor preditivo negativo foi de 98,8%.

Tabela 2b. Comparação do Xpert MRSA com o método de cultura directa

		Cultura directa			
		+	-		
Xpert MRSA	+	165	61	226	Concordância positiva: 94,3%
	-	10	838	848	Concordância negativa: 93,2%
		175	899	1074	VPP ¹ : 73,0%
					VPN ² : 98,8%

¹ Valor preditivo positivo

² Valor preditivo negativo

As tabelas seguintes mostram o desempenho do Xpert MRSA e a prevalência de MRSA em cada local clínico, comparado com os métodos de cultura de referência e cultura directa.

Tabela 3a. Comparação do Xpert MRSA por local com o método de cultura de referência

Local	Prevalência de MRSA¹	Concordância positiva (n) (IC de 95%)²	Concordância negativa (n) (IC de 95%)³	N.º de resultados indeterminados
1	20,2% (78/387)	87,2% (n=78) (77,7-93,7%)	93,9% (n=309) (90,6-96,3%)	10
2	5,2% (3/58)	100,0% (n=3) (29,2-100,0%)	98,2% (n=55) (90,3-100,0%)	3
3	44,4% (12/27)	91,7% (n=12) (61,5-99,8%)	100,0% (n=15) (78,2-100,0%)	3
4	12,3% (20/162)	80,0% (n=20) (56,3-94,3%)	97,2% (n=142) (92,9-99,2%)	9
5	20,5% (46/224)	89,1% (n=46) (76,4-96,4%)	94,9% (n=178) (90,6-97,7%)	1
6	22,3% (42/188)	81,0% (n=42) (65,9-91,4%)	93,2% (n=146) (87,8-96,7%)	6
7	35,7% (10/28)	90,0% (n=10) (55,5-99,8%)	94,4% (n=18) (72,7-99,9%)	2
Total	19,6% (211/1074)	86,3% (n=211) (80,9-90,6%)	94,9% (n=863) (93,2-96,3%)	34

¹ Determinada com resultados obtidos pelo método de cultura de referência

² Número de positivos determinado pelo método de cultura de referência

³ Número de negativos determinado pelo método de cultura de referência

Tabela 3b. Desempenho do Xpert MRSA por local – comparação com o método de cultura directa

Local	Concordância positiva	Concordância negativa
1	95,4% (87,1-99,0%)	92,2% (88,8-94,9%)
2	100,0% (29,2-100,0%)	98,2% (90,3-100,0%)
3	91,7% (61,5-99,8%)	100,0% (78,2-100,0%)
4	81,3% (54,4-96,0%)	95,2% (90,4-98,1%)
5	94,9% (82,7-99,4%)	93,0% (88,3-96,2%)
6	97,1% (84,7-99,9%)	92,9% (87,6-96,4%)
7	100,0% (54,1-100,0%)	81,8% (59,7-94,8%)
Total	94,3% (89,7-97,2%)	93,2% (91,4-94,8%)

São apresentados nas tabelas abaixo os desempenhos do Xpert MRSA, do 2.º NAAT aprovado pela FDA e do método de cultura directa de locais individuais em relação ao método de cultura de referência.

Tabela 4a. Resultados do Xpert MRSA, método de cultura directa e segundo teste NAAT aprovado pela FDA em amostras positivas para MRSA pelo método de cultura de referência

Concordância positiva (IC de 95%)			
Local	Xpert MRSA	2.º NAAT	Cultura directa ¹
1	87,2% (77,7-93,7%)	80,8% (70,3-88,8%)	83,3% (73,2-90,8%)
2	100,0% (29,2-100,0%)	100,0% (29,2-100,0%)	100,0% (29,2-100,0%)
3	91,7% (61,5-99,8%)	83,3% (51,6-97,9%)	100,0% (73,5-100,0%)
4	80,0% (56,3-94,3%)	78,9% (54,4-93,9%)	80,0% (56,3-94,3%)
5	89,1% (76,4-96,4%)	89,1% (76,4-96,4%)	84,8% (71,1-93,7%)
6	81,0% (65,9-91,4%)	78,6% (63,2-89,7%)	81,0% (65,9-91,4%)
7	90,0% (55,5-99,7%)	100,0% (69,2-100,0%)	60,0% (26,2-87,8%)
Total	86,3% (80,9-90,6%)	83,3% (77,6-88,1%)	82,9% (77,2-87,8%)

¹ Zaragatoas directamente cultivadas em risca em placas de ágar cromogénicas selectivas com cefoxitina e incubadas durante 24 a 48 horas a 35 °C ± 2 °C.

Tabela 4b. Resultados do Xpert MRSA, método de cultura directa e segundo teste NAAT aprovado pela FDA em amostras negativas para MRSA pelo método de cultura de referência

Concordância negativa (IC de 95%)			
Local	Xpert MRSA	2.º NAAT	Cultura directa¹
1	93,9% (90,6-96,3%)	92,2% (88,7-95,0%)	100,0% (98,8-100,0%)
2	98,2% (90,3-100,0%)	98,2% (90,3-100,0%)	100,0% (93,6-100,0%)
3	100,0% (78,2-100,0%)	100,0% (79,4-100,0%)	100,0% (79,4-100,0%)
4	97,2% (92,9-99,2%)	97,9% (93,9-99,6%)	100,0% (97,5-100,0%)
5	94,9% (90,6-97,7%)	93,8% (89,2-96,9%)	100,0% (97,9-100,0%)
6	93,2% (87,8-96,7%)	94,5% (89,5-97,6%)	100,0% (97,5-100,0%)
7	94,4% (72,7-99,9%)	94,4% (72,7-99,9%)	100,0% (81,5-100,0%)
Total	94,9% (93,2-96,3%)	94,4% (92,7-95,9%)	100,0% (99,6-100,0%)

¹ Zaragatoas directamente cultivadas em risca em placas de ágar cromogénicas selectivas com cefoxitina e incubadas durante 24 a 48 horas a 35 °C ± 2 °C.

