GeneXpert®
Powered By CEPHEID INNOVATION

Xpert® MRSA/SA Blood Culture Assay

REF GXMRSA/SA-BC-CE-10

Cepheid.

In Vitro Diagnostic Medical Device IVD

CE 300-5441 Rev. K, February 2012

Copyright 2012 © Cepheid, Cepheid®, the Cepheid logo, GeneXpert®, and Xpert® are trademarks of Cepheid.

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 AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Sweden

English

In Vitro Diagnostic Medical Device

Proprietary Name

Xpert® MRSA/SA Blood Culture Assay

Common or Usual Name

MRSA/SA Blood Culture Assay

Intended Use

The Cepheid Xpert MRSA/SA Assay performed in the GeneXpert® Dx System is a qualitative *in vitro* diagnostic test designed for rapid and simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* (SA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from patients with positive blood cultures. The test utilizes automated real-time polymerase chain reaction (PCR) to detect MRSA/SA DNA. The Xpert MRSA/SA Assay is intended to aid in the detection and identification of MRSA/SA from positive blood culture bottles. The Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay is indicated for use in conjunction with other laboratory tests, such as culture, and clinical data available to the clinician as an aid in the detection of MRSA/SA from patient positive blood cultures. Subculturing of positive blood cultures is necessary to recover organisms for susceptibility testing or for epidemiological typing. The Cepheid Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay is not intended to monitor treatment for MRSA/SA infections.

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 detection of MRSA and SA from positive Blood Culture Bottles will represent a definite advantage for patient management and the use of appropriate antibiotics for treatment.

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 and viewing the results. The system requires the use of single-use disposable 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*.

The Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay includes reagents for the detection of MRSA and SA 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 dye stability.

The primers and probes in the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay detect proprietary sequences for the staphylococcal protein A (*spa*), the gene for methicillin/oxacillin resistance (*mecA*), and the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) inserted into the SA chromosomal *attB* site.

Reagents and Instruments

Material Provided

The Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay kit contains sufficient reagents to process 10 specimens or quality control samples. The kit contains the following:

Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay Cartridges with integrated reaction tubes	**10**
Bead 1, Bead 2, and Bead 3 (freeze-dried)	**1 per cartridge**
Reagent 1	**2.8 ml per cartridge**
Reagent 2 (Sodium Hydroxide)	**3.2 ml per cartridge**
Xpert MRSA/SA BC Assay Elution Reagent	
Elution Reagent (Guanidinium thiocyanate)	**1 x 2.0 mL per pouch**
Disposable Small Transfer Pipettes	**12**
CD	**1 per kit**

Assay Definition File (ADF)

Instructions to import ADF into GX software

Package Insert

Notes:

- Safety Data Sheets (SDS) are available at www.cepheid.com/tests-and-reagents/literature/msds or www.cepheidinternational.com/tests-and-reagents/literature/msds.
- The bovine serum albumin (BSA) in the beads within 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/SA Blood Culture Assay 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.
- Use the cartridge and reagents within 30 minutes after opening the cartridge lid.
- 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 the *GeneXpert Dx System Operator Manual* for compatibility guidelines)
- Vortex mixer
- Disposable, sterile transfer pipettes

Materials Available but Not Provided

KWIK-STIKs™ from MicroBiologics catalog #0158MRSA and catalog #0360MSSA as positive controls and #0371MSSE (methicillin-sensitive *Staphylococcus epidermidis*) 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 Prevention[6] 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/SA Blood Culture Assay does not provide susceptibility results. Additional time is required to culture and perform susceptibility testing.
- Do not substitute Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay reagent with other reagents.
- Do not open the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay cartridge lid except when adding sample and reagent or performing a retest.
- Do not use a cartridge that has been dropped or shaken after you have added the sample and reagent.
- Do not use a cartridge that has a damaged reaction tube.
- Each single-use Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay 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 hazardous waste disposal requirements.
- Store the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay kit at 2 – 28°C.
- Do not open a cartridge package until you are ready to perform testing.
- Elution Reagent contains guanidinium thiocyanate (H402, EUH301), which is harmful to aquatic life and contact with acid liberates toxic gas.
- Reagent 2 contains sodium hydroxide (pH > 12.5); (H314) which is corrosive to eyes and skin requiring eye and skin protection.
- The following Blood culture media can be used in Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay:
  - BACTEC™ PEDS PLUS™/F Medium
  - BACTEC™ Plus Aerobic/F Medium
  - BACTEC™ Plus Anaerobic/F Medium
  - BACTEC™ Standard Anaerobic/F Medium
  - BACTEC™ Standard/10 Aerobic/F Medium
  - BACTEC™ LYTIC/10 Anaerobic/F Culture Vials
  - bioMérieux BacT/ALERT SA standard aerobic
  - bioMérieux BacT/ALERT SN standard anaerobic
  - VersaTREK REDOX 1® (aerobic)
  - VersaTREK REDOX 2® (anaerobic)
- Blood culture media containing activated charcoal cannot be used with the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay.
- Test only Blood Culture Bottles that are positive for microbial growth with the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay.

Specimen Collection, Transport and Storage

1. Upon positivity determination, remove blood culture bottles from incubation. A Gram stain should be performed from the positive blood culture following standard laboratory procedure. If you cannot remove the blood culture bottle from the instrument when it is first detected as positive, please remove it at your earliest convenience.
2. For positive blood culture bottles revealing Gram positive cocci in clusters (GPCC) or single gram positive cocci (GPC) by Gram Stain, remove a 1 mL aliquot of the well-mixed broth and label with Sample ID.

Note: The results of blood cultures are critical to patient care. Please follow established guidelines and policies of your laboratory/institution for reporting positive blood culture results (verbal, written or electronic) to healthcare providers.

3. If not testing with the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay immediately, store the aliquot at 2 – 8 °C within 30 minutes of removal from the blood culture bottle. The positive blood culture aliquot should be tested by Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay within 4 hours after removal from the positive bottle.

Procedure

Preparing the Cartridge

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

To add the sample and reagents into the cartridge:

1. Remove the cartridge and reagents from the package.
2. Using the Small Transfer Pipette, transfer one drop of positive blood culture (50 µL) into the Elution Reagent.
3. Close the Elution vial lid and vortex at high speed for 10 seconds.
4. Open the cartridge lid. Using a sterile transfer pipette, transfer the entire contents of the Elution Reagent to the "S" chamber of the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay cartridge.
5. Close the cartridge lid.

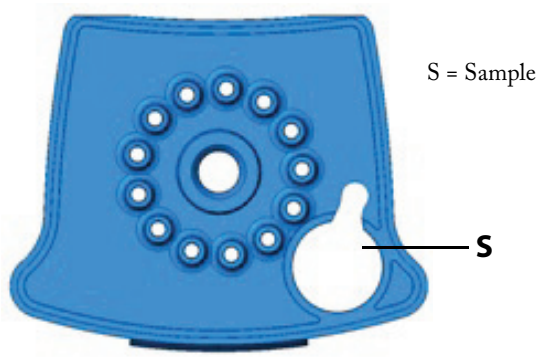

Figure 1. MRSA/SA Blood Culture Assay cartridge (top view)

Starting the Test

Important: Before you start the test, make sure the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay definition file is imported into the 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 GeneXpert Dx instrument and then turn on the computer. The GeneXpert software will launch automatically.
2. Log on to the GeneXpert Dx System software using your user name and password.
3. In the **GeneXpert Dx System** window, click **Create Test**. The **Scan Cartridge Barcode** dialog box appears.
4. Scan the barcode on the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay 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.
5. 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.
6. Click **Start Test**. In the dialog box that appears, type your password.
7. Open the instrument module door with the blinking green light and load the cartridge.
8. Close the door. The test starts and the green light stops blinking. When the test is finished, the light turns off.
9. Wait until the system releases the door lock before opening the module door and removing the cartridge.
10. The used cartridges should be disposed 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 Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay sample. The SPC verifies that lysis of *Staphylococcus aureus* 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 dye stability. Probe Check passes if it meets the assigned acceptance criteria.

- External controls — KWIK-STIKs™ (MicroBioLogics, catalog #0158MRSA and catalog #0360SA as positive controls and #0371MSSE 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 (black cap).
  6. The KWIK-STIK swab is now ready for Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay testing.

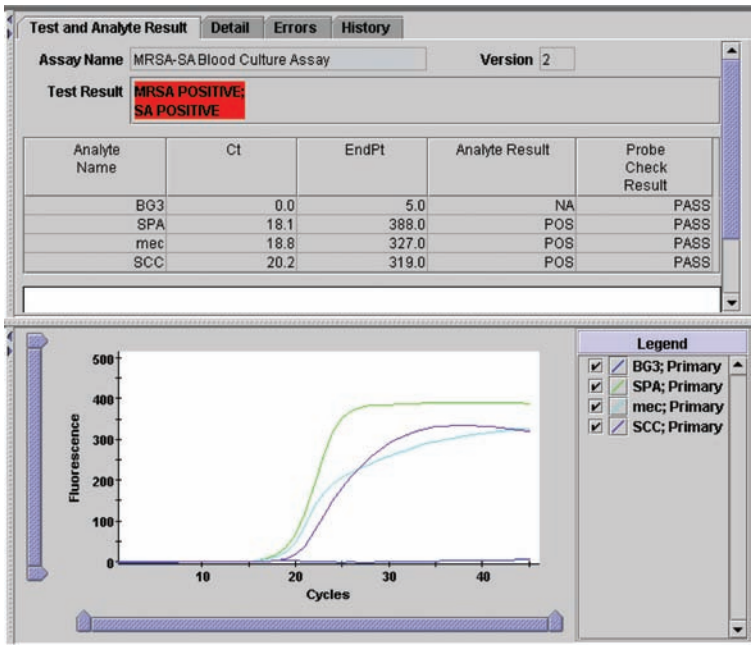

Figure 2. An example of a positive result

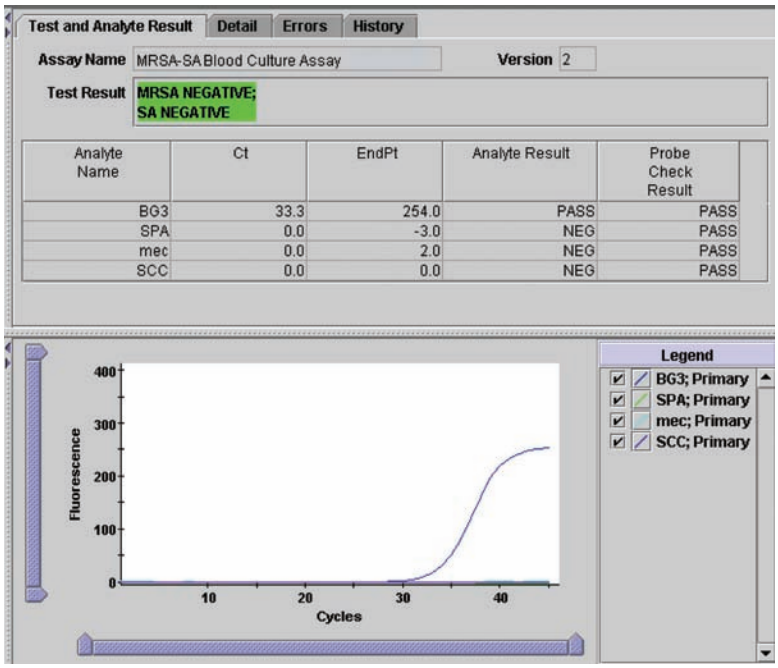

Figure 3. An example of a negative result

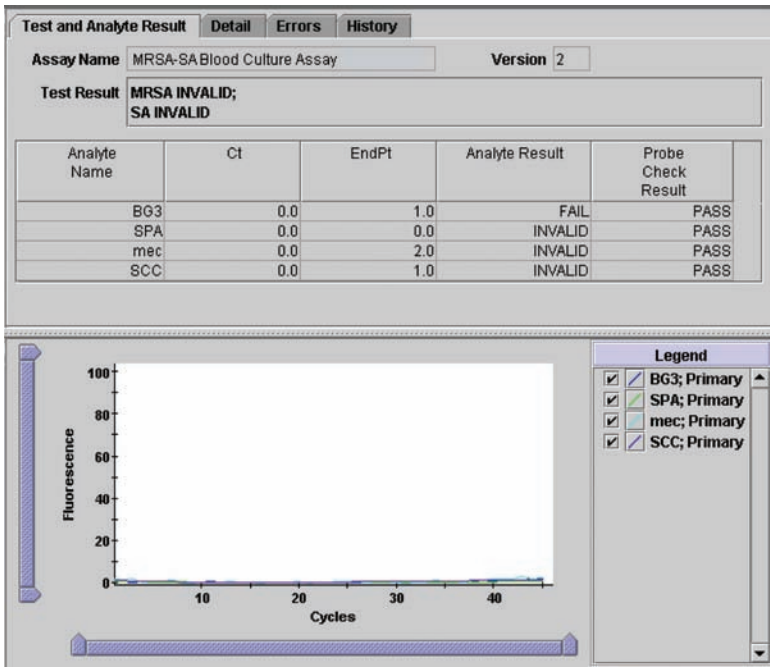

Figure 4. An example of an invalid result

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/SA POSITIVE

MRSA target DNA sequences are detected/SA target DNA sequence is detected.

- MRSA POSITIVE — all MRSA targets have a Ct within the valid range and endpoint above the minimum setting.
- SPC — NA (not applicable); SPC is ignored because MRSA amplification may compete with this control.
- Probe Check — PASS; all probe check results pass.

MRSA NEGATIVE/SA POSITIVE

MRSA target DNA sequences are not detected/SA target DNA sequence is detected.

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

MRSA NEGATIVE/SA NEGATIVE

Staphylococcus aureus target DNA sequence is not detected. SPC meets acceptance criteria.

- NEGATIVE —*Staphylococcus aureus* 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/SA target sequences cannot be determined, repeat test with new sample. SPC does not meet acceptance criteria, the sample was not properly processed, or PCR was inhibited.

- INVALID — Presence or absence of *Staphylococcus aureus* DNA cannot be determined.
- SPC-FAIL — SPC 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/SA cannot be determined, repeat test with new sample. 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
- SA — NO RESULT
- SPC — NO RESULT
- Probe Check — FAIL*; one or more 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/SA cannot be determined, repeat test with new sample. Insufficient data were collected to produce a test result. For example, this can occur if the operator stopped a test that was in progress.

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

Reasons to Repeat Assay

If any of the test results mentioned below occur, repeat the test using a new cartridge (do not re-use the cartridge). Perform the retest procedure within 3 hours of an indeterminate result.

- An INVALID result indicates that the control 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. To perform a retest:
  1. Transfer remaining contents from Chamber "S" to a new Elution Reagent.
  2. Vortex and add the entire contents of the Elution Reagent to Chamber "S" of the new MRSA/SA Blood Culture Assay cartridge.
  3. Close the lid and start new test.

Limitations

- The performance of the Xpert MRSA/SA Blood Culture 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/SA Blood Culture Assay should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data available to the clinician.
- Blood culture media containing activated charcoal cannot be used with the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay.
- The Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay may generate false negative MRSA results when testing borderline oxacillin resistant *S. aureus* (BORSA). The mechanism of oxacillin resistance in BORSA strains is due to an increased production of B-lactamases, not the *mecA* gene. BORSA with oxacillin MICs of 4-8 µg/mL are considered borderline resistant but, would be reported as MRSA negative by the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay. BORSA strains are rare in the United States.
- The Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay may generate false negative MRSA results when testing modified *S. aureus* (MOD-SA). The mechanism of oxacillin resistance in MOD-SA strains is due to changes in affinity of penicillin binding proteins for oxacillin, not the *mecA* gene. MOD-SA with oxacillin MICs of 4-8 µg/mL are considered borderline resistant but, would be reported as MRSA negative by the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay. MOD-SA strains are rare in the United States.
- Erroneous test results might occur from improper specimen collection, failure to follow the recommended sample collection, handling and storage procedures, technical error, sample mix-up, or because the number of organisms in the specimen is too low to be detected by the test. Careful compliance with the instructions in this insert is necessary to avoid erroneous results.
- Because the detection of MRSA and SA is dependent on the number of organisms present in the sample, reliable results are dependent on proper specimen collection, handling, and storage.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. It is however, presumptive for the presence of MRSA or SA.
- Testing with the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay should be used as an adjunct to other methods available.
- Mutations or polymorphism in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown MRSA variants resulting in a false negative result.
- In a mixed culture containing both MRSA and SA, the LoD of MRSA is variable when extremely high concentrations of SA are present. Competition from SA was observed at a MRSA:SA ratio of $1:1\times10^6$.
- The Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay will generate a false positive MRSA result when testing a mixed infection blood culture specimen containing both methicillin-resistant coagulase negative *Staphylococcus* (MRCNS) and empty cassette methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (SA).
- As with all PCR based *in vitro* diagnostic tests, extremely low levels of target below the LoD of the assay may be detected, but results may not be reproducible.
- Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay results may sometimes be "INVALID" due to a failed SPC control, "ERROR" or "NO RESULT", and require retesting that can lead to a delay in obtaining final results.

Interfering Substances

A study was performed to assess potentially inhibitory effects, if any, of substance(s) encountered in positive blood cultures using the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay. Potentially inhibitory substances may include, but are not limited to blood and components of blood culture media. Substances were tested undiluted in replicates of three with MRSA cells spiked near the analytical Limit of Detection (~2.5 x LoD) and higher (~10 x LoD).

- No inhibitory effects were observed in the presence of BACTEC™ (Becton Dickinson) standard aerobic/anaerobic soybean-casein digest broth containing the anticoagulant SPS or their "PLUS" aerobic/anaerobic media containing ion exchange and nonionic adsorbent resins to remove antimicrobials when compared to buffer controls.
- No inhibitory effects were observed in the presence of BacT/ALERT® (bioMerieux) standard aerobic/anaerobic tryptic soy broth containing the anticoagulant SPS when compared to buffer controls.
- No inhibitory effects were observed in the presence of whole blood when compared to buffer controls.

Performance Characteristics

Performance characteristics of the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay were determined in a multi-site prospective investigation study at five institutions (4 United States and 1 European Union) by comparing the MRSA/SA Blood Culture Assay on the GeneXpert System (Xpert MRSA/SA Assay) with culture. Subjects included individuals whose blood cultures were positive for growth. The study included samples from nine different types of adult blood culture bottles and one pediatric bottle. Blood culture bottles containing charcoal were excluded.

An aliquot from each blood culture bottle was tested by the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay and by culture. Culture methods varied among centers, though oxacillin/methicillin susceptibility was determined at all centers by disk diffusion test using a 30 µg cefoxitin disk and cutoff of 21/22 mm.

Assay performance of the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay was calculated relative to the culture results.

Overall Results

A total of 406 specimens were tested for MRSA and SA by Xpert and culture; 212 US and 194 EU.

The Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay identified 98.3% of the specimens positive for MRSA and 99.4% of the specimens negative for MRSA relative to the culture method. For the specimens tested, the MRSA positive predictive value was 96.6% and the MRSA negative predictive value was 99.7%.

The Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay identified 100% of the specimens positive for SA and 98.6% of the specimens negative for SA relative to the culture method. For the specimens tested, the SA positive predictive value was 96.7% and the SA negative predictive value was 100%.

Table 1. MRSA — US and EU Centers Combined

		Culture +	Culture -			
Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay	+	57	2	59	Sens	98.3%
	-	1*	346	347	Spec	99.4%
		58	348	406		

* The one false negative specimen attained in the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay testing was further investigated by the PBP2a latex agglutination test (Oxiod, UK) using standard laboratory methods. Results of the aforementioned test showed that this isolate overproduced penicillinase and was misidentified by culture as MRSA.

Table 2. SA — US and EU Centers Combined

		Culture +	Culture -			
Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay	+	120	4	124	Sens	100%
	-	0	282	282	Spec	98.6%
		120	286	406		

Analytical Specificity

Cultures from 98 American Type Culture Collection (ATCC) and 7 Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA) strains representing species phylogenetically related to *Staphylococcus aureus* or those potentially encountered in a hospital environment, 29 strains of methicillin-sensitive coagulase negative staphylococci, and 9 strains of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci were tested using the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay. The organisms tested were represented by 74 Gram positive, 28 Gram negative, 3 yeast, 95 aerobic and 10 anaerobic species. Two or more replicates of each isolate were tested at 1.7-3.2 McFarland units. Under the conditions of the study, all isolates were reported MRSA negative and SA negative, none of the isolates were detected by the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay. Positive and Negative controls were included in the study. The specificity was 100%.

Analytical Ubiquity (Inclusivity)

The analytical ubiquity (inclusivity) of the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay was determined using 25 *Staphylococcus aureus* strains supplied by Dr. Fred C. Tenover at the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). These specimens are reported to be representative of MRSA and MSSA strains currently encountered in the healthcare community. All strains were tested in triplicate using 100 µL of stationary phase cell suspensions diluted 10 million-fold. The panel consists of MRSA strains representing SCC*mec* types II, IV, IVa, IVb, and IVc in addition to several unknown types. Data supplied by the CDC indicate these strains, when characterized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), represent numerous USA types including USA 100, the most common hospital-acquired strain and USA 300 and 400, the most common community-acquired strains.[8]

As shown in Table 3, all MRSA strains were correctly reported MRSA positive and SA positive using the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay. Additionally, each MSSA strain was correctly reported MRSA negative and SA positive. After CHROMagar and Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay results were reported to the CDC, they revealed that the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay did not incorrectly identify specimen 95:99. Specimen 95:99 was mislabeled by the CDC. Specimen 95:99 was correctly reported MRSA negative and SA negative by the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay. Colony forming units per assay were determined by plate counts in duplicate.

Table 3. Analytical Ubiquity of the Xpert™ MRSA/SA Blood Culture Assay

Lab ID	Sender	Source	PFGE Type	SCC*mec* Type	CHROMagar MRSA Result	Xpert MRSA/SA BC Assay Result	SPC Ct	*spa* Ct	*mecA* Ct	SCC Ct	CFU per assay
94:1013	VT	Skin lesion	USA1000	IV	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	34.7	30.7	31	32.6	152
*95:99	CT	Blood	USA500	IV	-	MRSA NEGATIVE; SA NEGATIVE	34.1	0	0	0	37
96:308	NM	Stool	USA900	MSSA	-	MRSA NEGATIVE; SA POSITIVE	34	29.4	0	0	201
96:281	NC	Blood	USA200	II	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	33.4	33.6	34	35.3	101
148-99	NY	Blood	USA600	II	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	34.3	33.2	33.1	35.2	43
182-99	MN	Unknown	USA400	IVa	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	43.7	26.7	27.1	28.7	417
18626	OH	Blood	USA100	II	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	34.8	30.7	31	32.7	138
0:50	TN	Stool	USA600	not typed	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	33.6	31.2	31.4	33.2	115
0-25-4	MS	Nasal	USA700	IVa	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	35.5	29.1	29.3	30.9	178
0-25-37	MS	Skin/Soft Tissue	USA300	IVa	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	34.7	32.3	32.7	34.2	94
1-1-81	WA	Nasal	USA400	not typed	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	34.3	33	33.7	35.5	106
1-1-493	WA	Wound	USA800	IV	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	33.7	31.5	31.7	33.4	113
N7129	NHANES	Nasal	USA900	MSSA	-	MRSA NEGATIVE; SA POSITIVE	34.3	29.9	0	0	84
107-03	NV	Blood	USA200	not typed	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	34	33	33.3	34.9	99
GA201	GA-ABC	Unknown	USA100	II	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	33.6	32.3	32.4	34	95
GA217	GA-ABC	Unknown	USA300	IVb	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	33.6	30.8	31.2	33	121
GA229	GA-ABC	Unknown	USA500	IV	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	37.8	31.7	31.9	33.3	81
7031	AK	Abscess	USA1100	IVa	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	34.2	30.8	31.5	32.9	73
102-04	CA	Nasal	USA1200	MSSA	-	MRSA NEGATIVE; SA POSITIVE	33.9	29.4	0	0	110
8-03	WI	Unknown	USA700	not typed	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	33.3	29	29.2	30.9	202
510-04	Uruguay	Abscess	USA1100	IVc	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	34.6	31.5	32	33.8	143
27-05	HI	Wound	USA800	IVc	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	40.7	27.8	28.1	29.8	373
CA46	CA	Blood	USA1000	IV	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	33.4	32.6	33.7	35.8	81
398-05	HI	Wound	USA1000	IVb	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	33.6	32.8	33.4	35.9	59
N4151	NHANES	Nasal	USA800	IVb	+	MRSA POSITIVE; SA POSITIVE	34	30.7	31.2	32.9	101

* Specimen 95:99: After CHROMagar and Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay results were reported to the CDC, they revealed that the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay correctly identified specimen 95:99. Specimen 95:99 was mislabeled by the CDC. Specimen 95:99 was correctly reported MRSA negative and SA negative by the Xpert MRSA/SA Blood Culture Assay.Ct values represent the mean of three replicates. The information contained in the grey columns was provided to Cepheid by Dr. Fred C. Tenover from the CDC.

Analytical Sensitivity

Additional studies 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 colony forming units (CFU) per sample that can be reproducibly distinguished from negative samples with 95% confidence. A maximum valid cycle of 36.0 is set for both MRSA and SA data analysis. Any *spa*, mecA, or SCC result with a Ct value greater than 36.0 is reported negative. For MRSA (type II cells), replicates of 20 were evaluated at seven concentrations (0, 50, 75, 100, 125, 150 and 200 CFU/sample). For SA, replicates of 20 were evaluated at six concentrations (0, 20, 25, 40, 50 and 60 CFU/sample).

Under the conditions of the study and using a maximum valid Ct setting of 36.0, results indicate that the LoD point estimate for SA is 48.0 CFU/sample with a 95% confidence interval ranging from 42.4 CFU to 57.2 CFU. The estimate and confidence levels were determined using logistic regression with data (number of positives per number of tests at each level) taken at six levels (0, 20, 25, 40, 50 and 60 CFU/sample). Note that the analytical LoD for SA will be conservatively reported as 58 CFU/50 µL sample.

The LoD point estimate for MRSA is 109.4 CFU/sample with a 95% confidence interval ranging from 98.8 CFU to 128.2 CFU. The estimate and confidence levels were determined using logistic regression with data (number of positives per number of tests at each level) taken at seven levels (0, 50, 75, 100, 125, 150 and 200 CFU/sample). Note that the analytical LoD for MRSA will be conservatively reported as 130 CFU/ 50 µL sample.

The confidence intervals were determined using maximum likelihood estimates on the logistic model parameters using the large sample variance-covariance matrix.

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. 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).

8. McDougal L, Steward C, Killgore G, Chaitram J, McAllister S, Tenover F. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a national Database. J Clin Micro 2003; 41(11): 5113-20.

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

Email: techsupport@cepheideurope.fr

Other Locations

Contact your local Cepheid representative.