Especificidade analítica

Foram testadas culturas de 51 estirpes representando espécies filogeneticamente relacionadas com o *S. aureus* e membros da flora nasal comensal da American Type Culture Collection (ATCC) e da Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA), 32 estirpes de estafilococos sensíveis à metilina e coagulase-negativos e 12 estirpes de estafilococos resistentes à metilina e coagulase-negativos. Foram testadas três réplicas de cada isolado a $\approx 1 \times 10^6$ UFC/zaragatoa. Nenhum destes isolados foi detectado pelo ensaio. A especificidade foi de 100%.

Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do Xpert MRSA foi determinada utilizando 6 estirpes de MRSA representando os 6 tipos e subtipos de SCC_{mec} (I, II, III, IV, IVa e V). As culturas destas estirpes foram quantificadas e depois diluídas em valores abrangendo o intervalo de 10 a 1000 unidades formadoras de colónias (UFC) por zaragatoa. Todas as diluições foram testadas em réplicas de 4. O limite de detecção obtido para cada tipo ou subtipo testado mostra o número mais baixo de UFC/zaragatoa em relação ao qual as 4 réplicas foram indicadas como positivas. Todas as estirpes representando os tipos de cassette de SCC_{mec} I a V foram detectadas pelo Xpert MRSA Assay.

Tabela 5. Detecção do tipo SCC_{mec}

SCC _{mec}	(UFC/ zaragatoa)
tipo I	10
tipo II	10
tipo III	10
tipo V	10
tipo IV	50
tipo IVa	100

Foram realizados estudos adicionais utilizando células de tipo II para determinar o intervalo de confiança de 95% para o limite de detecção (LoD) analítico deste ensaio. O limite de detecção é definido como o número mais baixo de unidades formadoras de colónias (UFC) de MRSA por zaragatoa que pode ser continuamente reproduzido e distinguido de amostras negativas com 95% de confiança. Os resultados indicam que o Xpert MRSA produz um resultado positivo com 95% de confiança para uma zaragatoa contendo 80 UFC.

Reprodutibilidade

Foi testado um painel de amostras com concentrações variáveis de MRSA e *Staphylococcus epidermidis* sensível à meticilina (negativo) em triplicado em 10 dias diferentes em cada um dos três locais (4 amostras × 3 vezes/dia × 10 dias × 3 locais). Foi utilizado um lote do kit Xpert MRSA em cada um dos 3 locais de teste. Os ensaios Xpert MRSA foram realizados de acordo com o procedimento Xpert MRSA.

Tabela 6. Sumário dos resultados de reprodutibilidade

ID da amostra	MRSA em UFC/ zaragatoa	MSSE UFC/ zaragatoa	Local 1	Local 2	Local 3	Concordância total	% de concordância total
Negativo	0	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/31 ^A	90/91	98,9%
Positivo fraco	117	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	27/29 ^A	87/89	97,8%
Positivo	800	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/30	90/90	100,0%
Positivo forte	$2,6 \times 10^4$	$2,6 \times 10^6$	30/30	30/30	30/30	90/90	100,0%
Concordância total			120/120	120/120	117/120	357/360	99,2%
% de concordância			100,0%	100,0%	97,5%		

^A O ensaio Xpert MRSA foi realizado inadvertidamente numa amostra negativa adicional e em uma amostra positiva menos fraca.

Referências

1. Mainous AG, Hueston WJ, Everett, CJ, Vanessa A. Diaz VA. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in the United States, 2001-2002. *An Family Medicine*. 2006;4(2):132-137.
2. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004;32:470-85.
3. Chaix C, Durand-Zileski I, Alberti C, Buisson B. Control of Endemic Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *JAMA* 1999;282(19):1745-51.
4. Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases* 2001;7(2) 323-6.
5. Salgado CD et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-analysis of Prevalence and Risk Factors. *CID* 2003;36:131.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).

Assistência

Para assistência, contacte a Cepheid utilizando um dos seguintes contactos. Certifique-se de que fornece o número de série do instrumento e a ID de lote do reagente quando telefonar ou enviar e-mail.

América do Norte

Para assistência técnica, utilize os seguintes contactos:

Tel.: 888.838.3222 Opção 2

E-mail: techsupport@cepheid.com

Pode contactar a assistência técnica da Cepheid por telefone de segunda-feira a sexta-feira, entre as 5 h e as 17 h (hora do Pacífico).

União Europeia

Para assistência técnica, utilize os seguintes contactos:

Tel.: +33.563.82.53.19

Fax: +33.563.82.53.01

E-mail: support@cepheideurope

Outros locais

Contacte o seu representante local da Cepheid.

Tabela de símbolos

Símbolo	Significado
	Número de catálogo
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Marcação CE – Conformidade Europeia
	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Não reutilizar
	Atenção, consultar o documento acompanhante
	Fabricante
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Controlo
	Limites de temperatura
	Risco biológico



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
EUA

Telefone: +1.408.541.4191

Fax: +1.408.541.4192



Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
França

Tel.: +33.563.82.53.00

Fax: +33.563.82.53.01

E-mail: cepheid@cepheideurope