Table of Symbols

Symbol	Meaning
REF	Catalog number
IVD	In vitro diagnostic medical device
	Do not reuse
LOT	Batch code
	Caution, consult accompanying documents
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
	Expiration date
CONTROL	Control
EC REP	Authorized representative in the European Community
CE	CE marking – European Conformity
	Temperature limitation
	Biological risks

Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Sweden

Product of Sweden

EC REP

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

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

CE IVD

Français

Dispositif médical pour diagnostic in vitro

Nom déposé

Test d'hémoculture Xpert® MRSA/SA

Nom d'usage

Test d'hémoculture MRSA/SA

Utilisation prévue

Le test Xpert MRSA/SA de Cepheid réalisé dans le GeneXpert® Dx System est un test de diagnostic *in vitro* qualitatif conçu pour une détection rapide et simultanée du *Staphylococcus aureus* (SA) et du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) chez les patients aux hémocultures positives. Le test utilise l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel automatisée pour détecter l'ADN du SARM/SA. Le test Xpert MRSA/SA est conçu pour faciliter la détection et l'identification du SARM/SA dans les flacons d'hémoculture positive. Le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA est conçu pour être utilisé en association avec d'autres tests de laboratoire, tels que la culture, ainsi qu'avec les données cliniques dont dispose le clinicien pour contribuer à la détection du SARM/SA dans les flacons d'hémoculture positive. La subculture d'hémocultures positives sert à récupérer des organismes pour le typage épidémiologique ou pour des tests de sensibilité. Le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA de Cepheid n'est pas indiqué pour contrôler le traitement des infections à SARM/SA.

Résumé et explication

Le *Staphylococcus aureus* (SA) est un agent pathogène nosocomial majeur qui provoque de nombreuses maladies, notamment l'endocardite, l'ostéomyélite, le choc toxique staphylococcique, l'intoxication alimentaire, l'anthrax et les furoncles. Au début des années cinquante, le développement de plasmides producteurs de bêta-lactamases a contrecarré l'efficacité de la pénicilline pour le traitement des infections à *S. aureus*. En 1959, l'utilisation de la méthicilline, une pénicilline synthétique, a été adoptée. Vers 1960, des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline ont été identifiées. Des études ont montré que ce phénomène résultait de l'acquisition du gène *mecA* par le *S. aureus*. Actuellement aux États -Unis, le SARM est responsable d'environ 25 % des infections nosocomiales et le nombre de cas de SARM communautaire augmente, provoquant une morbidité et une mortalité importantes. Pour tenter de limiter la propagation de ces infections, des stratégies et des politiques de contrôle ont été développées et mises en œuvre dans les établissements de santé. Le contrôle du SARM constitue l'objectif principal de la plupart des programmes de contrôle des infections des hôpitaux. Aujourd'hui, la méthode standard de détection du SARM est la culture, mais celle-ci s'avère très longue et difficile.[1,2,3,4,5]

Une méthode plus rapide et plus sensible de détection du SARM et du SA à partir de flacons d'hémoculture positive représente un avantage certain pour le traitement des patients et l'utilisation d'antibiotiques appropriés.

Principe de la procédure

Le GeneXpert Dx System automatise et intègre la purification d'échantillons, l'amplification d'acide nucléique et la détection de la séquence cible dans des échantillons simples ou complexes, en utilisant des tests de PCR en temps réel et de RT-PCR. Le système est composé d'un appareil, d'un ordinateur personnel et d'un logiciel préchargé pour effectuer des tests et afficher les résultats. Le système requiert l'utilisation de cartouches jetables et à usage unique, qui contiennent les réactifs PCR et abritent la procédure de PCR. La contamination croisée entre les échantillons est éliminée car les cartouches sont indépendantes. Pour obtenir une description complète du système, consultez le *Manuel d'utilisation du système Dx GeneXpert*.

Le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA comprend des réactifs pour la détection du SARM et du SA, ainsi qu'un contrôle du traitement de l'échantillon (CTE), pour contrôler le traitement approprié des bactéries cibles, ainsi que la présence d'inhibiteur(s) lors de la réaction PCR. Le contrôle de la sonde consiste à vérifier la réhydratation des réactifs, le remplissage des tubes de PCR dans la cartouche, l'intégrité de la sonde et la stabilité du fluorochrome.

Les amorces et les sondes du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA détectent les séquences brevetées de la protéine A staphylococcique (*spa*), le gène de résistance à la méthicilline/oxacilline (*mecA*) et la cassette chromosomique staphylococcique *mec* (SCC*mec*) insérée dans le site chromosomique *attB* du SA.

Réactifs et appareils

Matériel fourni

Le kit du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA contient suffisamment de réactifs pour traiter 10 échantillons ou contrôles qualité. Le kit contient les éléments suivants :

Cartouches de test d'hémoculture Xpert MRSA/SA avec tubes réactionnels intégrés	**10**
Billes de réactifs 1, 2 et 3 (lyophilisées)	**1 par cartouche**
Réactif 1	**2,8 ml par cartouche**
Réactif 2 (hydroxyde de sodium)	**3,2 ml par cartouche**
Réactif d'élution du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA	
Réactif d'élution (guanidinium thiocyanate)	**1 x 2,0 ml par pochette**
Petites pipettes de transfert jetables	**12**
CD	**1 par kit**
Fichier de définition de test (ADF)	
Instructions pour importer les ADF dans le logiciel GX	
Notice	

Remarques :

- Les fiches techniques de données de sécurité (SDS, Safety Data Sheets) sont disponibles à l'adresse : www.cepheid.com/tests-and-reagents/literature/msds ou www.cepheidinternational.com/tests-and-reagents/literature/msds.
- L'albumine de sérum bovin (BSA, bovine serum albumin) contenu dans les billes de ce produit a été produite exclusivement à partir de plasma bovin provenant des États-Unis. Les aliments donnés aux animaux ne contenaient pas de protéines de ruminants ou d'autres protéines animales ; les animaux ont subi des tests ante et post mortem. Au cours du processus, aucun mélange ne s'est produit avec d'autres matières animales.

Stockage et manipulation

- Conservez les cartouches et les réactifs du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA à une température comprise entre 2 et 28 °C.
- N'utilisez pas les réactifs ou les cartouches dont la date d'expiration est dépassée.
- N'ouvrez pas de cartouche tant que vous n'êtes pas prêt à effectuer un test.
- Utilisez la cartouche et les réactifs dans les 30 minutes suivant l'ouverture de l'emballage.
- N'utilisez aucun réactif devenu trouble ou décoloré.

Matériel requis mais non fourni

- GeneXpert Dx System (la référence varie en fonction de la configuration) : appareil GeneXpert, ordinateur, lecteur de code-barres et manuel d'utilisation
- Imprimante (consultez le *Manuel d'utilisation du système Dx GeneXpert* pour obtenir des indications de compatibilité)
- Agitateur vortex
- Pipettes de transfert jetables et stériles

Matériel disponible mais non fourni

Des écouvillons prêts à l'emploi KWIK-STIK™ (MicroBiologics, n° de réf. #0158MRSA et #0360MSSA) comme contrôles positifs et n° de réf. #0371MSSE (*Staphylococcus epidermidis* sensible à la méthicilline) comme contrôles negatifs peuvent être utilisés.

Avertissements et précautions

- Traiter tous les échantillons 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 U.S. Centers for Disease Control and Prevention (Centres américains pour le contrôle et la prévention des maladies)[6] et le Clinical and Laboratory Standards Institute (Institut des normes cliniques et de laboratoire, anciennement National Committee for Clinical Laboratory Standards) tiennent à disposition des directives concernant la manipulation des échantillons.[7]
- Respectez les procédures de sécurité de votre institution pour la manipulation de produits chimiques et d'échantillons biologiques.
- Le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA ne fournit pas de résultats relatifs à la susceptibilité antimicrobienne. Davantage de temps est nécessaire pour la culture et la réalisation de tests de prédisposition.
- Ne pas substituer le réactif du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA par d'autres réactifs.
- Ne pas ouvrir le couvercle de la cartouche du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA, sauf pour l'ajout de l'échantillon et du réactif, ou pour retester.
- Ne pas utiliser une cartouche qui est tombée ou qui a été agitée après avoir ajouté l'échantillon et le réactif.
- N'utilisez pas une cartouche dont le tube réactionnel est endommagé.
- Chaque cartouche de test d'hémoculture Xpert MRSA/SA à usage unique est utilisée pour effectuer un seul test. Ne réutilisez pas des cartouches usagées.
- Adressez-vous au personnel de votre institution chargé de la gestion environnementale des déchets afin de connaître les procédures correctes de mise au rebut des cartouches usagées et des réactifs non utilisés. Ces équipements peuvent présenter les caractéristiques des déchets dangereux selon la loi fédérale sur la conservation et la récupération des ressources (Resource Conservation and Recovery Act - RCRA) de l'EPA et donc nécessiter des mesures de mise au rebut spécifiques. Consultez les réglementations régionales et locales, qui peuvent différer de la réglementation fédérale. Les institutions situées hors des États-Unis doivent consulter la législation de leur pays relative à l'élimination des déchets dangereux.
- Conservez le kit du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA à une température comprise entre 2 et 28 °C.
- N'ouvrez pas l'emballage d'une cartouche tant que vous n'êtes pas prêt à effectuer un test.
- Le réactif d'élution contient du thiocyanate de guanidinium (risque H402, UE H301), qui est nocif pour les organismes aquatiques et qui, en contact avec de l'acide, libère un gaz toxique.
- Le réactif 2 contient de l'hydroxyde de sodium (pH > 12,5) ; (risque H314) qui est corrosif pour les yeux et la peau, et exige une protection oculaire et cutanée.
- Les milieux d'hémoculture suivants peuvent être utilisés pour les tests d'hémoculture Xpert MRSA/SA :
  - Milieu BACTEC™ PEDS PLUS™/F
  - Milieu BACTEC™ Plus Aerobic/F
  - Milieu BACTEC™ Plus Anaerobic/F
  - Milieu BACTEC™ Standard Anaerobic/F
  - Milieu BACTEC™ Standard/10 Aerobic/F
  - Flacons de culture BACTEC™ LYTIC/10 Anaerobic/F
  - bioMérieux BacT/ALERT SA aérobie standard
  - bioMérieux BacT/ALERT SN anaérobie standard
  - VersaTREK REDOX 1® (aerobic)
  - VersaTREK REDOX 2® (anaerobic)
- Les milieux d'hémoculture contenant du charbon activé ne peuvent pas être utilisés avec le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA.
- Testez les flacons d'hémoculture positive à la recherche de croissance microbienne uniquement avec le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA.

Collecte, transport et stockage d'échantillons

1. En cas de positivité, retirez les flacons d'hémoculture de l'incubation. Une coloration de Gram doit être réalisée à partir d'une hémoculture positive, conformément à la procédure standard du laboratoire. Si vous ne pouvez pas retirer le flacon d'hémoculture de l'instrument dès la confirmation de sa positivité, retirez-le dès que possible.
2. Pour les flacons d'hémoculture positive révélant la présence de bacilles Gram positif en agrégats (GPCC) ou isolés (GPC) suite à une coloration de Gram, retirez 1 ml d'aliquot du bouillon de culture bien mélangé et étiquetez en indiquant le n° Id de l'échantillon.

Remarque: Les résultats des hémocultures sont essentiels pour le soin du patient. Respectez les directives et politiques en place dans votre laboratoire/institution pour transmettre les résultats d'hémocultures positives (oralement, par écrit ou sur support électronique) aux professionnels de santé.

3. Si vous ne réalisez pas immédiatement de test d'hémoculture Xpert MRSA/SA, vous pouvez conserver l'aliquot entre 2 et 8 °C pendant 30 minutes suivant le retrait du flacon d'hémoculture. L'aliquot d'hémoculture positive doit être testé avec le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA dans les 4 heures suivant le retrait du flacon positif.

Procédure

Préparation de la cartouche

Important : Démarrez le test dans les 15 minutes qui suivent l'ajout des réactifs à la cartouche.

Pour ajouter l'échantillon et les réactifs dans la cartouche :

1. Enlevez la cartouche et les réactifs de l'emballage.
2. À l'aide de la petite pipette de transfert, transférez une goutte d'hémoculture positive (50 µl) dans le réactif d'élution.
3. Fermez le couvercle du flacon d'élution et vortexez à vitesse élevée pendant 10 secondes.
4. Ouvrez le couvercle de la cartouche. Utilisez une pipette de transfert stérile et transférez le contenu complet du réactif d'élution dans la chambre marquée « S » de la cartouche de test d'hémoculture Xpert MRSA/SA.
5. Fermez le couvercle de la cartouche.

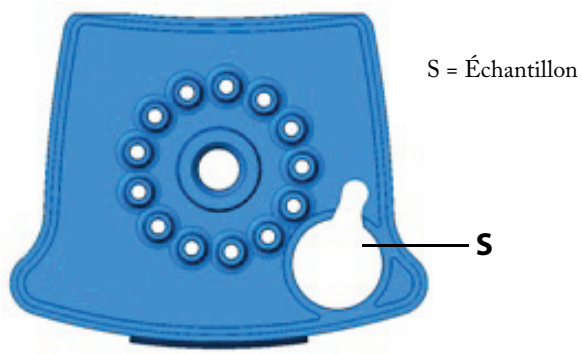

Figure 1. Cartouche de test d'hémoculture MRSA/SA (vue de dessus)

Démarrage du test

Important : Avant de démarrer le test, assurez-vous que le fichier de définition du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA est importé dans le logiciel.

Cette section répertorie les étapes de base de la réalisation du test. Pour obtenir des instructions détaillées, consultez le *Manuel d'utilisation du système Dx GeneXpert.*

1. Allumer l'instrument GeneXpert Dx puis allumer l'ordinateur. Le logiciel GeneXpert démarrera automatiquement.
2. Ouvrez une session du logiciel GeneXpert Dx System en utilisant votre nom d'utilisateur et votre mot de passe.
3. Dans la fenêtre du **GeneXpert Dx System**, cliquez sur **Create Test** (**Créer le test**). La boîte de dialogue **Scan Cartridge Barcode** (**Lire le code-barres de la cartouche**) s'affiche.

4. Lisez le code-barres de la cartouche du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA. La fenêtre **Create Test** (**Créer un test**) apparaît. En utilisant les informations du code-barres, le logiciel complète automatiquement les cases des champs suivants : Select Assay (Sélectionner un test), Reagent Lot ID (N° Id du lot de réactifs), Cartridge SN (Cartouche SN) et Expiration Date (Date limite d'utilisation).
5. Dans la case **Sample ID** (**N° Id de l'échantillon**), scannez ou saisissez le numéro d'identification de l'échantillon. Assurez-vous de saisir le numéro d'identification exact de l'échantillon. Ce numéro est associé aux résultats du test ; il est affiché dans la fenêtre « **View Results** » (**Afficher les résultats**), ainsi que dans tous les rapports.
6. Cliquez sur **Start Test** (**Démarrer le test**). Dans la boîte de dialogue qui s'affiche, saisissez votre mot de passe.
7. Ouvrez la porte du module de l'appareil dont le voyant vert clignote et chargez la cartouche.
8. Fermez la porte. Le test démarre et le voyant vert cesse de clignoter. Lorsque le test est terminé, le voyant s'éteint.
9. Attendez que le système déverrouille la porte du module avant de l'ouvrir et de retirer la cartouche.
10. Les cartouches usagées doivent être éliminées dans les conteneurs à déchets pour échantillons appropriés, conformément aux pratiques standard de votre institution.

Affichage et impression des résultats

Pour obtenir des instructions détaillées sur la manière d'afficher et d'imprimer les résultats, consultez le *Manuel d'utilisation du système Dx GeneXpert®*.

CONTROL

Contrôle qualité

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

Contrôle du traitement de l'échantillon (CTE) : garantit que l'échantillon a été correctement traité. Le CTE comprend des spores de *Bacillus globigii* sous la forme d'un biscuit sec de spores, placé dans chaque cartouche afin de vérifier le bon déroulement du traitement de l'échantillon du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA. Le CTE vérifie que la lyse de *Staphylococcus aureus* a eu lieu si les organismes sont présents et contrôle que le traitement de l'échantillon est adéquat. En outre, ce contrôle détecte l'inhibition associée à l'échantillon 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 la sonde : avant de démarrer la réaction PCR, le GeneXpert® Dx System mesure le signal de fluorescence à partir des sondes, afin de contrôler la réhydratation des billes de réactifs, le remplissage des tubes réactionnels, l'intégrité de la sonde et la stabilité du fluorochrome. Le contrôle de la sonde réussit s'il répond aux critères d'acceptation attribués.

- Des contrôles externes — KWIK-STIK™ (MicroBioLogics, n° de réf. 0158MRSA et n° de réf. 0360SA comme contrôles positifs, et n° de réf. 0371MSSE 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. Suivez la procédure de contrôle externe de MicroBioLogics décrite ci-dessous :
    1. Déchirez l'étui au niveau de l'entaille et retirez le KWIK-STIK.
    2. Pincez le bas de l'ampoule, dans le couvercle, pour libérer le liquide hydratant.
    3. Veillez à tenir l'ampoule verticalement et à la tapoter, pour faciliter l'écoulement du liquide à travers la tige dans le fond de l'unité contenant la pastille.
    4. Pour faciliter la dissolution de la pastille de cellules lyophilisées, écrasez la pastille et pincez doucement la chambre du fond.
    5. Détachez le KWIK-STIK pour libérer l'écouvillon et insérez celui-ci dans le tube contenant le réactif d'élution (couvercle noir).
    6. L'écouvillon KWIK-STIK est alors prêt pour le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA.

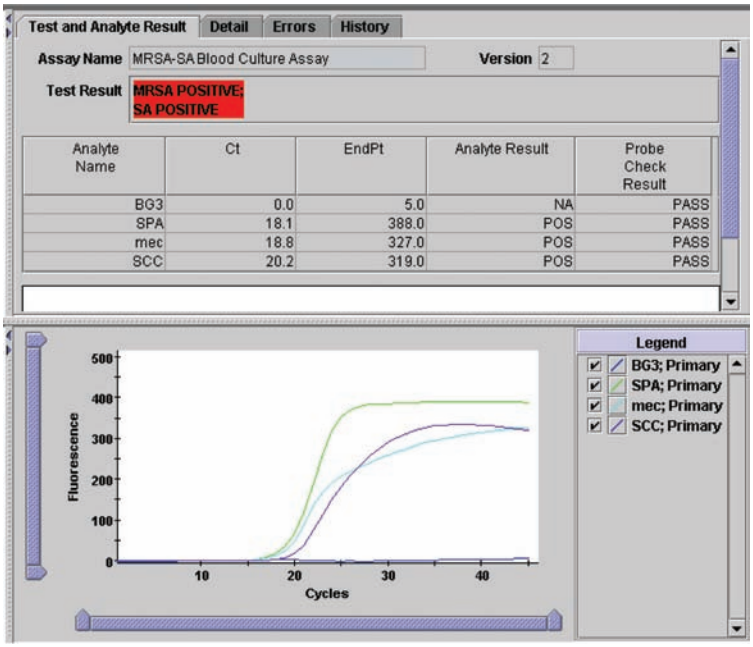

Figure 2. Exemple de résultat positif

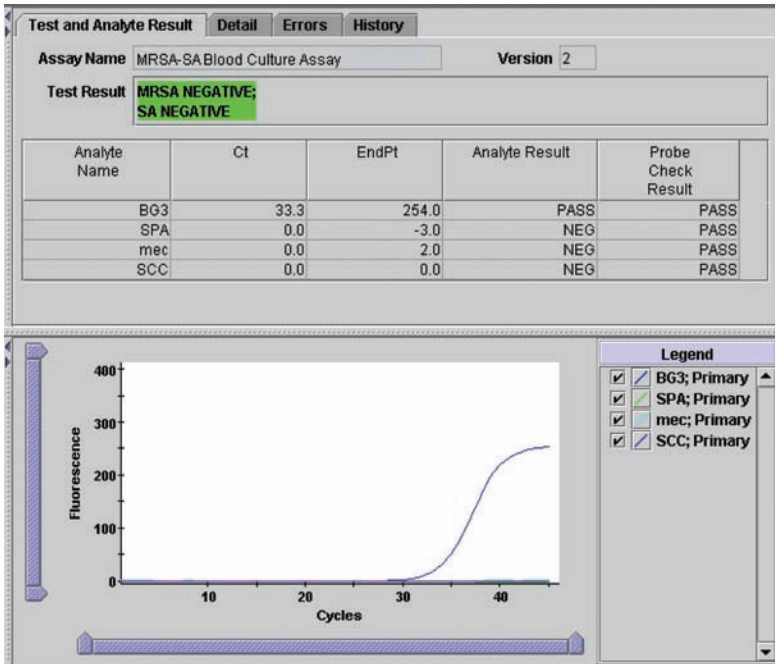

Figure 3. Exemple de résultat négatif

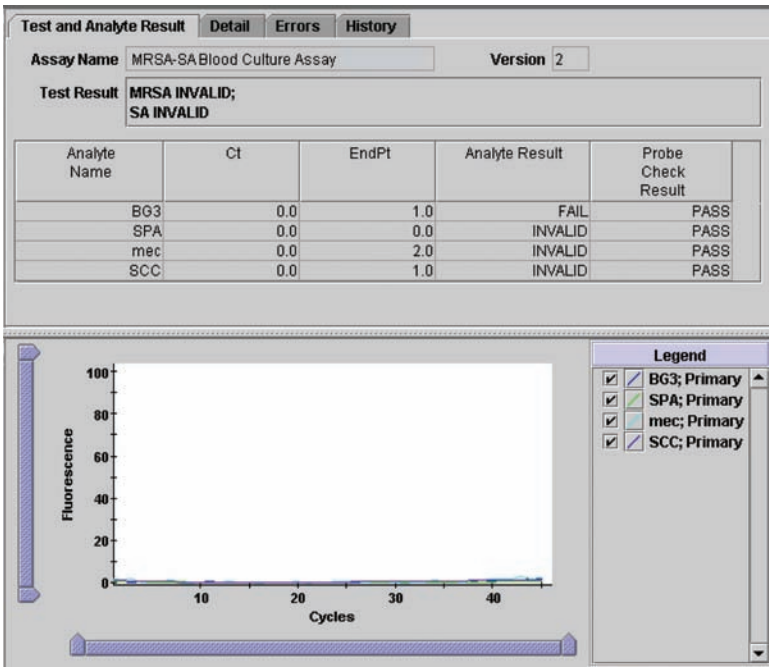

Figure 4. Exemple de résultat non valide

Interprétation des résultats

Les résultats sont interpolés par le GeneXpert® Dx System à partir de signaux fluorescents mesurés et d'algorithmes de calcul intégrés. Ils s'affichent dans la fenêtre « **View Results** » (**Afficher les résultats**). Les résultats possibles sont :

MRSA POSITIVE/SA POSITIVE (SARM POSITIF/SA POSITIF)

Les séquences d'ADN cible de SARM sont détectées/la séquence d'ADN cible de SA est détectée.

- MRSA POSITIVE (SARM POSITIF) : toutes les cibles du SARM présentent un Ct compris dans la gamme valide et la valeur finale se situe au-dessus de la valeur finale minimale requise.
- SPC — NA (CTE : sans objet) ; le CTE est ignoré parce que l'amplification SARM peut s'opposer à ce contrôle.
- Probe Check — PASS (Contrôle de la sonde réussi) : tous les résultats du contrôle de la sonde sont réussis.

MRSA NEGATIVE/SA POSITIVE (SARM NÉGATIF/SA POSITIF)

Les séquences d'ADN cible de SARM ne sont pas détectées/la séquence d'ADN cible de SA est détectée.

- SA POSITIVE (SA POSITIF) : l'ADN cible du SA présente un Ct compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe au-dessus de la valeur finale minimale requise.
- SPC — NA (CTE : sans objet) ; le CTE est ignoré parce que l'amplification SA peut s'opposer à ce contrôle.
- Probe Check — PASS (Contrôle de la sonde réussi) : tous les résultats du contrôle de la sonde sont réussis.

MRSA NEGATIVE/SA NEGATIVE (SARM NÉGATIF/SA NÉGATIF)

La séquence d'ADN cible du *Staphylococcus aureus* n'est pas détectée. Le CTE satisfait aux critères d'acceptation.

- NEGATIVE (NÉGATIF) : l'ADN cible du *Staphylococcus aureus* n'est pas détecté.
- SPC — PASS (CTE réussi) ; le CTE présente un Ct compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe au-dessus de la valeur finale minimale requise.
- Probe Check — PASS (Contrôle de la sonde réussi) : tous les résultats du contrôle de la sonde sont réussis.

INVALID (NON VALIDE)
Impossible de déterminer la présence ou l'absence de séquences cibles de SARM/SA, répétez le test avec un nouvel échantillon. Le CTE ne satisfait pas aux critères d'acceptation, l'échantillon n'a pas été traité correctement ou la PCR était inhibée.

- INVALID (NON VALIDE) : impossible de déterminer la présence ou l'absence d'ADN de *Staphylococcus aureus*.
- SPC-FAIL (CTE-ÉCHEC) : le résultat cible du CTE est négatif ; le Ct du CTE n'est pas compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe au-dessous de la valeur finale minimale requise.
- Probe Check — PASS (Contrôle de la sonde réussi) : tous les résultats du contrôle de la sonde sont réussis.

ERROR (ERREUR)
Impossible de déterminer la présence ou l'absence de SARM/SA, répétez le test avec un nouvel échantillon. L'échec du contrôle de la sonde est probablement dû au remplissage incorrect du tube réactionnel, à un problème d'intégrité de la sonde a été détecté ou au fait que les limites maximales de pression ont été dépassées.

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

*Si le contrôle de la sonde a réussi, l'erreur est provoquée par l'échec d'un composant du système.

NO RESULT (PAS DE RÉSULTAT)
Impossible de déterminer la présence ou l'absence de SARM/SA, répétez le test avec un nouvel échantillon. Trop peu de données ont été collectées pour produire un résultat de test. Par exemple, cela peut se produire si l'opérateur a interrompu un test en cours.

- MRSA — NO RESULT (SARM — PAS DE RÉSULTAT)
- SA — NO RESULT (SA — PAS DE RÉSULTAT)
- SPC — NO RESULT (CTE — PAS DE RÉSULTAT)
- Contrôle de la sonde—SO

Raisons pour lesquelles le test doit être répété

Si l'un des résultats du test mentionnés ci-dessous se produit, répétez le test en utilisant une nouvelle cartouche (ne réutilisez pas la cartouche). Répétez la procédure de test dans les 3 heures suivant un résultat indéterminé.

- Le résultat INVALID (NON VALIDE) indique que le CTE a échoué. L'échantillon n'a pas été traité correctement ou la PCR est inhibée.
- Le résultat ERROR (ERREUR) indique l'échec du contrôle de la sonde et l'interruption du test, probablement à cause du remplissage incorrect du tube réactionnel, de la détection d'un problème d'intégrité de la sonde de réactif ou du dépassement des limites maximales de pression.
- Le résultat NO RESULT (PAS DE RÉSULTAT) indique que trop peu de données ont été collectées. Par exemple, l'opérateur a interrompu un test en cours. Pour répéter un test :
  1. Transférez le contenu restant de la chambre « S » vers un nouveau réactif d'élution.
  2. Vortexez et ajoutez le contenu complet du réactif d'élution dans la chambre « S » de la nouvelle cartouche de test d'hémoculture MRSA/SA.
  3. Fermez le couvercle et démarrez le nouveau test.

Restrictions

- Les performances du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA ont été validées en utilisant uniquement les procédures fournies dans cette notice. Des modifications apportées à ces procédures peuvent modifier les performances du test. Les résultats du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA doivent être interprétés conjointement avec d'autres données de laboratoire et cliniques à la disposition du clinicien.
- Les milieux d'hémoculture contenant du charbon activé ne peuvent pas être utilisés avec le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA.
- Le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA peut générer des résultats négatifs erronés pour le SARM lors du test de souches de *S. aureus* à résistance de bas niveau à l'oxacilline (BORSA). Le mécanisme de résistance à l'oxacilline dans les souches de BORSA est dû à une production accrue de bêta-lactamases et non au gène *mecA*. Les souches de BORSA présentant des concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'oxacilline de 4 à 8 µg/ml sont considérées comme résistantes de bas niveau mais seraient signalées comme négatives au SARM par le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA. Les souches de BORSA sont rares aux États-Unis.
- Le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA peut générer des résultats négatifs erronés pour le SARM lors du test de souches de *S. aureus* modifié (MODSA). Le mécanisme de résistance à l'oxacilline dans les souches de MODSA est dû à des changements d'affinité des protéines de liaison à la pénicilline pour l'oxacilline et non au gène *mecA*. Les souches de MODSA présentant des concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'oxacilline de 4 à 8 µg/ml sont considérées comme résistantes de bas niveau mais seraient signalées comme négatives au SARM par le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA. Les souches de MODSA sont rares aux États-Unis.
- Des résultats de test erronés peuvent résulter d'une collecte d'échantillon inadéquate (ne suivant pas la procédure de collecte d'échantillon recommandée), de procédures de manipulation et de stockage inadéquates, d'une erreur technique, d'une confusion d'échantillons ou d'un nombre d'organismes dans l'échantillon insuffisant pour permettre une détection. Il est nécessaire de respecter scrupuleusement les instructions de cette notice pour éviter des résultats erronés.
- La fiabilité des résultats dépend d'une collecte d'échantillon adéquate, d'une manipulation et d'un stockage corrects car la détection du SARM et du SA repose sur le nombre d'organismes présents dans l'échantillon.
- Un résultat de test positif n'indique pas forcément la présence d'organismes viables. Cependant, il suppose la présence du SARM ou SA.
- Le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA doit venir en complément des autres méthodes disponibles.
- Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de fixation de l'amorce ou de la sonde peuvent affecter la détection de variantes du SARM nouvelles ou inconnues, entraînant un résultat négatif erroné.
- Dans une culture mixte contenant à la fois du SARM et du SA, la LDD du SARM est variable en présence de concentrations extrêmement élevées de SA. La concurrence du SA a été observée avec un rapport SARM:SA de $1:1x10^6$.
- Le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA génèrera un résultat positif au SARM erroné lors du test d'un échantillon d'hémoculture présentant une infection mixte, contenant à la fois des *staphylocoques* à coagulase négative résistants à la méthicilline (SCNRM) et des *Staphylococcus aureus* (SA) sensibles à la méthicilline à cassette vide.
- Comme pour tous les tests de diagnostic PCR *in vitro*, des niveaux extrêmement faibles de cible en dessous de la LDD du test peuvent être détectés, mais les résultats risquent de ne pas être reproductibles.
- Les résultats du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA peuvent parfois être « NON VALIDES » en raison d'un échec du CTE, « ERREUR » ou « PAS DE RÉSULTAT », et nécessiter de nouveaux tests pouvant entraîner un retard dans l'obtention du résultat final.

Substances parasites

Une étude a été réalisée pour évaluer les effets potentiellement inhibiteurs, le cas échéant, des substances présentes dans les hémocultures positives utilisant le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA. Les substances potentiellement inhibitrices peuvent comporter, sans s'y limiter, le sang et les composants du milieu d'hémoculture. Les substances ont été testées non diluées, en réplicats de trois, avec des cellules de SARM étudiées à proximité de la limite analytique de détection (~2,5 x LDD) et plus haut (~10 x LDD).

- Aucun effet inhibiteur n'a été observé en présence du bouillon standard aérobie/anaérobie à base d'hydrolysat de caséine de soja de BACTEC™ (Becton Dickinson) contenant l'anticoagulant SPS ou en présence de leur milieu aérobie/anaérobie « PLUS » contenant des résines échangeuses d'ions et des résines adsorbantes non ioniques pour éliminer les antimicrobiens, comparés aux témoins tampons.
- Aucun effet inhibiteur n'a été observé en présence du bouillon de soja tryptique aérobie/anaérobie standard BacT/ALERT® (bioMérieux) contenant l'anticoagulant SPS, comparé aux témoins tampons.
- Aucun effet inhibiteur n'a été observé en présence de sang total comparé aux témoins tampons.

Caractéristiques des performances

Les caractéristiques des performances du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA ont été déterminées lors d'une étude de cohorte multisite dans cinq institutions (4 aux États-Unis et 1 dans l'Union européenne) en comparant le test d'hémoculture SARM/SA sur le GeneXpert System (test Xpert MRSA/SA) avec une culture. Les sujets comprenaient des individus dont les hémocultures étaient positives pour la croissance. L'étude comprenait des échantillons de neuf types différents de flacons d'hémoculture adulte et un flacon pédiatrique. Les flacons d'hémoculture contenant du charbon étaient exclus.

Un aliquot de chaque flacon d'hémoculture a été testé par le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA et par culture. Les méthodes de culture variaient selon les centres, mais la susceptibilité à l'oxacilline/la méthicilline a été déterminée, dans tous les centres, par un test de diffusion de disque utilisant un disque de céfoxitine de 30 µg et une limite de 21/22 mm.

Les performances du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA ont été calculées par rapport aux résultats de la culture.

Résultats généraux

Au total, 406 échantillons ont été testés à la recherche de SARM et de SA par Xpert et par culture (212 aux USA et 194 dans l'UE).

Le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA a identifié 98,3 % des échantillons positifs au SARM et 99,4 % des échantillons négatifs au SARM, comparés à la méthode de culture. Pour les échantillons testés, la valeur prédictive positive de SARM était de 96,6 % et la valeur prédictive négative de 99,7 %.

Le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA a identifié 100 % des échantillons positifs au SA et 98,6 % des échantillons négatifs au SA, comparés à la méthode de culture. Pour les échantillons testés, la valeur prédictive positive de SA était de 96,7 % et la valeur prédictive négative de 100 %.

Tableau 1. SARM : centres américains et européens combinés

		Culture +	Culture -			
Test d'hémoculture Xpert MRSA/SA	+	57	2	59	Sens	98.3%
	-	1*	346	347	Spec	99.4%
		58	348	406		

* le seul échantillon négatif erroné obtenu lors de l'étude du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA a été soumis à un contrôle supplémentaire par test d'agglutination au latex de PBP2a (Oxoid, Royaume-Uni) en utilisant des méthodes de laboratoire standard. Les résultats de ce test ont montré que cet isolat a produit un excès de pénicillinase et qu'il a été incorrectement identifié comme SARM par culture.

Tableau 2. SA : centres américains et européens combinés

		Culture +	Culture -			
Test d'hémoculture Xpert MRSA/SA	+	120	4	124	Sens	100%
	-	0	282	282	Spec	98.6%
		120	286	406		

Spécificité analytique

Des cultures issues de 98 souches provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection) et de 7 souches provenant du NARSA (Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*) représentant des espèces phylogénétiquement proches du *Staphylococcus aureus* ou potentiellement présentes dans un environnement hospitalier, de 29 souches de staphylocoques à coagulase négative sensibles à la méthicilline et de 9 souches de staphylocoques à coagulase négative résistants à la méthicilline ont été testées au moyen du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA. Les organismes testés étaient représentés par 74 espèces à Gram positif, 28 à Gram négatif, 3 levures, 95 espèces aérobies et 10 espèces anaérobies. Deux réplicats ou plus de chaque isolat ont été testés dans la plage de 1,7 à 3,2 unités McFarland. Dans les conditions de l'étude, tous les isolats ont été déclarés négatifs au SARM et négatifs au SA ; aucun des isolats n'a été détecté par le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA. Des témoins positifs et négatifs étaient inclus dans l'étude. La spécificité était de 100 %.

Ubiquité analytique (inclusivité)

L'ubiquité analytique (inclusivité) du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA a été déterminée en utilisant 25 souches de *Staphylococcus aureus* fournies par le Dr Fred C. Tenover des CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Centres pour le contrôle et la prévention des maladies). Ces échantillons ont été signalés comme représentatifs des souches de SARM et de SASM actuellement présentes dans les environnements médicaux. Toutes les souches ont été testées en trois exemplaires, en utilisant 100 µl de suspensions de cellules en phase stationnaire diluées 10 millions de fois. Le panel était constitué de souches de SARM représentant les SCC*mec* de type II, IV, IVa, IVb et IVc, ainsi que plusieurs types inconnus. Les données fournies par le CDC indiquent que ces souches, lorsqu'elles sont caractérisées par électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE), représentent de nombreux types USA, notamment le type USA 100, responsable de la plupart des cas hospitaliers et les types USA 300 et USA 400, responsables de la plupart des cas communautaires.[8]

Comme indiqué dans le Tableau 3, toutes les souches de SARM ont été correctement détectées positives au SARM et positives au SA par le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA. En outre, chaque souche de SASM a été correctement détectée négative au SARM et positive au SD. Après soumission au CDC des résultats CHROMagar et des résultats du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA, le CDC a déclaré que le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA n'avait pas identifié de façon incorrecte l'échantillon 95:99. Cet échantillon avait été mal étiqueté par le CDC. Le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA avait correctement identifié l'échantillon 95:99 comme négatif au SARM et négatif au SA. Le nombre de bactéries souches par test a été déterminé par des numérations sur plaque en deux exemplaires.

Tableau 3. Ubiquité analytique du test d'hémoculture Xpert™ MRSA/SA

N° Id du labo	Expéditeur	Source	Type PFGE	Type SCC*mec*	Résultat SARM CHROMagar	Résultat du test Xpert MRSA/SA BC	Ct CTE	Ct *spa*	Ct *mecA*	Ct SCC	Bactéries souches par test
94:1013	VT	Lésion de peau	USA1000	IV	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	34,7	30,7	31	32,6	152
*95:99	CT	Sang	USA500	IV	-	SARM NÉGATIF ; SA NÉGATIF	34,1	0	0	0	37
96:308	NM	Selles	USA900	SASM	-	SARM NÉGATIF ; SA POSITIF	34	29,4	0	0	201
96:281	NC	Sang	USA200	II	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	33,4	33,6	34	35,3	101
148-99	NY	Sang	USA600	II	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	34,3	33,2	33,1	35,2	43
182-99	MN	Inconnu	USA400	IVa	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	43,7	26,7	27,1	28,7	417
18626	OH	Sang	USA100	II	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	34,8	30,7	31	32,7	138
0:50	TN	Selles	USA600	non typé	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	33,6	31,2	31,4	33,2	115
0-25-4	MS	Nasale	USA700	IVa	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	35,5	29,1	29,3	30,9	178
0-25-37	MS	Peau/ Tissu mou	USA300	IVa	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	34,7	32,3	32,7	34,2	94
1-1-81	WA	Nasale	USA400	non typé	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	34,3	33	33,7	35,5	106
1-1-493	WA	Plaie	USA800	IV	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	33,7	31,5	31,7	33,4	113
N7129	NHANES	Nasale	USA900	SASM	-	SARM NÉGATIF ; SA POSITIF	34,3	29,9	0	0	84
107-03	NV	Sang	USA200	non typé	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	34	33	33,3	34,9	99
GA201	GA-ABC	Inconnu	USA100	II	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	33,6	32,3	32,4	34	95
GA217	GA-ABC	Inconnu	USA300	IVb	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	33,6	30,8	31,2	33	121
GA229	GA-ABC	Inconnu	USA500	IV	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	37,8	31,7	31,9	33,3	81

Tableau 3. Ubiquité analytique du test d'hémoculture Xpert™ MRSA/SA (suite)

N° Id du labo	Expéditeur	Source	Type PFGE	Type SCC*mec*	Résultat SARM CHROMagar	Résultat du test Xpert MRSA/SA BC	Ct CTE	Ct *spa*	Ct *mecA*	Ct SCC	Bactéries souches par test
7031	AK	Abcès	USA1100	IVa	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	34,2	30,8	31,5	32,9	73
102-04	CA	Nasale	USA1200	SASM	-	SARM NÉGATIF ; SA POSITIF	33,9	29,4	0	0	110
8-03	WI	Inconnu	USA700	non typé	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	33,3	29	29,2	30,9	202
510-04	Uruguay	Abcès	USA1100	IVc	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	34,6	31,5	32	33,8	143
27-05	HI	Plaie	USA800	IVc	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	40,7	27,8	28,1	29,8	373
CA46	CA	Sang	USA1000	IV	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	33,4	32,6	33,7	35,8	81
398-05	HI	Plaie	USA1000	IVb	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	33,6	32,8	33,4	35,9	59
N4151	NHANES	Nasale	USA800	IVb	+	SARM POSITIF ; SA POSITIF	34	30,7	31,2	32,9	101

* Échantillon 95:99 : après soumission au CDC des résultats CHROMagar et des résultats du test d'hémoculture Xpert MRSA/SA, le CDC a déclaré que le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA avait correctement identifié l'échantillon 95:99. Cet échantillon avait été mal étiqueté par le CDC. Le test d'hémoculture Xpert MRSA/SA avait correctement identifié l'échantillon 95:99 comme négatif au SARM et négatif au SA. Les valeurs de Ct représentent la moyenne de trois réplicats. Les informations présentes dans les colonnes en gris ont été fournies à Cepheid par le Dr Fred C. Tenover du CDC.

Sensibilité analytique

Des études supplémentaires ont été réalisées afin de déterminer le niveau de confiance de 95 % de la limite analytique de détection (LDD) de ce test. La limite de détection est définie comme le nombre le plus bas de bactéries souches par échantillon qui peut être détecté à plusieurs reprises dans des échantillons négatifs avec un niveau de confiance de 95 %. Un cycle valide maximal de 36,0 est défini pour l'analyse des données SARM et SA. Tout résultat *spa*, mecA ou SCC d'une valeur de Ct supérieure à 36,0 est signalé négatif. Pour le SARM (cellules de type II), des réplicats de 20 ont été évalués à sept concentrations (0, 50, 75, 100, 125, 150 et 200 bactéries souches/échantillon). Pour le SA, des réplicats de 20 ont été évalués à six concentrations (0, 20, 25, 40, 50 et 60 bactéries souches/échantillon).

Dans les mêmes conditions d'étude et en utilisant une valeur de Ct valide maximale de 36,0, les résultats indiquent que l'estimation du point de LDD pour le SA est de 48,0 bactéries souches/échantillon, avec un niveau de confiance de 95 % compris entre 42,4 et 57,2 bactéries souches. L'estimation et les niveaux de confiance ont été déterminés en utilisant la régression logistique avec des données (nombre de positifs par nombre de tests à chaque niveau) obtenues à six niveaux (0, 20, 25, 40, 50 et 60 bactéries souches/échantillon). Notez que la LDD analytique pour le SA sera signalée prudemment à 58 bactéries souches/échantillon de 50 µl.

L'estimation du point de LDD pour le SARM est de 109,4 bactéries souches/échantillon, avec un niveau de confiance de 95 % compris entre 98,8 et 128,2 bactéries souches. L'estimation et les niveaux de confiance ont été déterminés en utilisant la régression logistique avec des données (nombre de positifs par nombre de tests à chaque niveau) obtenues à sept niveaux (0, 50, 75, 100, 125, 150 et 200 bactéries souches/échantillon). Notez que la LDD analytique pour le SARM sera signalée prudemment à 130 bactéries souches/échantillon de 50 µl.

Les intervalles de confiance ont été déterminés en utilisant les estimations de probabilités maximales sur les paramètres du modèle logistique en utilisant la matrice de variance-covariance de grand échantillon.

Références

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).

8. McDougal L, Steward C, Killgore G, Chaitram J, McAllister S, Tenover F. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a national Database. J Clin Micro 2003;41(11):5113-20.

Assistance

Pour bénéficier d'une assistance, contactez Cepheid en utilisant l'une des informations relatives aux contacts suivantes. Assurez-vous de communiquer le numéro de série de l'appareil et le N° Id du lot de réactifs lorsque vous appelez ou envoyez un courrier électronique.

Amérique du Nord

Pour bénéficier d'une assistance technique, utilisez les informations relatives aux contacts suivantes :

Tél. : +1.888.838.3222 Option 2

Courrier électronique : techsupport@cepheid.com

Vous pouvez joindre l'assistance technique de Cepheid par téléphone du lundi au vendredi, de 5 h 00 à 17 h 00, heure du Pacifique.

Union européenne

Pour bénéficier d'une assistance technique, utilisez les informations relatives aux contacts suivantes:

Tél. : +33.563.82.53.19

Courrier électronique : techsupport@cepheideurope.fr

Autres sites

Contactez votre représentant local Cepheid.

Tableau des symboles

Symbole	Signification
REF	Référence
IVD	Appareil à usage médical de diagnostic in vitro
	Ne pas réutiliser
LOT	Code du lot
	Attention, consulter la documentation jointe
	Fabricant
Σ	Contenu suffisant pour <n> tests
	Date limite d'utilisation
CONTROL	Contrôle
EC REP	Mandataire agréé pour la Communauté européenne
CE	Marquage CE – Conformité européenne
	Limitation de la température
	Risques biologiques

Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Suède

Produit de Suède

EC REP
Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tél. : +33.563.82.53.00
Fax : +33.563.82.53.01
Courrier électronique : cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Deutsch

Medizinisches Gerät zur In-vitro-Diagnostik

Markenname

Xpert® MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung

Üblicher Name

MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung

Verwendungszweck

Beim Cepheid Xpert MRSA/SA-Test, der mit dem GeneXpert® Dx-System durchgeführt wird, handelt es sich um einen qualitativen *In-vitro*-Diagnostiktest zum schnellen und gleichzeitigen Nachweis des *Staphylococcus aureus* (SA) und des Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) bei Patienten mit positiven Blutkulturen. Der Test verwendet die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis der MRSA/SA-DNA. Die Xpert MRSA/SA-Untersuchung dient zum Nachweis und zur Identifizierung von MRSA/SA aus positiven Blutkulturflaschen. Die Xpert MRSA/SA Blutkultur-Untersuchung ist in Kombination mit anderen Labortests wie z. B. Kulturen und mit klinischen Daten, die dem Kliniker zur Verfügung stehen, als Hilfsmittel zum Nachweis von MRSA/SA in positiven Blutkulturen des Patienten einzusetzen. Die Subkultivierung positiver Blutkulturen ist erforderlich, um Organismen zur Resistenztestung oder für epidemiologische Untersuchungen anzuzüchten. Die Cepheid Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung ist nicht zur Behandlungsüberwachung von MRSA/SA-Infektionen vorgesehen.

Zusammenfassung und Erklärung

Staphylococcus aureus (SA) ist einer der am weitesten verbreiteten nosokomialen Krankheitserreger, der eine Reihe von Erkrankungen wie Endokarditis, Osteomyelitis, toxisches Schocksyndrom, Lebensmittelvergiftungen, Karbunkel und Furunkel hervorruft. In den frühen 50er Jahren wurde Penicillin durch die Übertragung und Verbreitung von Beta-Laktamase-produzierenden Plasmiden für die Behandlung von *S. aureus*-Infektionen wirkungslos. 1959 wurde das synthetische Penicillin Methicillin auf den Markt gebracht. 1960 wurden Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme nachgewiesen. Als Ursache konnte die Übertragung des *mecA*-Gens auf *S. aureus* ermittelt werden. In den USA ist MRSA heutzutage für rund 25 % der nosokomialen Infektionen verantwortlich. Berichte über ambulant erworbene MRSA-Infektionen, die zu einer Erhöhung der Krankheitsziffern und Sterblichkeit führen, nehmen zu. In Einrichtungen des Gesundheitswesens wird daher durch die Umsetzung von Kontrollstrategien und -regeln versucht, die weitere Verbreitung dieser Infektionen einzudämmen. Die Kontrolle von MRSA-Infektionen ist einer der Hauptschwerpunkte in Programmen gegen Krankenhausinfektionen. Zurzeit ist die Ansetzung von Kulturen die Standardmethode zum Nachweis von MRSA. Diese Methode hat sich allerdings als sehr arbeits- und zeitaufwändig erwiesen.[1,2,3,4,5]

Eine schnelle und empfindlichere Methode zum Nachweis von MRSA und SA aus positiven Blutkulturflaschen stellt für das Patienten-Management und die Verwendung geeigneter Antibiotika zur Behandlung einen absoluten Vorteil dar.

Durchführungsprinzip

Im GeneXpert Dx-System sind die Probenvorbereitung, die Amplifizierung von Nukleinsäuren und die Detektion der Zielsequenz in einfachen und komplexen Proben automatisiert und integriert und werden mithilfe von Echtzeit-PCR- und RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt. Das System besteht aus einem Instrument und einem PC mit vorinstallierter Software, die zur Ausführung von Tests und zur Anzeige der Ergebnisse dient. Das System sieht die Verwendung von Einweg-Probenkartuschen vor, die die PCR-Reagenzien enthalten und in denen der PCR-Prozess abläuft. Da die Kartuschen in sich abgeschlossen sind, werden Kreuzkontaminationen verhindert. Eine vollständige Beschreibung des Systems ist im *Benutzerhandbuch zum GeneXpert Dx-System* zu finden.

Der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Test beinhaltet Reagenzien zum Nachweis von MRSA und SA sowie eine Probenverarbeitungskontrolle (SPC, Sample Processing Control) zur Sicherstellung der korrekten Verarbeitung der gesuchten Bakterien und Überprüfung, ob Inhibitoren in der PCR-Reaktion vorhanden sind. Mit der Sondenprüfungsfunktion (PCC) werden die Rehydrierung der Reagenzien, die Befüllung des PCR-Gefäßes in der Probenkartusche, die Sondenintegrität und die Farbstoffstabilität überprüft.

Mit den Primern und Sonden des Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Tests lassen sich Sequenzen nachweisen, die dem Staphylokokkenprotein A (*spa*), dem Gen für die Methicillin-/Oxacillin-Resistenz (*mecA*) und der in die SA-Chromosomenstelle *attB* eingefügten Staphylokokken-Genkassette *mec* (SCC*mec*) eigen sind.

Reagenzien und Instrumente

Im Lieferumfang enthaltenes Material

Das Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungs-Kit enthält Reagenzien zur Verarbeitung von 10 Proben oder Qualitätskontrollproben. Der Kit enthält Folgendes:

Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungskartuschen mit integrierten Reaktionsgefäßen	**10**
Kügelchen 1, 2 und 3 (gefriergetrocknet)	**1 pro Probenkartusche**
Reagenz 1	**2,8 ml pro Probenkartusche**
Reagenz 2 (Natriumhydroxid)	**3,2 ml pro Probenkartusche**
Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungs-Reagenzien	
Elutionsreagenz (Guanidiniumthiocyanat)	**1 x 2,0 ml pro Beutel**
Kleine Einweg-Übertragungspipetten	**12**
CD	**1 pro set**

Anweisungen an die ADF in die Software GX importieren

Instructions pour importer les ADF dans le logiciel GX

Packungsbeilage

Hinweis:

- Sicherheitsdatenblätter (SDS, Safety Data Sheets) sind auf den Webseiten www.cepheid.com/tests-and-reagents/literature/msds oder www.cepheidinternational.com/tests-and-reagents/literature/msds erhältlich.
- Das BSA (Rinderserumalbumin) in den Kügelchen in diesem Produkt wurde ausschließlich aus bovinem Plasma hergestellt, das aus den USA stammt. Auch die Herstellung des BSA erfolgte in den USA. Die Tiere erhielten keinerlei Wiederkäuer- oder anderes Tierprotein mit dem Futter und wurden ante- und post-mortem Tests unterzogen. Bei der Verarbeitung wurde das Material nicht mit anderen Tiermaterialien vermischt.

Lagerung und Handhabung

- Die Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungs-Kartuschen und -Reagenzien bei 2-28 °C lagern.
- Reagenzien und Probenkartuschen, die das Verfallsdatum überschritten haben, dürfen nicht verwendet werden.
- Probenkartuschen dürfen erst unmittelbar vor Testdurchführung geöffnet werden.
- Kartusche und Reagenzien innerhalb von 30 Minuten nach dem Öffnen des Deckels der Kartusche verwenden.
- Keine getrübten oder verfärbten Reagenzien verwenden.

Materialien, die nicht im Lieferumfang enthalten sind

- Das GeneXpert Dx-System (die Katalognummer hängt von der Konfiguration ab). GeneXpert-Instrument, Computer, Barcode-Lesegerät und Benutzerhandbuch
- Drucker (Kompatibilitätshinweise finden Sie im *Benutzerhandbuch zum GeneXpert Dx-System*.)
- Vortex-Mixer
- Sterile Einweg-Übertragungspipetten

Erhältliche Materialien, die nicht im Lieferumfang enthalten sind

KWIK-STIKs™ von MicroBiologics Bestellnr. 0158MRSA und Bestellnr. 0360MSSA als Positivkontrollen und Bestellnr. 0371MSSE (Methicillin-sensitiver *Staphylococcus epidermidis*) als Negativkontrolle.

Warnungen und Vorsichtshinweise

- Alle biologischen Patientenproben und auch die gebrauchten Kartuschen sind als potenziell infektiös zu behandeln. Da es oft unmöglich ist, potenziell infektiöse Patientenproben zu erkennen, sind alle biologischen Patientenproben gemäß den üblichen Vorsichtsmaßnahmen zu behandeln. Die Richtlinien zum Umgang mit Proben sind bei der US-amerikanischen CDC (Center for Disease Control and Prevention[6] (US-amerikanische staatliche Behörde für den Schutz der Bevölkerung vor Krankheiten und Seuchen) und beim Clinical and Laboratory Standards Institute (US-amerikanisches Institut für Standards in Klinik und Labor; früher National Committee for Clinical Laboratory Standards) erhältlich.[7]
- Es sind die Sicherheitsprozeduren der jeweiligen Institution für den Umgang mit Chemikalien und die Handhabung von biologischen Proben zu beachten.
- Die Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung liefert keine Ergebnisse im Hinblick auf die Resistenz. Für Kulturen und Resistenztestung sind zusätzliche Untersuchungen erforderlich.
- Keine Reagenzien des XpertR MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung durch andere Reagenzien ersetzen.
- Der Deckel der XpertR MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung-Kartusche darf nur für die Zugabe von Probe und Reagenzien und bei der Durchführung von Wiederholungstests geöffnet werden.
- Keine Kartuschen verwenden, die nach der Zugabe von Probe und Reagens fallen gelassen oder geschüttelt wurden.
- Probenkartuschen mit beschädigtem Reaktionsröhrchen dürfen nicht verwendet werden.
- Jede Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungseinwegkartusche dient zur Durchführung eines einzigen Tests. Gebrauchte Probenkartuschen nicht erneut verwenden.
- Wenden Sie sich wegen der ordnungsgemäßen Entsorgung gebrauchter Kartuschen und ungenutzter Reagenzien an den für die ökologische Abfallentsorgung zuständigen Mitarbeiter Ihrer Einrichtung. Dieses Material zeigt u. U. Eigenschaften, die im Rahmen des EPA Resource Conservation and Recovery Act (RCRA, US-amerikanisches Bundesverordnung der Umweltschutzbehörde zur Erhaltung und Wiedergewinnung von Ressourcen) spezielle Entsorgungsanforderungen für Sondermüll haben. Überprüfen Sie die regionalen und lokalen Entsorgungsvorschriften, da sich diese u. U. von den Bundesvorschriften unterscheiden. Einrichtungen außerhalb der USA sollten die Anforderungen ihres jeweiligen Landes hinsichtlich der Entsorgung von Sondermüll beachten.
- Das Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungs-Kit bei 2-28 °C lagern.
- Probenkartuschenverpackungen dürfen erst unmittelbar vor Testdurchführung geöffnet werden.
- Das Elutionsreagens enthält Guanidininthiocyanat (H402, EUH301), das für aquatisches Leben schädlich ist und bei Berührung giftige Gase entwickelt.
- Reagens 2 enthält Natriumhydroxid (pH > 12,5); (H314), das ätzend auf Augen und Haut wirkt. Augen- und Hautschutz ist erforderlich.
- Im Rahmen der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung können die folgenden Blutkulturmedien verwendet werden:
  - BACTEC™ PEDS PLUS™/F Medium
  - BACTEC™ Plus Aerobic/F Medium
  - BACTEC™ Plus Anaerobic/F Medium
  - BACTEC™ Standard Anaerobic/F Medium
  - BACTEC™ Standard/10 Aerobic/F Medium
  - BACTEC™ LYTIC/10 Anaerobic/F Kultur-Phiolen
  - bioMérieux BacT/ALERT SA standard aerobic
  - bioMérieux BacT/ALERT SN standard anaerobic
  - VersaTREK REDOX 1® (aerobic)
  - VersaTREK REDOX 2® (anaerobic)
- Blutkulturmedien, die Aktivkohle enthalten, können nicht in Verbindung mit dem Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Test verwendet werden.
- Im Rahmen der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung dürfen nur Blutkulturflaschen untersucht werden, die im Hinblick auf das mikrobiologische Wachstum positiv sind.

Probenentnahme, Transport und Lagerung

1. Nach positiver Bestimmung Blutkulturflaschen aus der Inkubation entfernen. An der positiven Blutkultur ist eine Gram-Färbung entsprechend den Standardprozeduren des Labors vorzunehmen. Wenn die Blutkulturflasche nicht direkt nach der positiven Bestimmung aus dem Instrument entfernt werden kann, sollte dies so bald wie möglich erfolgen.
2. Für positive Blutkulturflaschen, die gemäß Gram-Färbung Gram-positive Cocci in Clustern (GPCC) oder einzelne Gram-positive Cocci (GPC) aufweisen, ein 1-ml-Aliquot der gut durchmischten Bouillon entnehmen und mit der Proben-ID beschriften.

Hinweis: Die Ergebnisse von Blutkulturen sind von entscheidender Bedeutung für die Patientenversorgung. Richten Sie sich nach den festgelegten Richtlinien und Vorgehensweisen Ihres Labors/Ihrer Institution, wenn Sie positive Blutkulturergebnisse (mündlich, schriftlich oder elektronisch) an die Empfänger im Gesundheitswesen melden.

3. Wenn der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Test nicht unmittelbar durchgeführt wird, das Aliquot innerhalb von 30 Minuten nach der Entnahme aus der Blutkulturflasche bei 2 bis 8 °C lagern. Das positive Blutkultur-Aliquot ist innerhalb von 4 Stunden nach der Entnahme aus der positiven Blutkulturflasche mit dem Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Test zu untersuchen.

Durchführung

Vorbereiten der Probenkartusche

Wichtig: Den Test innerhalb von 15 Minuten nach Hinzufügen der Reagenzien zur Probenkartusche beginnen.

Laden der Probe und der Reagenzien in die Probenkartusche:

1. Die Probenkartusche und die Reagenzien aus der Verpackung nehmen.
2. Mit einer kleinen Übertragungspipette einen Tropfen positiver Blutkultur (50 µL) in das Elutionsreagenz übertragen.
3. Den Deckel auf die Phiole mit dem Elutionsreagenz aufsetzen und bei hoher Geschwindigkeit 10 Sekunden lang vortexieren.
4. Probenkartuschendeckel öffnen. Mit einer sterilen Übertragungspipette den gesamten Inhalt des Elutionsreagenz in die Kammer „S“ der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungskartusche geben.
5. Schließen Sie den Probenkartuschendeckel.

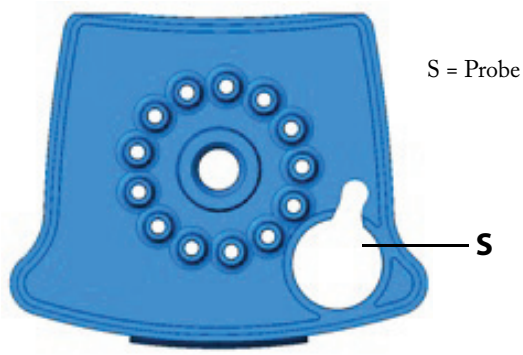

Abbildung 1. MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungskartusche (Draufsicht)

Testbeginn

Wichtig: Vor Beginn des Tests ist sicherzustellen, dass die Definition der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung in die Software importiert wurde.

In diesem Abschnitt werden die Grundschritte der Testausführung beschrieben. Für genauere Anweisungen das *Benutzerhandbuch zum GeneXpert Dx-System* verwenden.

1. Schalten Sie das GeneXpert Dx System ein und anschließend den Computer. Die GeneXpert Software startet automatisch.
2. Mit Ihrem Benutzernamen und Kennwort bei der GeneXpert Dx-Systemsoftware anmelden.
3. Im Fenster „**GeneXpert Dx System**“ auf **Create Test** (**Test erstellen**) klicken. Daraufhin wird das Dialogfeld „**Scan Cartridge Barcode**“ (**Kartuschen-Strichcode scannen**) angezeigt.

4. Den Strichcode auf der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungskartusche einscannen. Das Fenster „**Create Test**“ (**Test erstellen**) wird geöffnet. Mithilfe der Barcodeinformationen gibt die Software automatisch die Daten in die folgenden Felder ein: Select Assay (Untersuchung auswählen), Reagent Lot ID (Reagenzienchargen-ID), Cartridge SN (Probenkartuschen-SN) und Expiration Date (Verfallsdatum).
5. Die **Sample ID** (**Proben-ID**) in das Feld einscannen oder -tippen. Die Proben-ID hängt mit den Testergebnissen zusammen und wird im Fenster **View Results** (Ergebnisse anzeigen) und in allen Berichten angezeigt.
6. Auf **Start Test** (**Test starten**) klicken. Kennwort in das angezeigte Dialogfeld eingeben.
7. Die Tür des Instrumentenmoduls mit der grün blinkenden Anzeige öffnen und die Probenkartusche laden.
8. Die Tür schließen. Der Test beginnt und die grüne Anzeige hört auf zu blinken. Wenn der Test abgeschlossen ist, geht die Lampe aus.
9. Die Modultür kann erst geöffnet und die Probenkartusche kann erst entnommen werden, wenn das System die Tür entriegelt hat.
10. Die gebrauchten Probenkartuschen sind gemäß den Standardverfahren Ihrer Institution in entsprechenden Probenabfallbehältern zu entsorgen.

Anzeigen und Drucken der Ergebnisse

Siehe das *Benutzerhandbuch zum GeneXpert® Dx-System* für genaue Informationen zum Anzeigen und Drucken der Ergebnisse.

CONTROL Qualitätskontrolle

Jeder Test umfasst eine Probenverarbeitungskontrolle (SPC) und eine Sondenprüfungskontrolle (PCC).

Probenverarbeitungskontrolle (SPC): Stellt sicher, dass die Probe ordnungsgemäß verarbeitet wurde. Die SPC enthält Sporen des *Bacillus globigii* in Form eines getrockneten Sporensubstrats, das in jeder Kartusche enthalten ist, um eine angemessene Verarbeitung der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungsprobe sicherzustellen. Bei der SPC wird überprüft, ob die Lyse der *Staphylococcus aureus* durchgeführt wurde, sofern Organismen vorhanden sind, und ob die Probe ordnungsgemäß verarbeitet wurde. Ferner wird mit dieser Kontrolle auch eine mit der Probe assoziierte Inhibition des Echtzeit-PCR-Tests nachgewiesen. In einer negativen Probe sollte die SPC positiv sein; in einer positiven Probe kann sie negativ oder positiv sein. Die SPC gilt als bestanden, wenn sie die vorbestimmten Akzeptanzkriterien erfüllt.

Sondenprüfungskontrolle (PCC): Vor Beginn der PCR-Reaktion misst das GeneXpert® Dx-System das Fluoreszenzsignal aus den Sonden, um die Rehydrierung der Reagenzkügelchen, die Befüllung des Reaktionsgefäßes, die Sondenintegrität und die Farbstoffstabilität zu überwachen. Der Sondentest gilt als bestanden, wenn er die vorbestimmten Akzeptanzkriterien erfüllt.

- Externe Kontrollen — KWIK-STIKs™ (MicroBioLogics, Bestellnr. 0158MRSA und Bestellnr. 0360SA, als Positivkontrollen und Bestellnr. 0371MSSE 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. Es sind die weiter unten beschriebenen externen MicroBioLogics-Kontrollverfahren anzuwenden:
    1. Den Beutel am Einschnitt aufreißen und den KWIK-STIK entnehmen.
    2. Den unteren Teil der Ampulle in den Deckel drücken, um das hydrierende Fluid freizusetzen.
    3. Vertikal halten und punktieren, um den Flüssigkeits-Flow durch den Schaft in den unteren Bereich des Geräts mit den Kügelchen zu erleichtern.
    4. Um die Auflösung des lyophilisierten Zellkügelchens zu erleichtern, das Kügelchen zerdrücken und den unteren Kammerbereich vorsichtig zusammendrücken.
    5. Den KWIK-STIK auseinanderziehen, um den Tupfer freizugeben, und den Tupfer in das Röhrchen mit dem Elutionsreagenz (schwarze Kappe) einführen.
    6. Der KWIK-STIK-Tupfer ist jetzt für den Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungstest bereit.

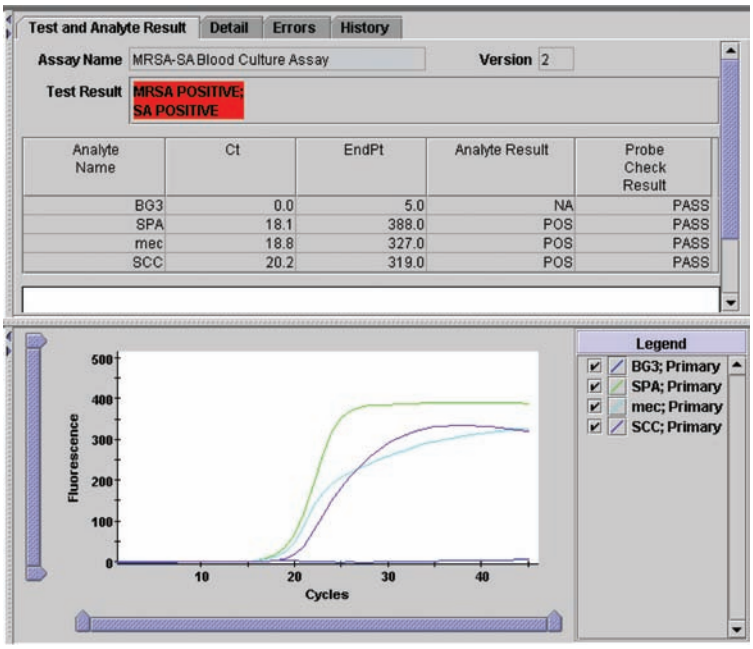

Abbildung 2. Beispiel eines positiven Ergebnisses

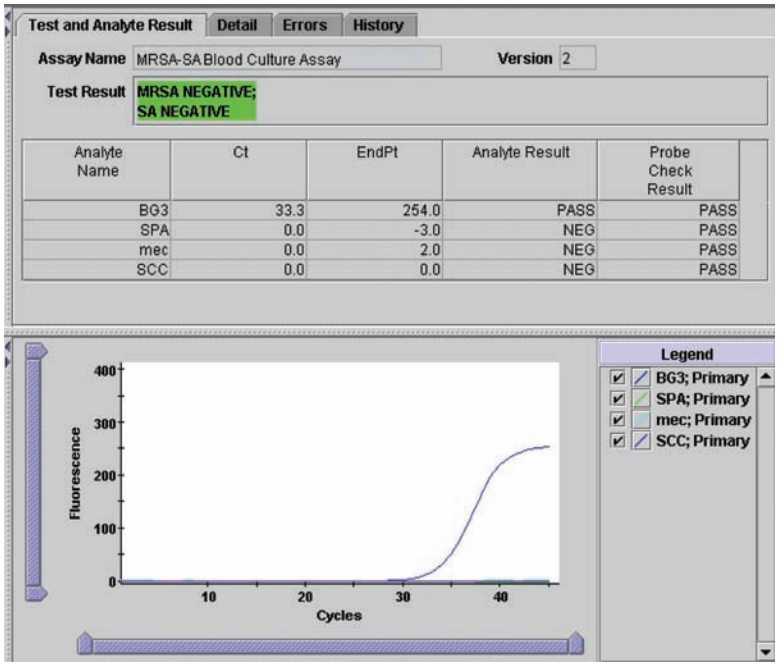

Abbildung 3. Beispiel eines negativen Ergebnisses

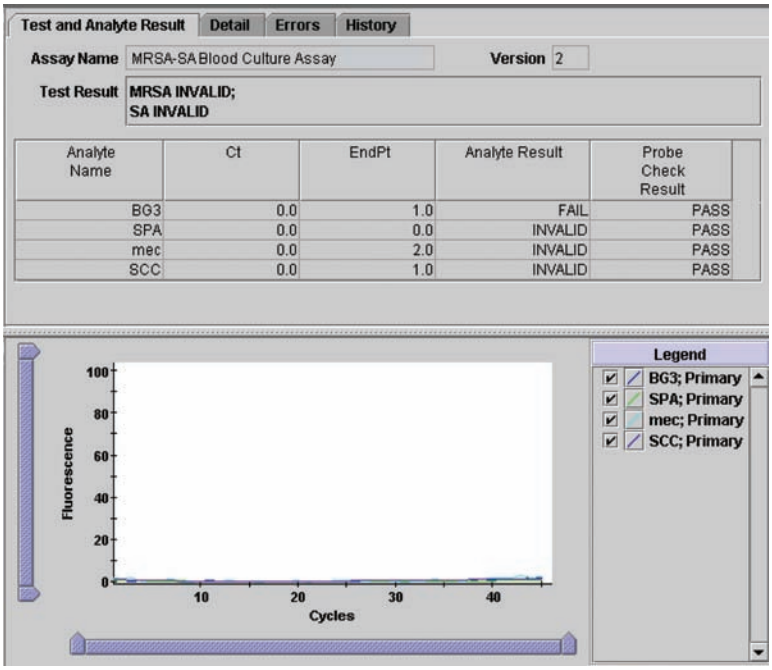

Abbildung 4. Beispiel eines ungültigen Ergebnisses

Interpretation der Ergebnisse

Das GeneXpert® Dx-System interpoliert die Ergebnisse aus gemessenen Fluoreszenzsignalen und zugrunde liegenden Berechnungsalgorithmen; die Ergebnisse werden im Fenster **View Results** (**Ergebnisse anzeigen**) angezeigt. Die folgenden Ergebnisse sind möglich:

MRSA POSITIVE/SA POSITIVE (MRSA POSITIV/SA POSITIV)

Es wurden MRSA-DNA-Zielsequenzen nachgewiesen/Es wurden SA-DNA-Zielsequenzen nachgewiesen.

- MRSA POSITIV: Alle MRSA-Zielsequenzen verfügen über einen Grenzwert innerhalb des gültigen Bereichs und einen Endpunkt über der Mindesteinstellung.
- SPC — NA (keine Angaben); die SPC wird ignoriert, da die MRSA-Amplifizierung u. U. mit dieser Kontrolle konkurriert.
- Probe Check – PASS (Sondentest – BESTANDEN): Alle Sondentests wurden bestanden.

MRSA NEGATIVE/SA POSITIVE (MRSA NEGATIV/SA POSITIV)

Es wurden keine MRSA-DNA-Zielsequenzen nachgewiesen/Es wurden SA-DNA-Zielsequenzen nachgewiesen.

- SA POSITIV: Die SA-Zielsequenz verfügt über einen Grenzwert innerhalb des gültigen Bereichs und einen Endpunkt über der Mindesteinstellung.
- SPC — NA (keine Angaben); die SPC wird ignoriert, da die SA-Amplifikation u. U. mit dieser Kontrolle konkurriert.
- Probe Check – PASS (Sondentest – BESTANDEN): Alle Sondentests wurden bestanden.

MRSA NEGATIVE/SA NEGATIVE (MRSA NEGATIV/SA NEGATIV)

Es wurde keine *Staphylococcus aureus*-DNA-Zielsequenz nachgewiesen. Die Probenverarbeitungskontrolle erfüllt die Akzeptanzkriterien.

- NEGATIVE — Es wurde keine *Staphylococcus aureus*-DNA-Zielsequenz nachgewiesen.
- SPC – PASS (SPC – BESTANDEN): Die Probenverarbeitungskontrolle verfügt über einen Grenzwert innerhalb des gültigen Bereichs und einen Endpunkt über dem Minimalgrenzwert des Endpunkts.
- Probe Check – PASS (Sondentest – BESTANDEN): Alle Sondentests wurden bestanden.

INVALID (UNGÜLTIG)
Es kann nicht ermittelt werden, ob MRSA/SA-Zielsequenzen vorhanden sind oder nicht. Test mit neuer Probe wiederholen. Die SPC erfüllt die Akzeptanzkriterien nicht, die Probe wurde nicht ordnungsgemäß verarbeitet oder die PCR war inhibiert.

- INVALID (UNGÜLTIG) — Es kann nicht ermittelt werden, ob *Staphylococcus aureus*-DNA vorhanden ist oder nicht.
- SPC-FAIL (NICHT BESTANDEN): Das SPC-Zielergebnis ist negativ, der Grenzwert der SPC liegt nicht innerhalb des gültigen Bereichs und der Endpunkt liegt unterhalb der Mindesteinstellung.
- Probe Check – PASS (Sondentest – BESTANDEN): Alle Sondentests wurden bestanden.

ERROR (FEHLER)
Es kann nicht ermittelt werden, ob MRSA/SA vorhanden ist oder nicht. Test mit neuer Probe wiederholen. Der Sondentest ist wahrscheinlich bedingt dadurch fehlgeschlagen, dass das Reaktionsgefäß unsachgemäß befüllt wurde, oder dadurch, dass der Maximaldruck überschritten wurde.

- MRSA – NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- SA — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- SPC – NO RESULT (SPC – KEIN ERGEBNIS)
- Sondenprüfung — FAIL (NICHT BESTANDEN)*; mindestens eine Sonde hat die Prüfung nicht bestanden.

* Wenn der Sondentest bestanden wurde, wurde der Fehler durch den Ausfall einer Systemkomponente verursacht.

NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
Es kann nicht ermittelt werden, ob MRSA/SA vorhanden ist oder nicht. Test mit neuer Probe wiederholen. Die erfassten Daten reichen für ein Testergebnis nicht aus. Das ist beispielsweise der Fall, wenn der Bediener den Test abgebrochen hat, bevor er abgeschlossen war.

- MRSA – NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- SA — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- SPC – NO RESULT (SPC – KEIN ERGEBNIS)
- Sondenprüfung – NA (keine Angaben)

Gründe für eine Wiederholung des Tests

Falls es zu einem der nachstehend genannten Untersuchungsergebnisse kommt, ist der Test mit einer neuen Kartusche zu wiederholen (die Kartusche darf nicht wiederverwendet werden). Der Wiederholungstest ist innerhalb von 3 Stunden nach Erhalt des unbestimmten Ergebnisses durchzuführen.

- Das Ergebnis INVALID (UNGÜLTIG) weist darauf hin, dass die SPC-Kontrolle fehlgeschlagen ist. Die Probe wurde nicht ordnungsgemäß verarbeitet oder die PCR ist inhibiert.
- Das Ergebnis ERROR (FEHLER) weist darauf hin, dass die Sondenprüfungskontrolle fehlgeschlagen ist und dass der Test abgebrochen wurde, und zwar wahrscheinlich bedingt dadurch, dass das Reaktionsgefäß unsachgemäß befüllt, ein Problem mit der Sondenintegrität festgestellt oder der Maximaldruck überschritten wurde.
- Das Ergebnis NO RESULT (KEIN ERGEBNIS) weist darauf hin, dass nicht genügend Daten erfasst wurden. Beispielsweise hat der Bediener den Test abgebrochen, bevor er abgeschlossen war. So führen Sie einen Wiederholungstest durch:
    1. Den restlichen Inhalt aus Kammer „S“ in ein neues Elutionsreagenz übertragen.
    2. Vortexieren und den gesamten Inhalt des Elutionsreagenz zu Kammer „S“ der neuen MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungsprobenkartusche hinzufügen.
    3. Den Deckel schließen und den Wiederholungstest starten.

Einschränkungen

- Die Leistung der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung wurde nur anhand der Prozeduren geprüft, die im Beilageblatt beschrieben sind. Änderungen an diesen Prozeduren können die Leistung des Tests beeinträchtigen. Ergebnisse der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung sollten unter Berücksichtigung anderer klinischer und Labordaten interpretiert werden, die dem Kliniker zur Verfügung stehen.
- Blutkulturmedien, die Aktivkohle enthalten, können nicht in Verbindung mit dem Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Test verwendet werden.
- Die Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung ergibt beim Testen von Borderline-Oxacillin-resistenten *S. aureus* (BORSA) u. U. falsch-negative MRSA-Ergebnisse. Der Mechanismus der Oxacillin-Resistenz in BORSA-Stämmen ist auf eine erhöhte Produktion von B-Lactamase und nicht auf das *mecA*-Gen zurückzuführen. BORSA mit einer inhibitorischen Oxacillin-Mindestkonzentration (MIC) von 4-8 µg/ml gelten als grenzwertig resistent, würden in der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung aber als MRSA-negativ angegeben werden. BORSA-Stämme sind in den USA selten.
- Die Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung ergibt beim Testen von modifizierten *S. aureus* (MOD-SA) u. U. falsch-negative MRSA-Ergebnisse. Der Mechanismus der Oxacillin-Resistenz in MOD-SA-Stämmen ist auf Änderungen in der Affinität Penicillin-bindender Proteine für Oxacillin und nicht das *mecA*-Gen zurückzuführen. MOD-SA mit einer inhibitorischen Oxacillin-Mindestkonzentration (MIC) von 4-8 µg/ml gelten als grenzwertig resistent, würden in der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung aber als MRSA-negativ angegeben werden. MOD-SA-Stämme sind in den USA selten.
- Fehlerhafte Testergebnisse können auf eine unsachgemäße Probengewinnnung, die Nichtbeachtung des empfohlenen Verfahrens zur Probengewinnnung, die Handhabung und Lagerung, technisches Versagen, Probenverwechslung oder auf den Umstand zurückzuführen sein, dass die Zahl der Organismen in der Probe durch den Test nicht nachzuweisen ist. Zur Vermeidung fehlerhafter Ergebnisse sind die Anweisungen in dieser Beilage einzuhalten.
- Da der Nachweis von MRSA und SA von der Anzahl der Organismen in der Probe abhängig ist, ist die ordnungsgemäße Entnahme, Handhabung und Lagerung der Proben zur Erzielung verlässlicher Ergebnisse unverzichtbar.
- Ein positives Testergebnis weist nicht zwingend auf das Vorhandensein lebensfähiger Organismen hin. Es lässt jedoch vermuten, dass MRSA oder SA vorhanden sind.
- Das Testverfahren mit der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung sollte ergänzend zu anderen verfügbaren Methoden eingesetzt werden.
- Mutationen oder Polymorphismen in Primer- oder Sondenbindungsregionen können sich auf den Nachweis neuer oder unbekannter MRSA-Varianten auswirken, was zu einem falsch-negativen Ergebnis führen kann.
- In Mischkulturen mit sowohl MRSA als auch SA ist die Nachweisgrenze von MRSA variabel, wenn extrem hohe SA-Konzentrationen vorliegen. Eine SA-Konkurrenz wurde bei einem MRSA:SA-Verhältnis von 1:1×10 beobachtet.[6].
- Die Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung ergibt ein falsch-positives MRSA-Ergebnis beim Testen von Mischinfektions-Blutkultur-Proben, die Methicillin-resistenten Koagulase-negativen *Staphylococcus* (MRCNS) und Methicillin-empfindlichen *Staphylococcus aureus* (SA) („leere Kassette“) enthalten.
- Wie bei allen PCR-basierten *In-vitro*-Diagnostiktests können extrem geringe Zielmengen unter der Nachweisgrenze der Untersuchung nachgewiesen werden, aber die Ergebnisse sind u. U. nicht reproduzierbar.
- Die Ergebnisse der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung können zuweilen INVALID (ungültig) aufgrund einer fehlerhaften SPC-Kontrolle, ERROR (Fehler) oder NO RESULT (kein Ergebnis) lauten und einen erneuten Test erforderlich machen, was zu einer Verzögerung beim Erhalt der endgültigen Ergebnisse führen kann.

Inhibitoren

Es wurde eine Studie durchgeführt, um ggf. die potenziell hemmende Wirkung von Substanzen zu bewerten, die in positiven Blutkulturen vorhanden sind und die Xpert MRSA/MSSA-Blutkultur-Untersuchung beeinträchtigen könnten. Zu potenziell hemmend wirkenden Substanzen gehören u. a. Blut und Komponenten von Blutkulturmedien. Die Substanzen wurden unverdünnt in drei Replikaten getestet, wobei MRSA-Zellen nahe der analytischen Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) (~2,5 x LoD) bzw. darüber (~10 x LoD) versetzt wurden.

- Im Vergleich zu Pufferkontrollen wurden bei Verwendung von Standard-Casein-Soja-Pepton-Bouillon (BACTEC™ (Becton Dickinson), aerob/anaerob), die das Antikoagulanz SPS bzw. deren PLUS Aerob-/Anaerob-Medium mit Ionenaustausch- und nicht ionischem Adsorptionsharz zur Entfernung antimikrobieller Substanzen enthielt, keine hemmenden Wirkungen beobachtet.
- Im Vergleich zu Pufferkontrollen wurden bei Verwendung aerober/anaerober tryptischer Standard-Soja-Bouillion (BacT/ALERT® (bioMerieux)), die das Antikoagulanz SPS enthielt, keine hemmenden Wirkungen beobachtet.
- Im Vergleich zu Pufferkontrollen wurden bei Verwendung von Vollblut keine hemmenden Wirkungen beobachtet.

Leistungsmerkmale

Die Leistungsmerkmale der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung wurden im Rahmen einer multizentrischen Prospektiv-Forschungsstudie an fünf Institutionen (4 in den USA und 1 in der EU) festgelegt, indem die MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung auf dem GeneXpert-System (Xpert MRSA/SA-Untersuchung) mit dem Kulturverfahren verglichen wurde. Zu den Patienten gehörten Personen, deren Blutkulturen im Hinblick auf das Wachstum positiv waren. Die Studie umfasste Proben von neun verschiedenen Typen Blutkulturfläschchen für Erwachsene und einer Flasche für Kinder. Blutkulturflaschen, in denen Kohle enthalten war, wurden nicht einbezogen.

Es wurde ein Aliquot aus jedem Blutkulturfläschchen mit der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung und im Kulturverfahren untersucht. Die Kulturverfahren waren in den verschiedenen Zentren unterschiedlich, wenngleich die Oxacillin-/Methicillin-Resistenz in allen Zentren durch Disk-Diffusionstests mit einer 30-µg-Cefoxitin-Disk and einem Ausschnitt von 21/22 mm ermittelt wurde.

Die Untersuchungsleistung der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung wurde relativ zu den Kulturergebnissen berechnet.

Gesamtergebnisse

Insgesamt wurden 406 Proben im Xpert- und im Kulturverfahren untersucht, und zwar 212 aus den USA und 194 aus der EU.

Die Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung ergab, dass im Verhältnis zu dem Kulturverfahren 98,3 % der Proben MRSA-positiv und 99,4 % der Proben MRSA-negativ waren. Bei den untersuchten Proben lag der positive MRSA-Vorhersagewert bei 96,6 %, während der negative MRSA-Vorhersagewert bei 99,7 % lag.

Die Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung ergab, dass im Verhältnis zu dem Kulturverfahren 100 % der Proben SA-positiv und 98,6 % der Proben SA-negativ waren. Bei den untersuchten Proben lag der positive SA-Vorhersagewert bei 96,7 %, während der negative SA-Vorhersagewert bei 100 % lag.

Tabelle 1. MRSA – US- und EU-Zentren zusammen

		Kultur +	Kultur -			
Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung	+	57	2	59	Sens	98,3 %
	-	1*	346	347	Spez	99,4 %
		58	348	406		

* Die eine falsch-negative Probe aus dem Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungstest wurde unter Anwendung von Standard-Laborverfahren mit dem PBP2a-Latexagglutinationstest (Oxiod, GB) näher untersucht. Die Ergebnisse des genannten Tests zeigten, dass dieses Isolat zu viel Penicillinase produzierte und im Kulturverfahren fälschlicherweise als MRSA identifiziert wurde.

Tabelle 2. SA – US- und EU-Zentren zusammen

		Kultur +	Kultur -			
Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung	+	120	4	124	Sens	100 %
	-	0	282	282	Spez	98.6 %
		120	286	406		

Analytische Spezifität

Es wurden unter Anwendung des Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungsverfahrens 98 ATCC-Kulturen (American Type Culture Collection) und 7 NARSA-Stämme (Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*), die phylogenetisch mit *Staphylococcus aureus* und potenziell in einer Krankenhausumgebung zu findenden Arten verwandt sind, 29 Stämme Methicillin-empfindlicher Koagulase-negativer Staphylokokken sowie 9 Stämme Methicillin-resistenter Koagulase-negativer Staphylokokken getestet. Bei den untersuchten Organismen handelte es sich um 74 grampositive, 28 gramnegative, 3 Hefe-, 95 aerobe und 10 anaerobe Arten. Mindestens zwei weitere Replikate jedes Isolats wurden mit 1,7-3,2 MacFarland-Einheiten untersucht. Unter den Bedingungen der Studie waren alle Isolate MRSA-negativ und SA-negativ und keines der Isolate wurde durch die Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung nachgewiesen. Es wurden positive und negative Kontrollen in die Studie einbezogen. Die Spezifität betrug 100 %.

Analytische Ubiquität (Inklusivität)

Die analytische Ubiquität (Inklusivität) der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung wurde unter Verwendung von 25 *Staphylococcus aureus*-Stämmen ermittelt, die von Dr. Fred C. Tenover vom US-amerikanischen CDC (Center for Disease Control and Prevention, der US-amerikanischen staatlichen Behörde für den Schutz der Bevölkerung vor Krankheiten und Seuchen) geliefert wurden. Von diesen Proben wird berichtet, dass sie repräsentativ für die aktuell im Gesundheitswesen anzufindenden MRSA- und MSSA-Stämme sind. Alle Stämme wurden unter Verwendung von 100 µl einer Zellsuspension der stationären Phase in 10-millionenfacher Verdünnung dreifach untersucht. Die Auswahl bestand aus MRSA-Stämmen, die SCC*mec* der Arten II, IV, IVa, IVb und IVc sowie verschiedene unbekannte Arten darstellten. Die von den CDC gelieferten Daten weisen darauf hin, dass diese Stämme, bei der Charakterisierung mit der Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE), zahlreiche US-Arten wie USA 100, der am häufigsten vorkommende stationär erworbene Stamm, und USA 300 und 400, die am häufigsten auftretenden ambulant erworbenen Stämme darstellen.[8]

Wie in Tabelle 3 dargestellt, wurden alle MRSA-Stämme mit der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung korrekt als MRSA-positiv und SA-positiv ermittelt. Zudem wurden alle MSSA-Stämme korrekt als MRSA-negativ und SA-positiv ermittelt. Nachdem die CHROMagar- und Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungsergebnisse an die CDC übermittelt worden waren, zeigte sich, dass die Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung Probe 95:99 nicht falsch identifiziert hatte. Probe 95:99 wurde von den CDC falsch etikettiert. Probe 95:99 wurde im Rahmen der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung korrekt als MRSA-negativ und SA-negativ ermittelt. Aus der Plattenanzahl in doppelter Ausführung wurden koloniebildende Einheiten pro Untersuchung ermittelt.

Tabelle 3. Analytische Ubiquität der Xpert™ MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung

Lab-ID	Absender	Quelle	PFGE-Typ	SCC*mec*-Typ	CHROMagar-MRSA-Ergebnis	Xpert MRSA/SA BC-Untersuchungsergebnis	SPC-Grenzwert	*spa*-Grenzwert	*mecA*-Grenzwert	SCC-Grenzwert	CFU pro Untersuchung
94:1013	VT	Hautläsion	USA1000	IV	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	34,7	30,7	31	32,6	152
*95:99	CT	Blut	USA500	IV	-	MRSA NEGATIV, SA NEGATIV	34,1	0	0	0	37
96:308	NM	Stuhl	USA900	MSSA	-	MRSA NEGATIV, SA POSITIV	34	29,4	0	0	201
96:281	NC	Blut	USA200	II	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	33,4	33,6	34	35,3	101
148-99	NY	Blut	USA600	II	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	34,3	33,2	33,1	35,2	43
182-99	MN	Unbekannt	USA400	IVa	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	43,7	26,7	27,1	28,7	417
18626	OH	Blut	USA100	II	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	34,8	30,7	31	32,7	138
0:50	TN	Stuhl	USA600	nicht typisiert	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	33,6	31,2	31,4	33,2	115
0-25-4	MS	Nasal	USA700	IVa	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	35,5	29,1	29,3	30,9	178
0-25-37	MS	Haut/ Weich-gewebe	USA300	IVa	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	34,7	32,3	32,7	34,2	94
1-1-81	WA	Nasal	USA400	nicht typisiert	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	34,3	33	33,7	35,5	106
1-1-493	WA	Wunde	USA800	IV	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	33,7	31,5	31,7	33,4	113
N7129	NHANES	Nasal	USA900	MSSA	-	MRSA NEGATIV, SA POSITIV	34,3	29,9	0	0	84
107-03	NV	Blut	USA200	nicht typisiert	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	34	33	33,3	34,9	99
GA201	GA-ABC	Unbekannt	USA100	II	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	33,6	32,3	32,4	34	95
GA217	GA-ABC	Unbekannt	USA300	IVb	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	33,6	30,8	31,2	33	121
GA229	GA-ABC	Unbekannt	USA500	IV	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	37,8	31,7	31,9	33,3	81
7031	AK	Abszess	USA1100	IVa	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	34,2	30,8	31,5	32,9	73
102-04	CA	Nasal	USA1200	MSSA	-	MRSA NEGATIV, SA POSITIV	33,9	29,4	0	0	110
8-03	WI	Unbekannt	USA700	nicht typisiert	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	33,3	29	29,2	30,9	202
510-04	Uruguay	Abszess	USA1100	IVc	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	34,6	31,5	32	33,8	143
27-05	HI	Wunde	USA800	IVc	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	40,7	27,8	28,1	29,8	373
CA46	CA	Blut	USA1000	IV	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	33,4	32,6	33,7	35,8	81
398-05	HI	Wunde	USA1000	IVb	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	33,6	32,8	33,4	35,9	59
N4151	NHANES	Nasal	USA800	IVb	+	MRSA POSITIV, SA POSITIV	34	30,7	31,2	32,9	101

* Probe 95:99: Nachdem die CHROMagar- und Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchungsergebnisse an die CDC übermittelt worden waren, zeigte sich, dass die Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung Probe 95:99 korrekt identifiziert hatte. Probe 95:99 wurde von den CDC falsch etikettiert. Probe 95:99 wurde im Rahmen der Xpert MRSA/SA-Blutkultur-Untersuchung korrekt als MRSA-negativ und SA-negativ ermittelt. Die Grenzwerte stellen den Mittelwert aus drei Replikaten dar. Die in den grauen Spalten enthaltenen Daten wurden Cepheid von Dr. Fred C. Tenover von den CDC zur Verfügung gestellt.

Analytische Sensitivität

Zusätzliche Studien wurden durchgeführt, um das 95 %-Vertrauensintervall für die Nachweisgrenze dieses Tests zu bestimmen. Die Nachweisgrenze ist definiert als die niedrigste Anzahl der kolonienbildenden Einheiten (CFU) pro Probe, die reproduzierbar von negativen Proben mit einer Zuverlässigkeit von 95 % unterschieden werden können. Sowohl für die MRSA- als auch die SA-Datenanalyse wurde ein maximal gültiger Zyklus von 36,0 eingestellt. Alle *spa*-, mecA- und SCC-Ergebnisse mit einem CT-Wert über 36,0 werden als negativ angegeben. Im Falle von MRSA (Zellen von Typ II) wurden 20 Replikate in sieben Konzentrationen (0, 50, 75, 100, 125, 150 und 200 CFU/Probe) ausgewertet. Im Falle von SA wurden 20 Replikate in sechs Konzentrationen (0, 20, 25, 40, 50 und 60 CFU/Probe) ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigen, dass unter den Bedingungen der Studie und unter Einstellung eines maximal gültigen Grenzwerts von 36,0, die Nachweisgrenzen-Bewertung im Falle von SA bei 48,0 CFU/Probe mit einem 95%igen Vertrauensintervall zwischen 42,4 CFU und 57,2 CFU liegt. Die Bewertung und die Zuverlässigkeitsstufen wurden unter Verwendung der logistischen Regression anhand von Daten (Anzahl der Positiven pro Anzahl der Tests auf jeder Stufe) ermittelt, die auf sechs Stufen (0, 20, 25, 40, 50 und 60 CFU/Probe) erfasst wurden. Es ist zu beachten, dass die analytische Nachweisgrenze im Falle von SA konservativ als 58 CFU/50 µl-Probe wiedergegeben wird.

Die Nachweisgrenzen-Bewertung im Falle von MRSA liegt bei 109,4 CFU/Probe mit einem 95%ige Vertrauensintervall zwischen 98,8 CFU und 128,2 CFU. Die Bewertung und die Zuverlässigkeitsstufen wurden unter Verwendung der logistischen Regression anhand von Daten (Anzahl der Positiven pro Anzahl der Tests auf jeder Stufe) ermittelt, die auf sieben Stufen (0, 50, 75, 100, 125, 150 und 200 CFU/Probe) erfasst wurden. Es ist zu beachten, dass die analytische Nachweisgrenze im Falle von MRSA konservativ als 130 CFU/50 µl-Probe wiedergegeben wird.

Die Konfidenzintervalle wurden mithilfe maximaler Wahrscheinlichkeitsbewertungen basierend auf den logistischen Modellparametern unter Verwendung der Varianz-Kovarianz-Matrix anhand großer Proben ermittelt.

Quellenangaben

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 und McKinney RW (eds) (1993). HHS Publikationsnummer (CDC) 93-8395.

7. Clinical and Laboratory Standards Institute (früher National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (siehe letzte Ausgabe).

8. McDougal L, Steward C, Killgore G, Chaitram J, McAllister S, Tenover F. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a national Database. J Clin Micro 2003;41(11):5113-20.

Unterstützung

Wenn Sie Unterstützung benötigen, wenden Sie sich mithilfe der folgenden Kontaktadressen an Cepheid. Geben Sie bei Ihrem Anruf bzw. in Ihrer E-Mail auf jeden Fall die Seriennummer des Instruments und die Chargen-ID des Reagenz an.

Nordamerika

Kontaktdaten für technischen Support:

Tel: +1.888.838.3222

E-Mail: techsupport@cepheid.com

Sie können den technischen Support von Cepheid montags bis freitags von 5:00 bis to 17:00 Uhr pazifischer Zeit erreichen.

EU

Kontaktdaten für technischen Support:

Tel: +33.563.82.53.19

E-Mail: techsupport@cepheideurope.fr

Andere Standorte

Wenden Sie sich an Ihre lokale Cepheid-Niederlassung.

Symboltabelle

Symbol	Bedeutung
REF	Katalog-Nr.
IVD	Medizinisches Gerät zur In-vitro-Diagnostik
	Nicht wiederverwenden
LOT	Chargencode
	Vorsicht, Begleitunterlagen beachten
	Hersteller
Σ	Reicht für <n> Tests
	Verfallsdatum
CONTROL	Kontrolle
EC REP	Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft
CE	CE-Kennzeichnung – EU
	Temperaturbegrenzung
	Biologische Risiken

Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Schweden

Hergestellt in Schweden

EC REP

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Frankreich

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

CE IVD

Español

Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

Denominación común

Ensayo de cultivos de sangre Xpert® MRSA/SA

Nombre común o de uso frecuente

Ensayo de cultivos de sangre MRSA/SA

Uso previsto

El ensayo Xpert® MRSA/SA de Cepheid realizado en el GeneXpert® Dx System es una prueba de diagnóstico cualitativa in vitro diseñada para una detección rápida y simultánea del *Staphylococcus aureus* (SA) y el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) a partir de pacientes con cultivos de sangre positivos. En esta prueba se utiliza una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real con el objeto de detectar el ADN del MRSA/SA. El ensayo Xpert MRSA/SA está pensado para ayudar a detectar e identificar MRSA/SA en botellas de cultivo de sangre positivo. El ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA está indicado para su uso conjunto con otras pruebas de laboratorio, como los cultivos, y con datos clínicos al alcance del médico como ayuda para la detección de MRSA/SA en los cultivos de sangre positivos del paciente. El subcultivo de sangre positivo resulta necesario a la hora de recuperar organismos para realizar pruebas de sensibilidad o para la clasificación epidemiológica. El ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA de Cepheid no está diseñado para supervisar tratamientos de infecciones por MRSA/SA.

Resumen y explicación

El *Staphylococcus aureus* (SA) es el principal patógeno nosocomial responsable de un amplio número de enfermedades entre las cuales se encuentran la endocarditis, osteomielitis, el síndrome de shock tóxico, intoxicación por alimentos, carbuncos y furúnculos. A principios de la década de 1950, la adquisición y expansión de los plásmidos productores de betalactamasa frustraron la efectividad de la penicilina para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus*. En 1959, se introdujo la meticilina, una penicilina sintética. Alrededor de los años sesenta, se identificaron las primeras cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina. Se determinó entonces que esto era el resultado de la adquisición por parte del *S. aureus* del gen *mecA*. Hoy en día, en EE. UU. el MRSA es responsable de, aproximadamente, un 25% de las infecciones nocosomiales, es más, están aumentando los informes de MRSA adquirido en la comunidad, lo cual repercute significativamente en la morbilidad y en la mortalidad. En un intento por limitar la extensión de estas infecciones, se están desarrollando e implementando estrategias y políticas de control en instalaciones médicas. El control del MRSA es el principal objetivo de la mayoría de los programas de control de infecciones hospitalarias. Actualmente, el método de supervisión estándar para detectar el MRSA es el cultivo. Este método es bastante laborioso y lleva bastante tiempo.[1,2,3,4,5]

Un método que ofrezca mayor rapidez y sensibilidad para la detección de MRSA y SA en botellas de cultivos de sangre positivos representará una ventaja definitiva para el tratamiento del paciente y el uso de antibióticos adecuados para el mismo.

Principio del procedimiento

El GeneXpert Dx System automatiza e integra la purificación de muestras, la amplificación del ácido nucleico y la detección de la secuencia objetivo en muestras sencillas o complejas mediante ensayos de PCR y TI-PCR en tiempo real. El sistema consta de un instrumento, un ordenador personal y un software cargado previamente para ejecutar pruebas y visualizar los resultados. Este sistema requiere el uso de cartuchos desechables de un solo uso para los reactivos y el proceso de PCR. Dado que los cartuchos son independientes, se elimina el riesgo de contaminación cruzada entre muestras. Si desea obtener una descripción detallada del sistema, consulte el *Manual del operador del GeneXpert Dx System*.

El ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA incluye reactivos para la detección del MRSA y el SA, así como el control de procesamiento de muestra (CPM) para el procesamiento adecuado de las bacterias diana y para supervisar la presencia de inhibidores en la PCR. Mediante la función de comprobación de sonda (PCC), se comprueba la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de PCR en el cartucho, la integridad de la sonda y la estabilidad del fluorocromo.

Los iniciadores y sondas del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA detectan secuencias exclusivas de la proteína A del estafilococo (*spa*), el gen resistente a la meticilina/oxacilina (*mecA*), y el cromosoma con casete de estafilococo *mec* (SCC*mec*) insertado en el sitio cromosómico (*attB*) del SA.

Reactivos e instrumentos

Material suministrado

El kit de ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA contiene suficientes reactivos para procesar diez especímenes o muestras de control de calidad. El kit incluye lo siguiente:

Cartuchos de ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA con tubos de reacción integrados	**10**
Microesferas 1,2 y 3 (liofilizadas)	**1 por cartucho**
Reactivo 1	**2,8 ml por cartucho**
Reactivo 2 (hidróxido de sodio)	**3,2 ml por cartucho**
Reactivo de dilución de ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA	
Reactivo de dilución (tiocianato de guanidina)	**1 x 2,0 ml por bolsa**
Pipetas desechables para transferencias pequeñas	**12**
CD	**1 por kit**

Archivo de definición del ensayo (ADF)

Instrucciones para importer el ADF en el sistema GX

Instrucciones

Notas:

- Las fichas de datos de seguridad (SDS, Safety Data Sheets) están disponibles en www.cepheid.com/tests-and-reagents/literature/msds o www.cepheidinternational.com/tests-and-reagents/literature/msds.
- La albúmina sérica bovina (BSA) en las microesferas contenidas en este producto se obtuvo exclusivamente a partir de plasma bovino originario de Estados Unidos. Asimismo, la fabricación de la BSA también se lleva a cabo en ese país. No se alimentó a los animales con proteínas de rumiante ni otras proteínas de origen animal; los animales fueron sometidos a pruebas ante y post mórtem. Durante el procesamiento no se produjo mezcla alguna del material con otras materias de origen animal.

Almacenamiento y manipulación

- Conserve los cartuchos y reactivos del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA a 2-28 °C.
- No utilice reactivos o cartuchos después de la fecha de caducidad indicada.
- No abra un cartucho hasta que esté preparado para realizar la prueba.
- Utilice el cartucho y los reactivos antes de que transcurran 30 minutos después de abrir la tapa del cartucho.
- No utilice los reactivos si observa que están turbios o se han decolorado.

Material necesario no suministrado

- GeneXpert Dx System (el número de referencia varía según la configuración): Instrumento GeneXpert, ordenador, lector manual de códigos de barras y Manual del operador
- Impresora (consulte el *Manual del operador del GeneXpert Dx System* para conocer las indicaciones sobre compatibilidad)
- Mezclador Vortex
- Pipetas de transferencia estéril desechables

Materiales disponibles, pero no suministrados

KWIK-STIKs™ de MicroBiologics, n.º de referencia 0158MRSA y n.º de referencia 0360MSSA como controles positivos, y n.º de referencia 0371MSSE (*Staphylococcus epidermidis* sensible a la meticilina) como control negativo.

Advertencias y precauciones

- Trate todas las muestras biológicas, incluidos los cartuchos usados, como posibles agentes transmisores de infecciones. Al ser con frecuencia imposible saber qué muestras podrían ser infecciosas, todas las muestras biológicas deben tratarse tomando las precauciones habituales. Las directrices para la manipulación de muestras se pueden consultar en U.S. Center for Disease Control and Prevention (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE. UU.)[6] y el Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio), anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards (Comité Nacional de Control de Estándares de Laboratorio).[7]
- Respete las medidas de seguridad establecidas por su institución al trabajar con productos químicos y manipular muestras biológicas.
- El ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA no proporciona resultados de sensibilidad. Se necesita tiempo adicional para los cultivos y para realizar pruebas de sensibilidad.
- No sustituya el reactivo del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA por ningún otro reactivo.
- No abra la tapa del cartucho del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA excepto cuando vaya a añadir la muestra y el reactivo, o a repetir la prueba.
- No utilice un cartucho que se haya caído o agitado después de haber añadido la muestra y el reactivo.
- No use un cartucho con un tubo de reacción dañado.
- Cada cartucho del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA de un solo uso se utiliza para procesar una prueba. No reutilice los cartuchos.
- Para eliminar correctamente los cartuchos usados y no utilizados reactivos, consulte al personal de su institución encargado de eliminar los residuos. Puede que este material tenga algunas características que requieran una eliminación de residuos específica contemplada en la Resource Conservation and Recovery Act (RCRA, o Ley de Conservación y Recuperación de Recursos) de la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. Compruebe la normativa local y estatal ya que estas pueden ser diferentes a las normativas de eliminación federales. Los centros que se encuentran fuera de EE. UU. deben comprobar los requisitos para la eliminación de residuos de su país.
- Conserve el kit del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA entre 2 y 28 °C.
- No abra un paquete de cartuchos hasta que esté preparado para realizar la prueba.
- El reactivo de elución contiene tiocianato de guanidina (H402, EUH301), que es nocivo para la vida acuática y el contacto con el ácido libera gas tóxico.
- El reactivo 2 contiene hidróxido de sodio (pH > 12,5); (H314), que es corrosivo para los ojos y la piel, y requiere el uso de protección ocular y cutánea.
- En el ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA se pueden emplear los siguientes medios de cultivo:
  - Medio BACTEC™ PEDS PLUS™/F
  - Medio BACTEC™ Plus Aerobic/F
  - Medio BACTEC™ Plus Anaerobic/F
  - Medio BACTEC™ Standard Anaerobic/F
  - Medio BACTEC™ Standard/10 Aerobic/F
  - Viales de cultivo BACTEC™ LYTIC/10 Anaerobic/F
  - BacT/ALERT SA standard aerobic de bioMérieux
  - BacT/ALERT SA standard anaerobic bioMérieux
  - VersaTREK REDOX 1® (aerobic)
  - VersaTREK REDOX 2® (anaerobic)
- Con el ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA no se pueden usar medios de cultivo que contengan carbón vegetal activo.
- Use solo botellas de cultivo de sangre que sean positivas para crecimiento microbiano con el ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA.

Recogida, transporte y almacenamiento de muestras

1. Tras la determinación positiva, retire las botellas de cultivos de sangre de la incubación. Se debería realizar una tinción de Gram en el cultivo de sangre positivo siguiendo el procedimiento estándar de laboratorio. Si no puede retirar la botella de cultivo de sangre del instrumento cuando se detecte por primera vez como positivo, retírela lo más pronto posible.
2. Para botellas de cultivos de sangre positivos que revelan cocos Gram-positivos en grupos (GPCC, por sus siglas en inglés) o cocos Gram-positivo únicos (GPC, por sus siglas en inglés) por tinción de Gram, retire una alícuota de 1 ml de un caldo bien mezclado y etiquételo con el Id. de la muestra.

Nota: Los resultados de los cultivos de sangre son vitales para el tratamiento del paciente. Siga las directrices y políticas establecidas de su laboratorio/institución para notificar los resultados del cultivo de sangre positiva (verbal, escritos o electrónicos) a los prestatarios de servicios médicos.

3. Si no va a realizar la prueba con el ensayo de cultivo de sangre Xpert MRSA/SA inmediatamente, guarde la alícuota a 2-8 °C en los 30 minutos posteriores a la retirada de la botella de cultivo de sangre. La alícuota de cultivo de sangre positiva debe probarse con el ensayo de cultivo de sangre Xpert MRSA/SA en menos de 4 horas desde la retirada de la botella positiva.

Procedimiento

Preparación del cartucho

Importante: Inicie la prueba en un plazo de 15 minutos después de añadir los reactivos al cartucho.

Para añadir la muestra y los reactivos al cartucho:

1. Extraiga el cartucho y los reactivos del envase.
2. Con la pipeta para transferencias pequeñas, trasfiera un gota de cultivo de sangre positivo (50 µl) al reactivo de dilución.
3. Cierre el tapón del vial de dilución y agite a alta velocidad durante 10 segundos.
4. Abra la tapa del cartucho. Utilice una pipeta de transferencia estéril y transfiera todo el contenido del reactivo de dilución al compartimento S del cartucho del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA.
5. Cierre la tapa del cartucho.

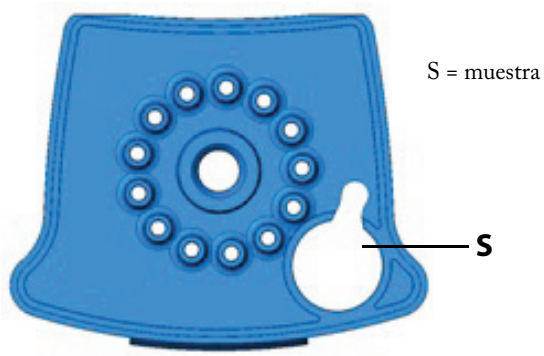

Figura 1. Cartucho del ensayo de cultivos de sangre MRSA/SA (vista superior)

Inicio de la prueba

Importante: Antes de empezar la prueba, asegúrese de que la definición del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA esté importada al software.

En esta sección se incluyen los pasos básicos para realizar la prueba. Si desea obtener instrucciones detalladas, consulte el *Manual del operador del GeneXpert Dx System.*

1. Encienda el instrumento GeneXpert Dx y, a continuación, encienda el ordenador. El software GeneXpert se iniciará automáticamente.
2. Inicie una sesión en el software del GeneXpert Dx System con su nombre de usuario y contraseña.
3. En la ventana del **GeneXpert Dx System**, haga clic en **Create Test** («**Crear prueba**»). Aparece el cuadro de diálogo **Scan Cartridge Barcode** («**Escanear código de barras de cartucho**»).

4. Escanee el código de barras del cartucho del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA. Aparece la ventana **Create Test** («**Crear prueba**»). Utilizando la información del código de barras, el software rellenará automáticamente los cuadros de los siguientes campos: Select Assay («Seleccionar ensayo»), Reagent Lot ID («Id. de lote de reactivos»), Cartridge SN («N.º de serie del cartucho») y Expiration Date («Fecha de caducidad»).
5. En el cuadro **Sample ID** («**ID de muestra**»), escanee o escriba el Id. de muestra. Asegúrese de escribir el Id. de muestra correcto. Este está asociado a los resultados de la prueba y se muestra en la ventana **View Results** («**Ver resultados**») y en todos los informes.
6. Haga clic en **Start Test** («**Iniciar prueba**»). En el cuadro de diálogo que aparece, escriba su contraseña.
7. Abra la puerta del módulo del instrumento mientras la luz esté parpadeando en verde y cargue el cartucho.
8. Cierre la puerta. La prueba se inicia y la luz verde deja de parpadear. Una vez finalizada la prueba, la luz se apaga.
9. Espere hasta que el sistema desbloquee la puerta para abrir la puerta del módulo y retirar el cartucho.
10. Los cartuchos usados deben desecharse en los contenedores de residuos de muestras apropiados de acuerdo con las prácticas estándar del centro.

Visualización e impresión de los resultados

Si desea obtener instrucciones detalladas sobre cómo ver e imprimir los resultados, consulte el *Manual del operador del GeneXpert Dx System® Dx*.

CONTROL

Control de calidad

Cada prueba incluye un control de procesamiento de muestra (CPM) y una control de comprobación de sonda (PCC).

Control de procesamiento de muestra (CPM): garantiza que la muestra se ha procesado correctamente. El CPM contiene esporas de *Bacillus globigii* en forma de «pastel» de espora seca que se incluye en cada cartucho para comprobar el adecuado procesamiento de la muestra del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA. El CPM comprueba si se ha producido la lisis de *Staphylococcus aureus* en caso de haber organismos y comprueba si el procesamiento de la muestra es correcto. Además, este control también detecta la inhibición asociada a las muestras del ensayo de PCR en tiempo real. El CPM debe ser positivo en una muestra negativa y puede ser negativo o positivo en una muestra positiva. El CPM es correcto si cumple los criterios de aceptación validados.

Control de comprobación de sonda (PCC): antes de iniciar la reacción en cadena de la polimerasa, el GeneXpert® Dx System mide la señal de fluorescencia de las sondas para controlar la rehidratación de las microesferas, el llenado del tubo de reacción, la integridad de la sonda y la estabilidad del fluorocromo. La comprobación de sonda es correcta si cumple los criterios de aceptación asignados.

- Controles externos — Pueden utilizarse KWIK-STIKs™ (MicroBioLogics, n.º de referencia 0158MRSA y n.º de referencia 0360SA como controles positivos, y n.º de referencia 0371MSSE 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 de control externo de MicroBioLogics descrito a continuación:
  1. Abra la bolsa por la ranura y retire el KWIK-STIK.
  2. Perfore la parte inferior de la ampolla con la tapa para liberar el líquido hidratante.
  3. Manténgala en posición vertical mientras la golpea ligeramente para facilitar el flujo del líquido a través del eje hasta el fondo de la unidad que contiene el precipitado.
  4. A fin de facilitar la disolución del precipitado celular liofilizado, aplástelo y frote suavemente contra el compartimento inferior.
  5. Tire del KWIK-STIK para liberar el hisopo e inserte este en el tubo que contiene el reactivo de dilución (tapón negro).
  6. El hisopo KWIK-STIK está preparado para la prueba del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA.

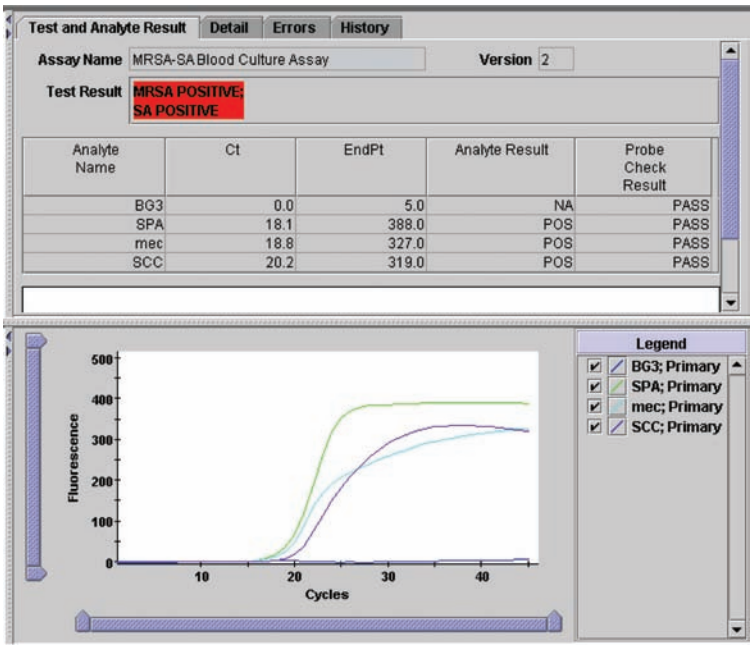

Figura 2. Ejemplo de resultado positivo

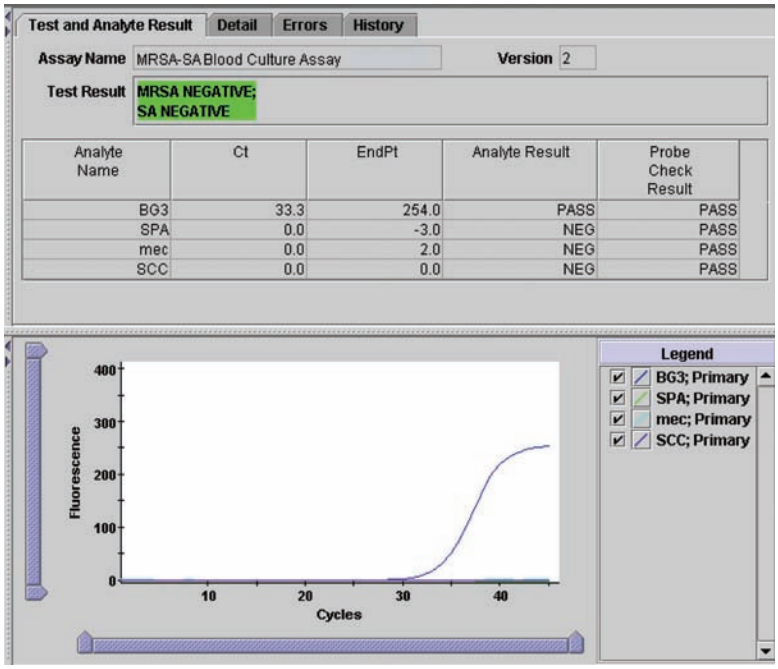

Figura 3. Ejemplo de resultado negativo

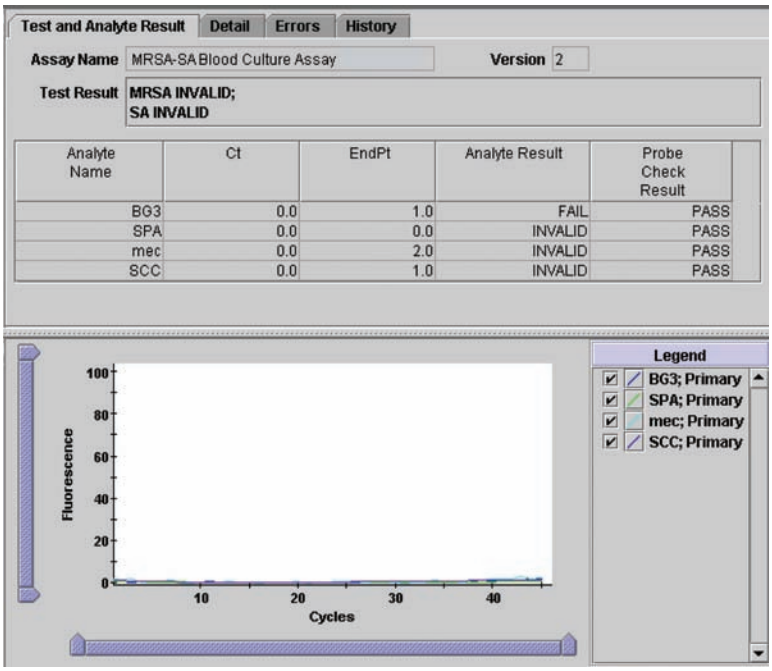

Figura 4. Ejemplo de resultado no válido

Interpretación de los resultados

El GeneXpert® Dx System interpola los resultados a partir de las señales de fluorescencia medidas y los algoritmos de cálculo integrados y se mostrarán en la ventana **View Results** (**«Ver resultados»**). Los resultados posibles son:

MRSA POSITIVE/SA POSITIVE («MRSA POSITIVO/SA POSITIVO»)

Se detectan secuencias de ADN diana del MRSA/se detecta secuencia de ADN diana del SA.

- MRSA POSITIVE («MRSA POSITIVO»): todos los MRSA diana tienen un Uc dentro del rango válido y un punto final por encima de los parámetros mínimos.
- SPC: NA («CPM: no aplicable»): el CPM se ignora porque la amplificación del MRSA puede competir con este control.
- Probe Check: PASS («Comprobación de sonda: APTA»): todos los resultados de la comprobación de sonda son aptos.

MRSA NEGATIVE/SA POSITIVE («MRSA NEGATIVO/SA POSITIVO»)

No se detectan secuencias de ADN diana del MRSA/se detecta secuencia de ADN diana del SA.

- SA POSITIVE («SA POSITIVO»): el SA diana tiene un Uc dentro del rango válido y un punto final por encima de los parámetros mínimos.
- SPC: NA («CPM: no aplicable»): el CPM se ignora porque la amplificación del SA puede competir con este control.
- Probe Check: PASS («Comprobación de sonda: APTA»): todos los resultados de la comprobación de sonda son aptos.

MRSA NEGATIVE/SA NEGATIVE («MRSA NEGATIVO/SA NEGATIVO»)

No se detecta secuencia de ADN diana del *Staphylococcus aureus*. El CPM cumple los criterios de aceptación.

- NEGATIVE («NEGATIVO»): no se detecta secuencia de ADN diana del *Staphylococcus aureus*.
- SPC: PASS («CPM: APTO»): el CPM tiene un Uc dentro del rango válido y un punto final por encima de los parámetros mínimos.
- Probe Check: PASS («Comprobación de sonda: APTA»): todos los resultados de la comprobación de sonda son aptos.

INVALID («NO VÁLIDO»)

Si la presencia o ausencia de secuencias diana de MRSA/SA no se puede determinar, repita la prueba con una nueva muestra. El CPM no cumple los criterios de aceptación, la muestra no se ha procesado correctamente o se ha inhibido la reacción en cadena de la polimerasa.

- INVALID («NO VÁLIDO»): no se puede determinar la presencia o ausencia de ADN de *Staphylococcus aureus*.
- SPC: FAIL («CPM: FALLIDO»): el resultado del CPM diana es negativo, la Uc de CPM no se encuentra dentro del rango válido y el punto final está por debajo de los parámetros mínimos.
- Probe Check: PASS («Comprobación de sonda: APTA»): todos los resultados de la comprobación de sonda son aptos.

ERROR

Si la presencia o ausencia de MRSA/SA no se puede determinar, repita la prueba con una nueva muestra. El control de comprobación de sonda ha fallado, probablemente debido a que el tubo de reacción se ha llenado de forma inadecuada, se ha detectado un problema de integridad de la sonda o se han excedido los límites de presión máxima.

- MRSA: NO RESULT («MRSA: SIN RESULTADO»)
- SA: NO RESULT («SA: SIN RESULTADO»)
- SPC: NO RESULT («CPM: SIN RESULTADO»)
- Probe Check: FAIL* («Comprobación de sonda: NO APROBADO*»): todas o una de las comprobaciones de la sonda han fallado.

*Si la comprobación de sonda es correcta, el error se deberá a un fallo de un componente del sistema.

NO RESULT («SIN RESULTADO»)

Si la presencia o ausencia de MRSA/SA no se puede determinar, repita la prueba con una nueva muestra. No se recogieron datos suficientes para conseguir un resultado de la prueba. Esto puede ocurrir, por ejemplo, si el operador detiene una prueba que estaba en progreso.

- MRSA: NO RESULT («MRSA: SIN RESULTADO»)
- SA: NO RESULT («SA: SIN RESULTADO»)
- SPC: NO RESULT («CPM: SIN RESULTADO»)
- Probe Check: NA («Comprobación de sonda: no aplicable»)

Motivos para repetir el ensayo

Si en la prueba obtiene alguno de los resultados anteriores, repítala usando un cartucho nuevo (no reutilice cartuchos). Realice de nuevo la prueba en las 3 horas posteriores a la obtención de un resultado indeterminado.

- Un resultado INVALID («NO VÁLIDO») indica que el control CPM ha fallado. La muestra no se ha procesado correctamente o se ha inhibido la PCR.
- Un resultado ERROR indica que el control de comprobación de la sonda ha fallado y que el ensayo ha sido anulado, probablemente debido a que el tubo de reacción se ha llenado de forma inadecuada, se ha detectado un problema de integridad del reactivo o se han superado los límites de presión máxima.
- Un NO RESULT («SIN RESULTADO») indica que no se han recogido suficientes datos. Por ejemplo, si el operador detiene una prueba en curso. Para volver a realizar la prueba:
  1. Transfiera el contenido restante del compartimento S al nuevo reactivo de dilución.
  2. Agite y añada todo el contenido del reactivo de dilución al compartimento S del nuevo cartucho del ensayo de cultivos de sangre MRSA/SA.
  3. Cierre la tapa e inicie la nueva prueba.

Limitaciones

- El rendimiento del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA se ha validado únicamente mediante los procedimientos suministrados con estas instrucciones. Las modificaciones de estos procedimientos pueden alterar el rendimiento de la prueba. Los resultados del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA se deben interpretar junto con otros datos clínicos y de laboratorio a disposición del médico.
- Con el ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA no se pueden usar medios de cultivo que contengan carbón vegetal activo.
- El ensayo de cultivos de sangre podría generar resultados MRSA negativos falsos al realizar las pruebas de *S. aureus* con resistencia límite a la oxacilina (BORSA, por sus siglas en inglés). Los mecanismos de la resistencia a la oxicilina que presentan las cepas BORSA tienen su origen en el aumento de producción de betalactamasa, no del gen *mecA*. Se considera que las cepas BORSA con MIC de oxicilina de 4-8 µg/ml presentan resistencia límite, pero el ensayo de cultivos de sangre MRSA/SA las identifica como MRSA negativo. Las cepas BORSA son poco comunes en EE. UU.
- El ensayo de cultivos de sangre podría generar resultados MRSA negativos falsos al realizar las pruebas de *S. aureus* modificados (MOD-SA). Los mecanismos de resistencia a la oxicilina de las cepas MOD-SA tienen su origen en los cambios producidos en la afinidad de las proteínas fijadoras de penicilina para la oxicilina, no el gen *mecA*. Se considera que las cepas MOD-SA con MIC de oxicilina de 4-8 µg/ml presentan resistencia límite, pero el ensayo de cultivos de sangre MRSA/SA las identifica como MRSA negativo. Las cepas MOD-SA son poco comunes en EE. UU.
- Se pueden obtener resultados erróneos debido a una recogida de muestras incorrecta, a que no se siga el procedimiento de recogida recomendado o los procedimientos de manipulación o almacenamiento de muestras recomendados, en caso de error técnico o mezcla de la muestra, o bien, debido a que el número de organismos sea demasiado reducido como para que la prueba los detecte. Es necesario el estricto cumplimiento de las instrucciones del embalaje para evitar resultados erróneos.
- Debido a que la detección de MRSA y SA depende del número de organismos presentes en la muestra, los resultados fiables dependen de la recogida, manipulación y almacenamiento correctos de las muestras.
- Un resultado de prueba positivo no indica necesariamente la presencia de organismos viables. No obstante, se puede suponer la presencia de MRSA o SA.
- La prueba del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA debe usarse como complemento a otros métodos disponibles.
- Las mutaciones o polimorfismos de los iniciadores o de las regiones de unión de la sonda pueden afectar a la detección de variantes nuevas o desconocidas de MRSA, lo que que genera un resultado falso negativo.
- En un cultivo mixto que contenga MRSA y SA, el límite de detección de MRSA es variable cuando hay presentes concentraciones extremadamente altas de SA. Se ha observado competición por parte de SA en una proporción de MRSA:SA de $1:1\times10^6$.
- El ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA generará un resultado falso positivo de MRSA cuando analice una muestra de cultivos de sangre con infección mixta que contenga *Staphylococcus* coagulasa-negativos sensibles a la meticilina (MRCNS, por sus siglas en inglés) y -Staphylococcus aureus *(SA) sensibles a la meticilina de casete vacío*.
- Como ocurre con todas las pruebas de diagnóstico in vitro basadas en PCR, se pueden detectar los niveles extremadamente bajos del elemento diana que caigan por debajo del límite de detección, pero los resultados podrían no ser reproducibles.
- Los resultados del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA pueden ser INVALID («NO VÁLIDOS») en ocasiones debido a un error en el control de CPM, ERROR o NO RESULT («SIN RESULTADO»); esto requiere volver a realizar la prueba, lo que puede llevar a un retraso en la obtención de resultados finales.

Sustancias interferentes

Se ha realizado un estudio para evaluar los efectos potencialmente inhibidores, si existieran, de sustancias detectadas en cultivos positivos de sangre mediante el ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA. Las sustancias potencialmente inhibidoras pueden incluir, ente otras, sangre y componentes de medios de cultivo de la misma. Se probaron las sustancias sin diluir en réplicas de tres con células MRSA situadas cerca del límite de detección analítico (~2,5 x LDA) y por encima (~10 x LDA).

- No se observaron efectos inhibidores en presencia del caldo de soja-caseína aerobio/anaerobio estándar de BACTEC™ (Becton Dickinson) que contiene el anticoagulante SPS de su medio "PLUS" aerobio/anaerobio con intercambio de iones y resinas absorbentes no iónicas para eliminar los antimicrobiales cuando se comparan con controles de búfer.
- No se observaron efectos inhibidores en presencia del caldo de soja tripticasa aerobio/anaerobio estándar BacT/ALERT® (bioMerieux) que contiene el anticoagulante SPS en comparación con los controles de búfer.
- No se observaron efectos inhibidores presentes en toda la sangre al compararlos con los controles de búfer.

Características de funcionamiento

Las características del funcionamiento del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA se determinaron en un estudio de investigación prospectivo realizado en cinco centros (cuatro de EE. UU. y uno de la Unión Europea). Se comparó el ensayo de cultivos de sangre MRSA/SA en el GeneXpert System (ensayo Xpert MRSA/SA) con cultivos. Los sujetos incluían individuos cuyos cultivos de sangre eran positivos para el crecimiento. El estudio incluía muestras de nueve botellas de cultivos diferentes de sangre adulta y una pediátrica. Las botellas de cultivos de sangre que contenían carbón vegetal se excluyeron.

Se probó una alícuota de cada botella de cultivo de sangre con el ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA y con cultivo. Los métodos de cultivo variaban entre los centros, aunque la susceptibilidad a la oxacilina/meticilina se determinó en todos mediante una prueba de difusión de disco mediante un disco de 30 µg de cefoxitina y un límite de 21/22 mm.

El rendimiento del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA se calculó en relación con los resultados del cultivo.

Resultados generales

Se sometieron a la prueba de MRSA y SA por Xpert y cultivo un total de 406 muestras; 212 de EE. UU y 194 de la UE.

El ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA identificó un 98,3% de las muestras positivas para MRSA y un 99,4% de las muestras negativas para MRSA relativas al método de cultivo. En las muestras sometidas a prueba, el valor diagnóstico de resultado positivo fue un 96,6% y el valor diagnóstico de resultado negativo para MRSA, un 99,7%.

El ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA identificó un 100% de las muestras positivas para SA y un 98,6% de las muestras negativas para SA relativas al método de cultivo. En las muestras sometidas a prueba, el valor diagnóstico de resultado positivo para SA fue un 96,7% y el valor diagnóstico de resultado negativo para SA, un 100%.

Tabla 1. MRSA: centros de EE. UU. y de la UE combinados

		Cultivo +	Cultivo -			
Ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA	+	57	2	59	Sens.	98.3%
	-	1*	346	347	Espec.	99.4%
		58	348	406		

* La muestra de falso negativo obtenida en el ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA se investigó posteriormente con la prueba de aglutinación de látex PBP2a (Oxiod, GB) mediante métodos de laboratorio estándar. Los resultados de la prueba antes mencionada mostraron que esta aislada tuvo una superproducción de penicilinasa y que fue erróneamente identificada por el cultivo como MRSA.

Tabla 2. SA: centros de EE. UU. y de la UE combinados

		Cultivo +	Cultivo -			
Ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA	+	120	4	124	Sens.	100%
	-	0	282	282	Espec.	98.6%
		120	286	406		

Especificidad analítica

Se analizaron los cultivos pertenecientes a 98 cepas de los organismos American Type Culture Collection (ATCC) y Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA, por sus iglas en inglés), que representan especies relacionadas filogenéticamente con el *S. Aureus* o detectadas en medios hospitalarios, 29 cepas de estafilococo coagulasa-negativo sensible a la meticilina y 9 cepas de estafilococo coagulasa-negativo resistente a la meticilina usando el ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA. Los organismos analizados estaban representados por las siguientes especies: 74 Gram positivas, 28 Gram negativas, 3 hongos, 95 aerobias y 10 anaerobias. Dos o más réplicas de cada cepa se probaron con unidades McFarland de 1,7-3,2. Bajo las condiciones del estudio, todas las cepas mostraron el MRSA y el SA negativos y ninguna de las mismas fue detectada por el ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA. Se incluyeron en el estudio controles positivos y negativos. La especificidad fue del 100%.

Ubicuidad analítica (inclusividad)

La ubicuidad analítica (inclusividad) del ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA se determinó mediante 25 cepas de *Staphylococcus aureus* proporcionadas por el dr. Fred C. Tenover en los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés). Estos especímenes se consideran representativos de cepas de MRSA y SASM detectadas actualmente en la comunidad médica. Todas las cepas se evaluaron por triplicado mediante 100 µl de suspensiones celulares en fase estacionaria diluidas en diez millones. El panel está formado por cepas de MSSA que representan los tipos del SCC *mec* II, IV, IVa, IVb y IVc, además de varios tipos desconocidos. Los datos ofrecidos por el CDC indican que estas cepas, cuando se caracterizan por electroforesis en gel de campos pulsados (EGCP), representan numerosos tipos de EE. UU., incluidos USA 100, la cepa más común de las adquiridas en hospitales, y USA 300 y 400, las cepas más comunes de las adquiridas en la comunidad.[8]

Como muestra la Tabla 3, todas las cepas de MRSA evidenciaron de forma correcta un MRSA y SA positivos mediante el ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA. Además, cada cepa de SASM mostraba de forma correcta el MRSA negativo y el SA positivo. Cuando se informó al CDC sobre los resultados obtenidos por CHROMagar y el ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA, se reveló que este no había identificado de forma incorrecta la muestra 95:99. El CDC había cometido un error con respecto al etiquetado de dicha muestra. LA muestra 95:99 indicó de forma correcta un MRSA negativo y un SA negativos con el ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA. Las unidades formadoras de colonias por ensayo se determinaron en conteos de placas por duplicado.

Tabla 3. Ubicuidad analítica del ensayo de cultivos de sangre Xpert™ MRSA/SA

Id. del labora-torio	Remitente	Fuente	Tipo de EGCP	Tipo de *mec* del SCC	Resultados de MRSA de CHROMagar	Resultados del ensayo de Xpert MRSA/SA BC	CPM Uc	*spa* Uc	*mecA* Uc	SCC Uc	UFC por ensayo
94:1013	VT	Lesión cutánea	USA 1.000	IV	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34.7	30.7	31	32.6	152
*95:99	CT	Sangre	USA 500	IV	-	MRSA NEGATIVO; SA NEGATIVO	34.1	0	0	0	37
96:308	NM	Deposición	USA 900	SASM	-	MRSA NEGATIVO; SA POSITIVO	34	29.4	0	0	201
96:281	NC	Sangre	USA 200	II	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33.4	33.6	34	35.3	101
148-99	NY	Sangre	USA 600	II	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34.3	33.2	33.1	35.2	43
182-99	MN	Descono-cido	USA 400	IVa	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	43.7	26.7	27.1	28.7	417
18626	OH	Sangre	USA 100	II	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34.8	30.7	31	32.7	138
0:50	TN	Deposición	USA 600	no indicado	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33.6	31.2	31.4	33.2	115
0-25-4	MS	Nasal	USA 700	IVa	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	35.5	29.1	29.3	30.9	178
0-25-37	MS	Piel/tejido blando	USA 300	IVa	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34.7	32.3	32.7	34.2	94
1-1-81	WA	Nasal	USA 400	no indicado	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34.3	33	33.7	35.5	106
1-1-493	WA	Herida	USA 800	IV	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33.7	31.5	31.7	33.4	113
N7129	NHANES	Nasal	USA 900	SASM	-	MRSA NEGATIVO; SA POSITIVO	34.3	29.9	0	0	84
107-03	NV	Sangre	USA 200	no indicado	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34	33	33.3	34.9	99
GA201	GA-ABC	Descono-cido	USA 100	II	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33.6	32.3	32.4	34	95
GA217	GA-ABC	Descono-cido	USA 300	IVb	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33.6	30.8	31.2	33	121
GA229	GA-ABC	Desconocido	USA 500	IV	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	37.8	31.7	31.9	33.3	81
7031	AK	Absceso	USA 1.100	IVa	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34.2	30.8	31.5	32.9	73
102-04	CA	Nasal	USA 1.200	SASM	-	MRSA NEGATIVO; SA POSITIVO	33.9	29.4	0	0	110
8-03	WI	Descono-cido	USA 700	no indicado	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33.3	29	29.2	30.9	202
510-04	Uruguay	Absceso	USA 1.100	IVc	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34.6	31.5	32	33.8	143
27-05	HI	Herida	USA 800	IVc	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	40.7	27.8	28.1	29.8	373
CA46	CA	Sangre	USA 1.000	IV	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33.4	32.6	33.7	35.8	81
398-05	HI	Herida	USA 1.000	IVb	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33.6	32.8	33.4	35.9	59
N4151	NHANES	Nasal	USA 800	IVb	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34	30.7	31.2	32.9	101

* Muestra 95:99: cuando se informó al CDC sobre los resultados obtenidos por CHROMagar y el ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA, se reveló que este había identificado de forma correcta la muestra 95:99. El CDC había cometido un error con respecto al etiquetado de dicha muestra. La muestra 95:99 indicó de forma correcta un MRSA negativo y un SA negativos con el ensayo de cultivos de sangre Xpert MRSA/SA. Los valores de Uc representan la media de tres réplicas. El dr. Fred C. Tenover, del CDC, proporcionó la información incluida en las columnas grises a Cepheid.

Sensibilidad analítica

Se han llevado a cabo estudios adicionales para determinar un intervalo de confianza del 95% para el límite de detección (LDA) analítico de este ensayo. El límite de detección se define como el número más bajo de unidades formadoras de colonias (UFC) por muestra que puede distinguirse, de forma reproducible, a partir de muestras negativas con un 95% de confianza. Se establece un ciclo válido máximo de 36,0 para los análisis de datos de MRSA y SA. Cualquier resultado de *spa*, mecA o SCC con un valor de Uc superior a 36,0 se considera negativo. En el caso del MRSA (células de tipo II), se evaluaron réplicas de veinte con siete concentraciones (0, 50, 75, 100, 125, 150 y 200 UFC/muestra). Para el SA, se evaluaron réplicas de veinte con seis concentraciones (0, 20, 25, 40, 50 y 60 UFC/muestra).

Bajo las condiciones del estudio, y mediante un Uc máximo establecido de 36,0, los resultados indican que el punto de LAD estimado para el SA es de 48,0 UFC/muestra con un intervalo de confianza que oscila entre 42,4 y 57,2 UFC. Los niveles de estimación y confianza se determinaron mediante una regresión logística con datos (número de positivos por número de pruebas en cada nivel) tomados en seis niveles (0, 20, 25, 40, 50 y 60 UFC/muestra). Observe que el LAD analítico para el SA se muestra de forma conservadora a 58 UFC/50 µl por muestra.

El punto de LAD estimado para el MRSA es de 109,4 UFC/muestra con un intervalo de confianza del 95% que oscila entre 98,8 y 128,2 UFC. Los niveles de estimación y confianza se determinaron mediante una regresión logística con datos (número de positivos por número de pruebas en cada nivel) tomados en siete niveles (0, 50, 75, 100, 125, 150 y 200 UFC/muestra). Observe que el LAD analítico para el MRSA se muestra de forma conservadora a 130 UFC/50 µl por muestra.

Los intervalos de confianza se determinaron con estimaciones de probabilidad máxima según los parámetros del modelo logístico, mediante la matriz de varianza-covarianza de muestras de gran tamaño.

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 ál. 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 y McKinney RW (eds) (1993). Número de publicación del HHS (Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU.) (CDC) 93-8395.

7. Clinical and Laboratory Standards Institute (anteriormente denominado National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (consultar la última edición).

8. McDougal L, Steward C, Killgore G, Chaitram J, McAllister S, Tenover F. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a national Database. J Clin Micro 2003; 41(11): 5113-20.

Asistencia

Si desea obtener asistencia, póngase en contacto con Cepheid usando los datos de contacto siguientes. No olvide facilitar el número de serie del instrumento y el Id. del lote de reactivos si realiza una llamada o envía un correo electrónico.

Estados Unidos

Para acceder al servicio técnico, utilice los siguientes datos de contacto:

Tel.: +1.888.838.3222

Correo electrónico: techsupport@cepheid.com

Puede ponerse en contacto con el servicio de asistencia técnica de Cepheid por teléfono de lunes a viernes, de 5 de la mañana a 5 de la tarde (hora del Pacífico).

Unión Europea

Para acceder al servicio técnico, utilice los siguientes datos de contacto:

Tel.: +33.563.82.53.19

Correo electrónico: techsupport@cepheideurope.fr

Otras oficinas

Póngase en contacto con su representante local de Cepheid.

Tabla de símbolos

Símbolo	Significado
REF	Número de referencia
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	No reutilizar
LOT	Código de lote
	Precaución, consultar los documentos adjuntos
	Fabricante
Σ	Contiene cantidad suficiente para <n> pruebas
	Fecha de caducidad
CONTROL	Control
EC REP	Representante autorizado en la Comunidad Europea
CE	Marca CE – Comunidad Europea
	Limitaciones de temperatura
	Riesgos biológicos

Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Suecia

Producto de Suecia

EC REP

Cepheid Europa
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francia

Tel.: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
Correo electrónico: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Italiano

Dispositivo medico per diagnostica in vitro

Nome registrato

Saggio Xpert® MRSA/SA per emocoltura

Nome comune o usuale

Saggio MRSA/SA per emocoltura

Uso previsto

Il saggio Cepheid Xpert MRSA/SA, eseguito con GeneXpert® Dx System, è un test diagnostico *in vitro* qualitativo, progettato per il rilevamento rapido e simultaneo dello *Staphylococcus aureus* (SA) e dello *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) in pazienti con emocolture positive. Il test utilizza la reazione a catena della polimerasi o PCR (Polymerase Chain Reaction) in tempo reale automatizzata per il rilevamento del DNA dell MRSA/SA. L'utilizzo del saggio XpertMRSA/SA è destinato al rilevamento e all'identificazione dell'MRSA/SA da flaconi per emocoltura positiva. L'utilizzo del saggio XpertMRSA/SA per emocoltura è indicato in associazione ad altri test di laboratorio (ad es. colture) e ai dati clinici a disposizione del medico come ausilio per il rilevamento dell'MRSA/SA da emocolture positive. La subcoltura di emocolture positive è necessaria per il recupero degli organismi per test di sensibilità o tipizzazionee pidemiologica. Il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura non è destinato al monitoraggio del trattamento delle infezioni da MRSA/SA.

Riepilogo e spiegazione

Lo *Staphylococcus aureus* (SA) è un importante patogeno nosocomiale che causa diverse malattie: endocardite, osteomielite, sindrome da shock tossico, intossicazione alimentare, carbonchio cutaneo e foruncoli. All'inizio degli anni Cinquanta, l'acquisizione e la diffusione dei plasmidi che producono beta-lattamasi contrastavano l'efficacia della penicillina per il trattamento delle infezioni da *S. aureus*. Nel 1959 fu introdotta la meticillina, una penicillina sintetica. Nel 1960 furono identificati ceppi di *S. aureus* resistenti alla meticillina. È stato stabilito che si tratta del risultato dell'acquisizione del gene *mecA* da parte dello *S. aureus*. Attualmente, negli Stati Uniti l'MRSA è responsabile di circa il 25% delle infezioni nosocomiali e i casi riportati di MRSA contratto in comunità sono in aumento, determinando morbidità e mortalità significative. Nel tentativo di limitare la diffusione di queste infezioni, è in corso lo sviluppo e l'applicazione di strategie e politiche di controllo negli ambienti sanitari. Il controllo dell'MRSA è l'obiettivo principale della maggior parte dei programmi di controllo delle infezioni nosocomiali. Attualmente, il metodo di sorveglianza standard per il rilevamento dell'MRSA è la coltura, un sistema molto laborioso che richiede tempo.[1,2,3,4,5]

Un metodo rapido e più sensibile per il rilevamento dell'MRSA e dell'SA da flaconi per emocoltura positiva apporterà notevoli benefici nella gestione del paziente e nell'uso degli antibiotici appropriati per il trattamento.

Principio della procedura

GeneXpert Dx System consente di automatizzare e integrare la purificazione dei campioni, l'amplificazione degli acidi nucleici e il rilevamento della sequenza bersaglio in campioni semplici o complessi tramite saggi PCR e RT-PCR in tempo reale. Il sistema è composto da uno strumento e un personal computer con apposito software già installato per l'esecuzione delle analisi e la visualizzazione dei risultati. Il sistema richiede l'impiego di cartucce monouso che contengono i reagenti per la PCR e in cui avviene il processo PCR. Poiché le cartucce sono indipendenti, non sussiste alcun rischio di contaminazione incrociata tra campioni. Per una descrizione completa del sistema,consultare il *Manuale delloperatoreGeneXpertDxSystem.*

Il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura include reagenti per il rilevamento dell'MRSA e dell'SA e un controllo del trattamento del campione (SPC) per verificare l'efficacia del trattamento dei batteri bersaglio e per monitorare la presenza di inibitori nella reazione PCR. I ltest dicontrollo della sonda (PCC) verifica la reidratazione dei reagenti, il riempimento della provetta PCR nella cartuccia, l'integrità della sonda e la stabilità del colorante.

I primer e le sonde nel saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura rilevano sequenze brevettate per la proteina A stafilococcica (*spa*), il gene per la resistenza alla meticillina/oxacillina (*mecA*) e il cromosoma nella cassetta stafilococcica *mec* (SCC*mec*) inserito nel sito *attB* cromosomico d'ellSA.

Reagenti e strumenti

Materiale fornito

Il kit del saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura contiene reagenti sufficienti per il trattamento di 10 campioni o saggi per controllo qualità. Il kit contiene il seguente materiale:

Cartucce per saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura con provette di reazione integrate	**10**
Microsfere 1, 2, e 3 (liofilizzate)	**1 per cartuccia**
Reagente 1	**2,8 ml per cartuccia**
Reagente 2 (idrossido di sodio)	**3,2 ml per cartuccia**
Reagente di eluzione per saggio Xpert MRSA/SA per emocultura	
Reagente di eluizione (tiocianato di guanidinio)	**1 x 2,0 ml per busta**
Pipettine di trasferimento monouso	**12**
CD	**1 per kit**

File di Definizione del Saggio (ADF)

Istruzioni per importare ADF in sistema GX

Fogliett illustrativo

Note:

- Le schede dati di sicurezza (SDS) sono disponibili nei siti www.cepheid.com/tests-and-reagents/literature/msds o www.cepheidinternational.com/tests-and-reagents/literature/msds.
- L'albumina di siero bovino (BSA) nelle microsfere di questo prodotto è stata prodotta esclusivamente da plasma bovino di origine statunitense. Anche la produzione della BSA avviene negli Stati Uniti. Gli animali non sono stati nutriti con proteine bovine o altre proteine animali e hanno superato i test ante e post mortem. Durante la preparazione, il materiale non è stato mescolato con altro materiale animale.

Conservazione e manipolazione

- Conservare le cartucce e i reagenti per saggio Xpert RSA/SA per emocoltura a 2-28 °C.
- Non adoperare cartucce o reagenti scaduti.
- Aprire la cartuccia subito prima di eseguire l'analisi.
- Utilizzare la cartuccia e i reagenti entro 30 minuti dall'apertura del coperchio della cartuccia.
- Non adoperare reagenti torbidi o scoloriti.

Materiali necessari ma non forniti

- GeneXpert Dx System (il numero di catalogo varia in base alla configurazione): strumento GeneXpert, computer, penna per lettura di codici a barre e manuale dell'operatore
- Stampante (per le linee-guida sulla compatibilità, consultare il *Manuale dell'operatore GeneXpert Dx System*)
- Miscelatore vortex
- Pipette di trasferimento sterili monouso

Materiali disponibili ma non forniti

KWIK-STIKs™ dal catalogo MicroBiologics n. 0158MRSA e n. 0360MSSA come controlli positivi e n. 0371MSSE (*Staphylococcus epidermidis* sensibile alla meticillina) come controllo negativo.

Avvertenze e precauzioni

- Tutti i campioni biologici di analisi, comprese le cartucce usate, devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi. Poiché è spesso impossibile sapere quale campione potrebbe essere infetto, tutti i campioni biologici di analisi devono essere trattati adottando le precauzioni standard. Le linee-guida per la manipolazione dei campioni sono disponibili presso i CDC (Centri per la prevenzione e il controllo delle malattie)[6] e il Clinical and Laboratory Standards Institute (ex National Committee for Clinical Laboratory Standards).[7]
- Attenersi alle procedure di sicurezza del proprio istituto relative alla manipolazione di sostanze chimiche e di campioni biologici.
- Il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura non fornisce risultati sulla sensibilità. L'esecuzione della coltura e il test di sensibilità richiedono tempi aggiuntivi.
- Non sostituire il reagente del saggio Xpert MRSA/SA per emocultura con altri reagenti.
- Non aprire il coperchio della cartuccia del saggio Xpert MRSA/SA per emocultura se non per l'aggiunta di campioni e reagenti o per la ripetizione del test.
- Non utilizzare le cartucce dopo averle fatte cadere o agitate in seguito all'aggiunta di campioni e reagenti.
- Non adoperare cartucce la cui provetta di reazione è danneggiata.
- Ogni cartuccia monouso per saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura si utilizza per una sola analisi. Non riutilizzare cartucce usate.
- Per il corretto smaltimento delle cartucce usate e dei reagenti inutilizzati, rivolgersi al personale addetto allo smaltimento dei rifiuti ambientali del proprio istituto. Questo materiale può rientrare tra i rifiuti pericolosi di cui alla normativa RCRA (Resource Conservation and Recovery Act) dell'EPA (Environmental Protection Agency), l'ente federale statunitense per la protezione dell'ambiente, e richiedere requisiti di smaltimento specifici. Controllare le normative nazionali e locali, in quanto potrebbero essere diverse da quelle in materia di smaltimento vigenti negli Stati Uniti. Gli istituti al di fuori degli Stati Uniti devono controllare i requisiti sullo smaltimento dei rifiuti pericolosi previsti nel proprio paese.
- Conservare il kit per saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura a 2-28 °C.
- Aprire una confezione di cartucce subito prima di eseguire l'analisi.
- Il reagente di eluizione contiene guanidina tiocianato (H402, EUH301), sostanza pericolosa per gli organismi acquatici e che a contatto con gli acidi sprigiona gas tossici.
- Il reagente 2 contiene idrossido di sodio (pH > 12,5), (H314), sostanza corrosiva per gli occhi e la pelle che richiede l'impiego di apposite protezioni.
- Con il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura è possibile utilizzare i seguenti terreni di emocoltura:
  - Terreno BACTEC™ PEDS PLUS™/F
  - Terreno BACTEC™ Plus Aerobic/F
  - Terreno BACTEC™ Plus Anaerobic/F
  - Terreno BACTEC™ Standard Anaerobic/F
  - Terreno BACTEC™ Standard/10 Aerobic/F
  - Flaconi di coltura BACTEC™ LYTIC/10 Anaerobic/F
  - bioMérieux BacT/ALERT SA standard aerobico
  - bioMérieux BacT/ALERT SN standard anaerobico
  - VersaTREK REDOX 1® (aerobico)
  - VersaTREK REDOX 2® (anaerobico)
- Con il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura non è possibile utilizzare terreni di emocoltura contenenti carbone attivo.
- Con il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura analizzare solo flaconi per emocoltura positivi per la crescita microbica.

Raccolta, trasporto e conservazione del campione

1. Quando viene determinata la positività, rimuovere i flaconi per emocoltura dal'lincubazione. Eseguire una colorazione di Gram dall'emocoltura positiva seguendo la procedura standard del proprio laboratorio. Se non è possibile rimuovere il flacone per emocoltura dallo strumento quando viene rilevato positivo per la prima volta, rimuoverlo comunque non appena possibile.
2. Per i flaconi per emocoltura positivi che mostrano cocchi Gram-positivi in cluster (GPCC) o cocchi Gram-positivi singoli (GPC) a seguito di colorazione di Gram, rimuovere un'aliquotadi 1 ml del brodo ben miscelato ed etichettarla con l'ID campione.

Note: I risultati delle emocolture sono fondamentali per la cura del paziente. Seguire le linee-guida e le procedure del proprio laboratorio/istituto per la segnalazione dei risultati delle emocolture positive (verbalmente, per iscritto o elettronicamente) al personale sanitario.

3. Se il test con il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura non viene eseguito immediatamente, conservare l'aliquota a 2-8 °C non oltre 30 minuti dalla rimozione dal flacone per emocoltura. L'aliquota positiva dell'emocoltura deve essere analizzata con il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura entro 4 ore dalla rimozione dal flacone positivo.

Procedura

Preparazione della cartuccia

Importante: Cominciare l'analisi entro 15 minuti dall'aggiunta dei reagenti nella cartuccia.

Per aggiungere il campione e i reagenti nella cartuccia:

1. Rimuovere la cartuccia e i reagenti dalla confezione.
2. Utilizzando la pipettina di trasferimento, trasferire una goccia di emocoltura positiva (50 µl) nel reagente di eluizione.
3. Chiudere il coperchio del flacone di eluizione e vortexare ad alta velocità per 10 secondi.
4. Aprire il coperchio della cartuccia. Adoperando una pipetta di trasferimento sterile, trasferire tutto il contenuto del reagente di eluizione nella camera "S" della cartuccia del saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura.
5. Chiudere il coperchio della cartuccia.

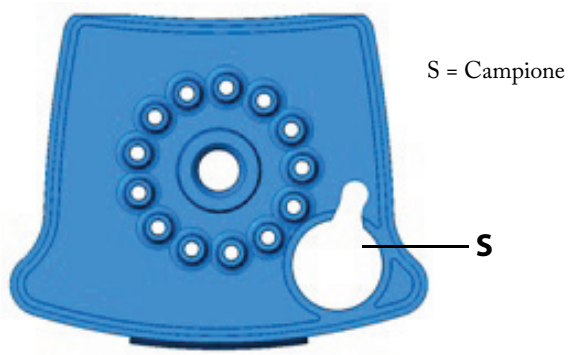

Figura 1. Cartuccia del saggio MRSA/SA per emocoltura (vista dall'alto)

Inizio dell'analisi

Importante: Prima di cominciare l'analisi, accertarsi che il file di definizione del saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura sia stato importato nel software.

In questa sezione sono elencati i passaggi base per l'esecuzione dell'analisi. Per istruzioni dettagliate, consultare il *Manuale dell'operatore GeneXpert Dx System*.

1. Accendere lo strumento GeneXpert Dx e successivamente il computer; il software GeneXpert si avvia automaticamente.
2. Accedere al software GeneXpert Dx System con nome utente e password.
3. Nella finestra **GeneXpert Dx System**, fare clic su **Create Test** (**Crea analisi**). Viene visualizzata la finestra di dialogo **Scan Cartridge Barcode** (**Analizza codice a barre cartuccia**).

4. Eseguire la scansione del codice a barre sulla cartuccia del saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura. Viene visualizzata la finestra **Create Test** (**Crea analisi**). Utilizzando le informazioni del codice a barre, il software riempie automaticamente le caselle dei seguenti campi: Select Assay (Seleziona saggio), Reagent Lot ID (ID lotto reagenti), Cartridge SN (Cartuccia SN) ed Expiration Date (Data di scadenza).
5. Nella casella **Sample ID** (**ID campione**), eseguire la scansione o digitare correttamente l'ID del campione. L'ID del campione è associato ai risultati dell'analisi e appare nella finestra **View Results** (**Visualizza risultati**) e in tutti i referti.
6. Fare clic su **Start Test** (Avvia analisi). Nella finestra di dialogo visualizzata, digitare la password.
7. Aprire lo sportello del modulo dello strumento con la spia verde lampeggiante e caricare la cartuccia.
8. Chiudere lo sportello. L'analisi viene avviata e la spia verde smette di lampeggiare. Altermine dell'analisi, la spia si spegne.
9. Attendere che il sistema sblocchi il meccanismo di chiusura dello sportello prima di aprire lo sportello del modulo e rimuovere la cartuccia.
10. Le cartucce utilizzate devono essere smaltite negli appositi contenitori per rifiuti in base alle procedure standard del proprio istituto.

Visualizzazione e stampa dei risultati

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

CONTROL

Controllo qualità

Ogni analisi include un controllo del trattamento del campione (SPC) e un test di controllo della sonda (PCC).

Controllo del trattamento del campione (SPC): garantisce il corretto trattamento del campione. L'SPC contiene le spore del *Bacillus globigii* sotto forma di tavoletta di spore secche in ogni cartuccia per la verifica del corretto trattamento campione per saggio Xpert MRSA/SA. LSPC consente di accertarsi che si sia verificata la lisi dello *Staphylococcus aureus* in presenza di organismi, e di verificare la correttezza del trattamento del campione. Questo controllo, inoltre, rileva l'inibizione associata al campione del saggio PCR in tempo reale. L'SPC deve essere positivo in un campione negativo e può essere negativo o positivo in un campione positivo. L'SPC è superato se soddisfa i criteri di accettazione convalidati.

Test di controllo della sonda (PCC): prima dell'inizio della reazione PCR, GeneXpert® Dx System misura il segnale di fluorescenza dalle sonde permonitorare la reidratazione delle microsfere, il riempimento della provetta direazione, l'integrità della sonda e la stabilità del colorante. Il controllo dellas onda è superato se soddisfa i criteri di accettazione stabiliti.

- Controlli esterni : KWIK-STIKs™ (MicroBioLogics, numero di catalogo 0158MRSA e 0360SA come controlli positivi e 0371MSSE come controllo negativo) possono essere usati per addestramento, test di competenza e controllo qualità esterno di GeneXpert® Dx System. Possono essere usati controlli esterni, in conformità con gli organismi di accreditamento locali, regionali e nazionali pertinenti. Attenersi alla procedura per il controllo esterno MicroBioLogics descritta di seguito:
  1. Strappare a livello della tacca per aprire la busta e rimuovere il KWIK-STIK.
  2. Comprimere la parte inferiore della fiala nel tappo per rilasciare il liquido idratante.
  3. Tenere in posizione verticale e picchiettare delicatamente per facilitare il flusso del liquido attraverso il collo nella parte inferiore dell'unità contenente il pellet.
  4. Per facilitare lo scioglimento del pellet di cellule liofilizzato, schiacciare il pellet e stringere delicatamente la parte inferiore della camera.
  5. Staccare il KWIK-STIK per rilasciare il tampone e inserirlo nella provetta contenente il reagente di eluizione (tappo nero).
  6. Il tampone KWIK-STIK, a questo punto, è pronto per il test per saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura.

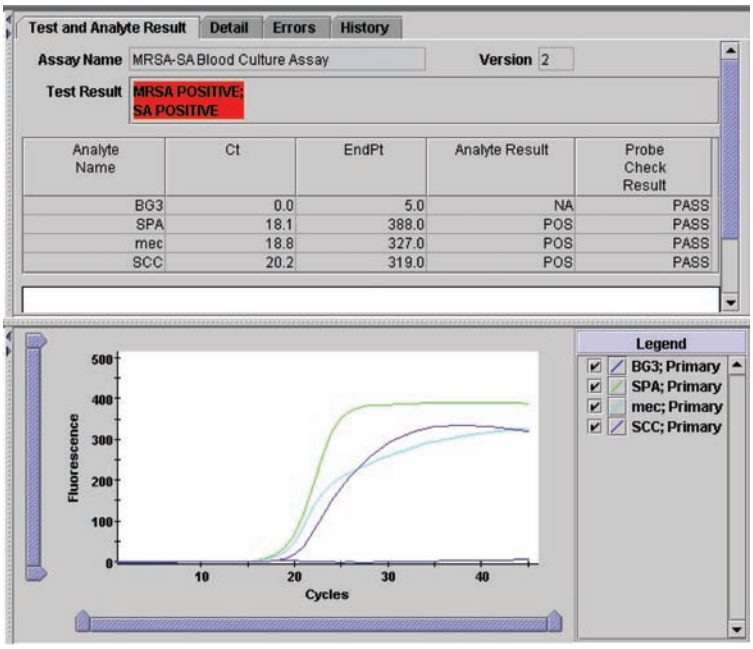

Figura 2. Esempio di risultato positivo

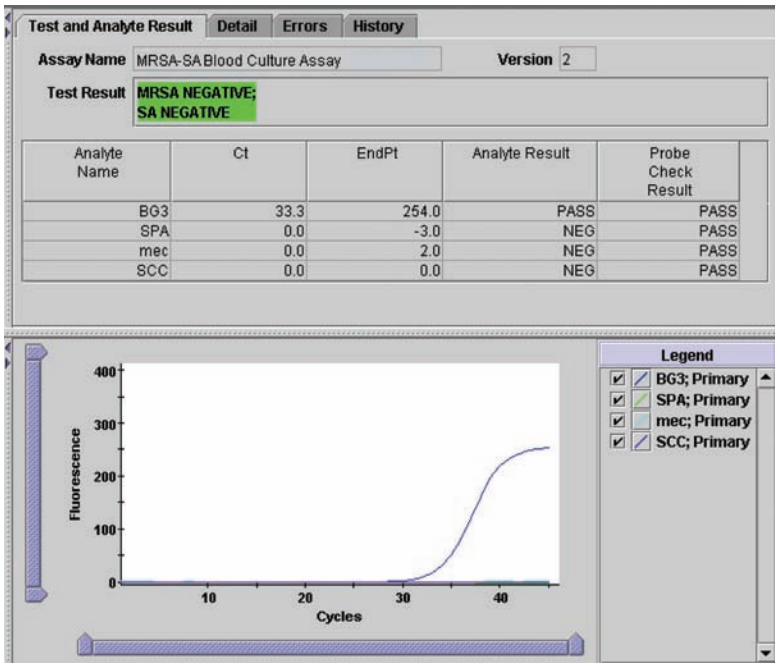

Figura 3. Esempio di risultato negativo

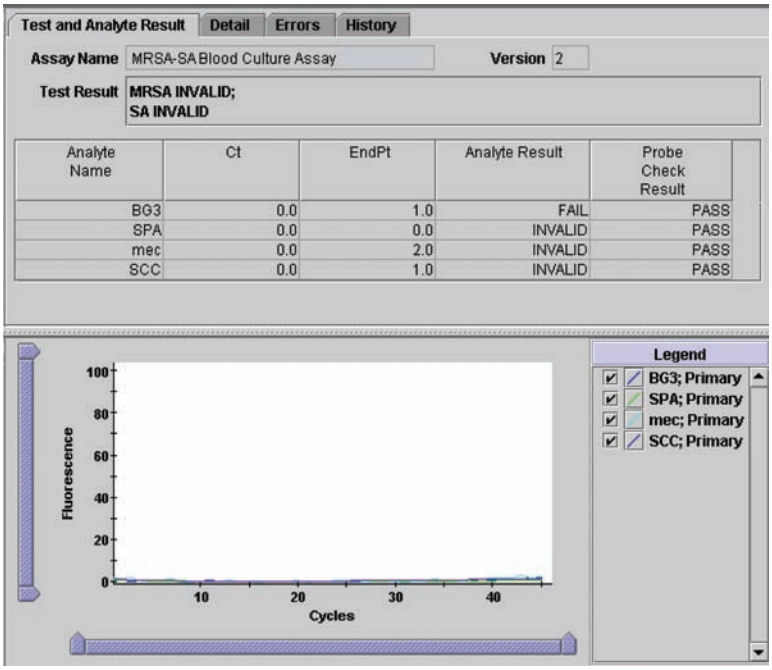

Figura 4. Esempio di risultato non valido

Interpretazione dei risultati

I risultati sono interpolati da GeneXpert® Dx System a partire dai segnali di fluorescenza misurati e dagli algoritmi di calcolo predefiniti e sono visualizzati nella finestra **View Results (Visualizza risultati)** . I risultati possibili sono:

MRSA POSITIVE/SA POSITIVE (MRSA POSITIVO/SA POSITIVO)

Vengono rilevate le sequenze del DNA bersaglio dell'MRSA/viene rilevata la sequenza del DNA bersaglio dell'SA.

- MRSA POSITIVE: tutti i bersagli MRSA hanno un valore Ct compreso nell'intervallo valido e un valore finale superiore all'impostazione minima.
- SPC — NA (non applicabile): l'SPC viene ignorato, poiché l'amplificazione dell'MRSA può interferire con questo controllo.
- Probe Check — PASS: tutti i risultati del controllo sonda hanno superato la verifica.

MRSA NEGATIVE/SA POSITIVE (MRSA NEGATIVO/SA POSITIVO)

Non vengono rilevate le sequenze del DNA bersaglio dell'MRSA/viene rilevata las equenza del DNA bersagli odell'SA.

- SA POSITIVE: il bersaglio SA ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido e un valore finale superiore all'impostazione minima.
- SPC — NA (non applicabile): l'SPC viene ignorato, poiché l'amplificazione SA può interferire con questo controllo.
- Probe Check — PASS: tutti i risultati del controllo sonda hanno superato la verifica.

MRSA NEGATIVE/SA NEGATIVE ((MRSA NEGATIVO/SA NEGATIVO)

Non viene rilevata la sequenza del DNA bersaglio dello *Staphylococcus aureus*. L'SPC soddisfa i criteri di accettazione.

- NEGATIVE: non viene rilevata la sequenza del DNA bersaglio dello *Staphylococcus aureus*.
- SPC — PASS: l'SPC ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido e un valore finale superiore all'impostazione finale minima.
- Probe Check — PASS: tutti i risultati del controllo sonda hanno superato la verifica.

INVALID (NON VALIDO)

Non è possibile determinare la presenza o l'assenza delle sequenze bersaglio dell'MRSA/SA; ripetere l'analisi con un nuovo campione. L'SPC non soddisfa i criteri di accettazione, il campione non èstato trattato correttamente o è stata impedita la PCR.

- INVALID: non è possibile determinare l'assenza o la presenza del DNA dello *Staphylococcus aureus*.

- SPC-FAIL: il risultato del target SPC è negativo, il valore Ct dell'SPC non rientra nell'intervallo valido e il valore finale è inferiore all'impostazione finale minima.
- Probe Check — PASS: tutti i risultati del controllo sonda hanno superato la verifica.

ERROR (ERRORE)

Non è possibile determinare la presenza o l'assenza dell'MRSA/SA; ripetere l'analisi con un nuovo campione. Il test dic ontrollo della sonda non è riuscito, probabilmente a causa dell'errato riempimento della provetta di reazione, di un problema di integrità della sonda o del superamento dei limiti massimi di pressione.

- MRSA — NO RESULT
- SA — NO RESULT
- SPC — NO RESULT
- Probe Check — FAIL*: uno o più risultati del controllo sonda non hanno superato la verifica

*Se il controllo della sonda è stato superato, si è verificato un errore di un componente del sistema.

NO RESULT (NESSUN RISULTATO)

Non è possibile determinare la presenza o l'assenza dell'MRSA/SA; ripetere l'analisi con un nuovo campione. I dati raccolti non sono sufficienti per produrre un risultato del test. Ciò può accadere, ad esempio, quando l'operatore ha interrotto un'analisi in corso.

- MRSA — NO RESULT
- SA — NO RESULT
- SPC — NO RESULT
- Probe Check — NA (non applicabile)

Motivi per ripetere il saggio

In presenza di uno dei risultati dell'analisi sotto indicati, ripetere l'analisi adoperando una nuova cartuccia (non riutilizzare la cartuccia). Eseguire la procedura per la ripetizione dell'analisi entro 3 ore da un risultato incerto.

- Il risultato INVALID indica che il controllo SPC non è riuscito. Il campione non è stato trattato correttamente o è stata impedita la PCR.
- Il risultato ERROR indica che il test di controllo della sonda non è riuscito e il saggio è stato interrotto, probabilmente a causa dell'errato riempimento della provetta di reazione,di un problema di integrità della sonda o del superamento dei limiti massimi di pressione.
- Un risultato NO RESULT indica che i dati raccolti non sono sufficienti. L'operatore, ad esempio, ha interrotto un'analisi in corso. Per ripetere l'analisi:
  1. Trasferire il contenuto rimanente dalla camera "S" in un nuovo reagente di eluizione.
  2. Vortexare e aggiungere tutto il contenuto del reagente di eluizione nella camera "S" di una nuova cartuccia per saggio MRSA/SA per emocoltura.
  3. Chiudere il coperchio e cominciare una nuova analisi.

Limitazioni

- Le prestazioni del saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura sono state convalidate solo con le procedure fornite nel presente foglio illustrativo. Eventuali modifiche apportate a queste procedure possono alterare le prestazioni delle analisi. Irisultati del saggio XpertMRSA/SAper emocoltura devono essere interpretati in associazione ad altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico.
- Con il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura non è possibile utilizzare terreni di emocoltura contenenti carbone attivo.
- Il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura può generare falsi negativi MRSA nelle analisi dello *S. aureus* con resistenza borderline all'oxacillina (BORSA). Il meccanismo di resistenza all'oxacillina in ceppi BORSA è dovuto a un incremento della produzione di beta-lattamasi e non al gene *mecA*. BORSA con concentrazioni minime inibitorie pari a 4-8 µg/ml sono ritenute borderline ma vengono indicate come MRSA negativo dal saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura. I ceppi BORSA sono rari negli Stati Uniti.
- Il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura può generare falsi negativi MRSA nelle analisi dello *S. aureus* modificato (MOD-SA). Il meccanismo della resistenza all'oxacillina in ceppi MOD-SA è dovuto a modifiche nell'affinità di proteine leganti la penicillina (PBP) per l'oxacillina e non al gene *mecA*. MOD-SA con concentrazioni minime inibitorie pari a 4-8 µg/ml sono ritenute

borderline ma vengono indicate come MRSA negativo dal saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura. I ceppi MOD-SA sono rari negli Stati Uniti.

- I risultati delle analisi potrebbero non essere corretti a seguito di errori di raccolta del campione, esecuzione non corretta della procedura consigliata per la raccolta del campione, errata manipolazione o conservazione, errori tecnici, scambio di campioni o presenza nel campione di un numero di organismi inferiore alla soglia di sensibilità del test. Per evitare risultati errati, attenersi scrupolosamente alle istruzioni riportate nel presente foglio illustrativo.
- Il rilevamento del MRSA e del SA dipende dal numero di organismi presenti nel campione, per cui l'affidabilità dei risultati dipende dalla correttezza della raccolta, della manipolazione e della conservazione del campione.
- Un risultato positivo delle analisi non indica necessariamente la presenza di organismi vitali, ma è presuntivo della presenza di MRSA o SA.
- I test con il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura devono essere utilizzati in aggiunta ad altri metodi disponibili.
- Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame dei primer o delle sonde possono influire sul rilevamento di varianti nuove o sconosciute dell MRSA, dando origine a falsi negativi.
- In una coltura mista contenente sia MRSA che SA, il limite di rilevamento (LoD) dell MRSA è variabile in presenza di concentrazioni di SA estremamente elevate. Le interferenze SA sono stati osservate a un rapporto MRSA:SA di $1:1\times10^6$.
- Il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura genererà un falso positivo MRSA nelle analisi di un campione di emocoltura con infezione mista contenente sia *Staphylococcus* coagulasi negativo resistente alla meticillina (MRCNS) che una cassetta vuota di *Staphylococcus aureus* (SA) sensibile alla meticillina.
- Come in tutti i test diagnostici *in vitro* basati su PCR, è possibile che vengano rilevati livelli del bersaglio estremamente bassi al di sotto del limite di rilevamento (LoD), ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
- Il risultato del saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura talvolta può essere "INVALID" a causa di un controllo SPC non riuscito, "ERROR" o "NO RESULT", e richiedere una nuova analisi con conseguente ritardo nella produzione dei risultati finali.

Sostanze interferenti

È stato eseguito uno studio per valutare eventuali effetti potenzialmente inibitori di sostanze riscontrate in emocolture positive utilizzando il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura. Sostanze potenzialmente inibitorie possono essere, a titolo esemplificativo, sangue e componenti di terreni di emocoltura. Sono state analizzate sostanze senza diluizione in repliche di tre con cellule di MRSA aggiunte in prossimità del limite analitico di rilevamento (~2,5 x LoD) e valori superiori (~10 x LoD).

- Non sono stati osservati effetti inibitori in presenza di brodo di estratto di caseina di soia aerobico/anaerobico standard BACTEC™ (Becton Dickinson) contenente SPS anticoagulante o dei relativi terreni aerobici/anaerobici contenenti resine a scambio ionico o adsorbenti anioniche per la rimozione di antimicrobici rispetto ai controlli del tampone.
- Non sono stati osservati effetti inibitori in presenza di brodo di soia triptico aerobico/anaerobico standard BacT/ALERT® (bioMerieux) contenente SPS anticoagulante rispetto ai controlli del tampone.
- Non sono stati osservati effetti inibitori in presenza di sangue intero rispetto ai controlli del tampone.

Caratteristiche prestazionali

Le caratteristiche prestazionali del saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura sono state determinate in uno studio sperimentale prospettico eseguito presso cinque istituti (4 negli Stati Uniti e 1 nell'Unione Europea), confrontando il saggio MRSA/SA per emocoltura con GeneXpert System (saggio Xpert MRSA/SA) con coltura. I soggetti includevano individui con emocolture positive per la crescita. Nello studio sono stati inclusi campioni provenienti da nove diversi tipi di flaconi per emocoltura per adulti e un flacone pediatrico. Sono stati esclusi i flaconi per emocoltura contenenti carbone.

Un'aliquota da ogni flacone per emocoltura è stata analizzata mediante il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura e mediante coltura. I metodi di coltura variavano da centro a centro, anche se la sensibilità alla meticillina/oxacillina è stata determinata in tutti i centri tramite test di disco-diffusione con disco di cefoxitina da 30 µg e cutoff di 21/22 mm.

Le prestazioni del saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura sono state calcolate in base ai risultati delle colture.

Risultati complessivi

Sono stati analizzati complessivamente 406 campioni per MRSA e SA con Xpert e coltura; 212 negli Stati Uniti e 194 nellUnioneEuropea.'

Il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura ha identificato il 98,3% dei campioni positivi per MRSA e il 99,4% dei campioni negativi per MRSA rispetto al metodo colturale. Per i campioni analizzati, il valore predittivo positivo per MRSA era pari al 96,6% e il valore predittivo negativo per MRSA era pari al 99,7%.

Il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura ha identificato il 100% dei campioni positivi per SA e il 98,6% dei campioni negativi per SA rispetto al metodo colturale. Per i campioni analizzati, il valore predittivo positivo per SA era pari al 96,7% e il valore predittivo negativo per SA era pari al 100%.

Tabella 1. MRSA — Risultati combinati dei centri USA e UE

		Coltura +	Coltura -			
Saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura	+	57	2	59	Sens	98,3%
	-	1*	346	347	Spec	99,4%
		58	348	406		

* Il campione falso negativo ottenuto nel test del saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura è stato sottoposto a ulteriori analisi mediante test di agglutinazione al lattice per rilevazione della PBP2a (Oxiod, Regno Unito) utilizzando metodi standard di laboratorio. I risultati del test suindicato mostravano che questo isolato produceva penicillinasi in eccesso ed era identificato erroneamente mediante coltura come MRSA.

Tabella 2. SA — Risultati combinati dei centri USA e UE

		Coltura +	Coltura -			
Saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura	+	120	4	124	Sens	100%
	-	0	282	282	Spec	98,6%
		120	286	406		

Specificità analitica

Utilizzando il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura, sono state analizzate colture di 98 ceppi ATCC (American Type Culture Collection) e 7 ceppi NARSA (Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*) che rappresentano specie filogeneticamente correlate allo *Staphylococcus aureus* o quelle potenzialmente riscontrate in ambiente ospedaliero, 29 ceppi di stafilococchi coagulasi negativi sensibili alla meticillina e 9 ceppi di stafilococchi coagulasi negativi resistenti alla meticillina. Gli organismi analizzati sono stati rappresentati da 74 specie Gram-positive, 28 Gram-negative, 3 di lieviti, 95 aerobiche e 10 anaerobiche. Sono state analizzate due o più repliche di ogni isolato a 1,7-3,2 unità McFarland. Nelle condizioni dello studio, tutti gli isolati sono stati segnalati negativi per MRSA e negativi per SA; nessuno degli isolati è stato rilevato dal saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura. I controlli positivi e negativi sono stati inclusi nello studio. La specificità era pari al 100%.

Ubiquità analitica (inclusività)

Lubiquitàanalitica(inclusività)delsaggioXpertMRSA/SAperemocolturaèstatadeterminatacon25ceppidi'*Staphylococcus aureus* forniti dal dott. Fred C. Tenover nei CDC (Centri per la prevenzione e il controllo delle malattie). Questi campioni sono segnalati come rappresentativi dei ceppi di MRSA e MSSA attualmente riscontrati nella comunità sanitaria. Tutti i ceppi sono stati analizzati in triplicato, con 100 µl di sospensioni cellulari in fase stazionaria diluite 10 milioni di volte. Il pannello comprende ceppi di MRSA che rappresentano SCC*mec* di tipo II, IV, IVa, IVb e IVc oltre a diversi tipi sconosciuti. I dati forniti dal CDC indicano che questi ceppi, quando caratterizzati da elettroforesi in campo pulsato (PFGE), rappresentano numerosi tipi USA, inclusi USA 100, il ceppo più comune contratto in ospedale, USA 300 e 400, i ceppi più comuni contratti in comunità.[8]

Come mostrato nella Tabelle 3, tutti i ceppi di MRSA sono stati correttamente riportati positivi per MRSA e positivi per SA utilizzando il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura. Ogni ceppo di MSSA, inoltre, è stato segnalato correttamente come negativo per MRSA e positivo per SA. Dopo che i risultati CHROMagar e del saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura sono stati comunicati al CDC, è emerso che il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura non ha identificato erroneamente il campione 95:99. Il campione 95:99 è stato etichettato in modo errato dal CDC. Il campione 95:99 è stato segnalato correttamente come negativo per MRSA e negativo per SA dal saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura. Le unità formanti colonie per saggio sono state determinate mediante conte da piastra in duplicato.

Tabella 3. Ubiquità analitica del saggio Xpert™ MRSA/SA per emocoltura

ID lab	Mittente	Origine	Tipo PFGE	Tipo SCC*mec*	Risultato MRSA CHROMagar	Risultato del saggio Xpert MRSA/SA BC	Ct SPC	Ct *spa*	Ct *mecA*	Ct SCC	CFU per saggio
94:1013	VT	Lesione cutanea	USA1000	IV	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34,7	30,7	31	32,6	152
*95:99	CT	Sangue	USA500	IV	-	MRSA NEGATIVO; SA NEGATIVO	34.1	0	0	0	37
96:308	NM	Feci	USA900	MSSA	-	MRSA NEGATIVO; SA POSITIVO	34	29,4	0	0	201
96:281	NC	Sangue	USA200	II	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,4	33,6	34	35,3	101
148-99	NY	Sangue	USA600	II	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34,3	33,2	33,1	35,2	43
182-99	MN	Sconosciuto	USA400	IVa	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	43.7	26,7	27,1	28,7	417
18626	OH	Sangue	USA100	II	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34,8	30,7	31	32,7	138
0:50	VN	Feci	USA600	non tipizzato	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,6	31,2	31,4	33,2	115
0-25-4	MS	Nasale	USA700	IVa	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	35,5	29,1	29,3	30,9	178
0-25-37	MS	Tessuti cutanei/ molli	USA300	IVa	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34,7	32,3	32,7	34,2	94
1-1-81	WA	Nasale	USA400	non tipizzato	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34,3	33	33,7	35,5	106
1-1-493	WA	Ferita	USA800	IV	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,7	31,5	31,7	33,4	113
N7129	NHANES	Nasale	USA900	MSSA	-	MRSA NEGATIVO; SA POSITIVO	34,3	29,9	0	0	84
107-03	NV	Sangue	USA200	non tipizzato	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34	33	33,3	34,9	99
GA201	GA-ABC	Sconosciuto	USA100	II	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,6	32,3	32,4	34	95
GA217	GA-ABC	Sconosciuto	USA300	IVb	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,6	30,8	31,2	33	121
GA229	GA-ABC	Sconosciuto	USA500	IV	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	37,8	31,7	31,9	33,3	81
7031	AK	Ascesso	USA1100	IVa	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34,2	30,8	31,5	32,9	73
102-04	CA	Nasale	USA1200	MSSA	-	MRSA NEGATIVO; SA POSITIVO	33,9	29,4	0	0	110
8-03	WI	Sconosciuto	USA700	non tipizzato	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33.3	29	29,2	30,9	202
510-04	Uruguay	Ascesso	USA1100	IVc	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34,6	31,5	32	33,8	143
27-05	HI	Ferita	USA800	IVc	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	40,7	27,8	28,1	29,8	373
CA46	CA	Sangue	USA1000	IV	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,4	32,6	33,7	35,8	81
398-05	HI	Ferita	USA1000	IVb	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,6	32,8	33,4	35,9	59
N4151	NHANES	Nasale	USA800	IVb	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34	30,7	31,2	32,9	101

* Campione 95:99: dopo che i risultati CHROMagar e del saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura sono stati comunicati al CDC, è emerso che il saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura ha identificato correttamente il campione 95:99. Il campione 95:99 è stato etichettato in modo errato dal CDC. Il campione 95:99 è stato segnalato correttamente come negativo per MRSA e negativo per SA dal saggio Xpert MRSA/SA per emocoltura. I valori Ct rappresentano la media di tre repliche. Le informazioni contenute nelle colonne grigie sono state fornite a Cepheid dal dott. Fred C. Tenover dal CDC.

Sensibilità analitica

Sono stati effettuati ulteriori studi per determinare l'intervallo di confidenza del 95% per il limite analitico di rilevamento (LoD) di questo saggio. Il limite di rilevamento è definito come il numero più basso delle unità formanti colonie (CFU) per campione che possono essere distinte in maniera riproducibile <:fc 8>da campioni negativi con una confidenza pari al 95%. Un ciclo valido massimo di 36,0 è impostato per l'analisi dei dati MRSA e SA. Qualunque risultato *spa*, mecA o SCC con un valore Ct maggiore di 36,0 è segnalato come negativo. Per MRSA (cellule di tipo II), sono state valutate repliche di 20 a sette concentrazioni (0, 50, 75, 100, 125, 150 e 200 CFU/campione). Per SA, sono state valutate repliche di 20 a sei concentrazioni (0, 20, 25, 40, 50 e 60 CFU/campione).

Nelle condizioni dello studio e utilizzando un'impostazione Ct valida massima di 36,0, i risultati indicano che la stima del punto LoD per SA è<:hs>48,0 CFU/campione con un intervallo di confidenza del 95% compreso tra 42,4 CFU e 57,2 CFU. La stima e gli intervalli di confidenza sono stati determinati tramite regressione logistica con dati (numero di positivi per numero di test a ogni livello) presi a sei livelli (0, 20, 25, 40, 50 e 60 CFU/campione). Si noti che il LoD analitico per SA riportato sarà (in maniera conservativa) 58 CFU/campione di 50 µl.

La stima del punto LoD per MRSA è pari a 109,4 CFU/campione con un intervallo di confidenza del 95% compreso tra 98,8 CFU e 128,2 CFU. La stima e gli intervalli di confidenza sono stati determinati tramite regressione logistica con dati (numero di positivi per numero di test a ogni livello) presi a sette livelli (0, 50, 75, 100, 125, 150 e 200 CFU/campione). Si noti che il LoD analitico per MRSA riportato sarà (in maniera conservativa) 130 CFU/campione di 50 µl.

Gli intervalli di confidenza sono stati determinati tramite stime di probabilità sui parametri di modelli logistici con la matrice varianza-covarianza del campione grande.

Riferimenti bibliografici

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, ed. ottobre 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 (fare riferimento allultimaedizione).

8. McDougal L, Steward C, Killgore G, Chaitram J, McAllister S, Tenover F. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a national Database. J Clin Micro 2003; 41(11): 5113-20.

Assistenza

Per ricevere assistenza, rivolgersi a Cepheid a uno dei recapiti di seguito indicati. Rivolgendosi all'Assistenza telefonicamente o tramite posta elettronica, fornire il numero di serie dello strumento e l'ID del lotto reagenti.

Nord America

Per l'assistenza tecnica, utilizzare i seguenti recapiti:

Tel: +1.888.838.3222 opzione 2

E-mail: techsupport@cepheid.com

È possibile contattare telefonicamente l'Assistenza tecnica Cepheid dal lunedì al venerdì, dalle 5 alle 17 (Pacifico).

Unione Europea

Per assistenza tecnica, utilizzare i seguenti recapiti:

Tel: +33.563.82.53.19

E-mail: techsupport@cepheideurope.fr

Altre aree geografiche

Rivolgersi al rappresentante Cepheid locale.

Tabella dei simboli

Simbolo	Significato
REF	Numero di catalogo
IVD	Dispositivo medico per diagnostica in vitro
	Non riutilizzare
LOT	Codice lotto
	Attenzione: consultare la documentazione allegata
	Produttore
Σ	Contiene quantità sufficiente per <n> analisi
	Data di scadenza
CONTROL	Controllo
EC REP	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
CE	Marchio CE – Comunità Europea
	Limitazione della temperatura
	Rischi biologici

Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Svezia

Prodotto in Svezia

EC REP
Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francia

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

CE IVD

Português

Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*

Nome patenteado

Xpert® MRSA/SA Blood Culture Assay

Nome comum ou usual

Ensaio MRSA/SA Blood Culture

Utilização prevista

O ensaio Xpert MRSA/SA da Cepheid realizado no sistema GeneXpert® Dx é um teste de diagnóstico *in vitro* qualitativo desenvolvido para a detecção rápida e simultânea de *Staphylococcus aureus* (SA) e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em pacientes com hemoculturas positivas. O teste utiliza a reacção em cadeia da polimerase (PCR) automatizada em tempo real, para detectar o ADN de MRSA/SA. O ensaio Xpert MRSA/SA destina-se a ajudar na detecção e identificação de MRSA/SA em frascos de hemoculturas positivas. O ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture está indicado para utilização em conjunto com outros testes laboratoriais, tais como culturas e dados clínicos à disposição do médico, como um método auxiliar para a detecção de MRSA/SA em hemoculturas positivas de pacientes. É necessário efectuar a subcultura de hemoculturas positivas para a recuperação de microrganismos para os testes de susceptibilidade ou para tipagem epidemiológica. O ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture da Cepheid não se destina a monitorizar o tratamento de infecções por MRSA/SA.

Resumo e explicação

O *Staphylococcus aureus* (SA) é um agente patogénico nosocomial importante que causa um espectro de doenças, incluindo endocardite, osteomielite, síndrome de choque tóxico, intoxicação alimentar, carbúnculo e furúnculos. No início da década de 1950, a aquisição e disseminação de plasmídeos produtores de beta-lactamase diminuíram a eficácia da penicilina no tratamento de infecções por *S. aureus*. Em 1959, foi introduzida a meticilina, uma penicilina sintética. Em 1960, foram identificadas estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina. Determinou-se que esta situação resultava da aquisição pelo *S. aureus* do gene *mecA*. Actualmente nos EUA, o MRSA é responsável por cerca de 25% das infecções nosocomiais, tendo vindo a aumentar as notificações de casos de MRSA adquiridos na comunidade, resultando em morbilidade e mortalidade significativas. Numa tentativa de limitar a propagação destas infecções, estão a ser desenvolvidas e implementadas estratégias e políticas de controlo nas unidades de cuidados de saúde. O controlo do MRSA é um objectivo principal da maioria dos programas de controlo de infecções hospitalares. Actualmente, o método de vigilância padrão para detectar o MRSA é a cultura, a qual é muito laboriosa e demorada.[1,2,3,4,5]

Um método mais rápido e sensível para a detecção de MRSA e SA a partir de frascos de hemoculturas positivas representará uma vantagem decisiva para o tratamento dos pacientes e a utilização de antibióticos adequados para o tratamento.

Princípio do procedimento

O sistema GeneXpert Dx automatiza e integra a purificação das amostras, a amplificação dos ácidos nucleicos e a detecção das sequências-alvo em amostras simples ou complexas, utilizando ensaios de PCR e RT-PCR (transcriptase reversa-PCR) em tempo real. O sistema é composto por um instrumento, um computador e software pré-instalado para efectuar testes e visualizar os resultados. O sistema requer a utilização de cartuchos descartáveis de utilização única que contêm os reagentes de PCR e onde decorre o processo de PCR. Como os cartuchos são autónomos, a contaminação cruzada entre amostras é eliminada. Para uma descrição completa do sistema, consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx*.

O ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture inclui reagentes para a detecção de MRSA e SA, assim como um controlo de processamento da amostra (SPC, Sample Processing Control) para controlar o processamento adequado das bactérias-alvo e para monitorizar a presença de inibidor(es) da reacção de PCR. O controlo de verificação da sonda (PCC, Probe Check Control) verifica a reidratação dos reagentes, o enchimento do tubo de PCR no cartucho, a integridade da sonda e a estabilidade do corante.

Os primers e as sondas presentes no ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture detectam sequências patenteadas da proteína estafilocócica A (*spa*), o gene da resistência à meticilina/oxacilina (*mecA*) e a cassete no cromossoma *mec* estafilocócico (SCC*mec*), inserida no local cromossómico *attB* do SA.

Reagentes e instrumentos

Material fornecido

O kit do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture contém reagentes suficientes para processar 10 amostras biológicas ou amostras de controlo da qualidade. O kit contém o seguinte:

Cartuchos do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture com tubos de reacção integrados	**10**
Esferas 1, 2 e 3 (liofilizadas)	**1 por cartucho**
Reagente 1	**2,8 ml por cartucho**
Reagente 2 (Hidróxido de sódio)	**3,2 ml por cartucho**
Reagente de eluição do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture	
Reagente de eluição (tiocianato de guanidina)	**1 x 2,0 ml por bolsa**
Pipetas de transferência pequenas, descartáveis	**12**
CD	**1 por kit**
ficheiro de definição de ensaio (ADF)	
Instruções para importar ADF em sistema GX	
Instruções	

Notas:

- As Fichas de Dados de Segurança (SDS) estão disponíveis em www.cepheid.com/tests-and-reagents/literature/msds ou www.cepheidinternational.com/tests-and-reagents/literature/msds.
- A albumina sérica bovina (BSA — bovine serum albumin) presente nas esferas foi produzida exclusivamente a partir de plasma bovino proveniente dos EUA. O fabrico da BSA também decorreu nos EUA. Nenhuma proteína de ruminante ou outra proteína animal foi administrada aos animais; os animais foram aprovados em testes ante e post-mortem. Durante o processamento não houve mistura do material com outros materiais de origem animal.

Conservação e manuseamento

- Conserve os cartuchos e reagentes do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture a 2 – 28°C.
- Não utilize reagentes ou cartuchos fora do prazo da validade.
- Não abra um cartucho até estar pronto para realizar o teste.
- Utilize o cartucho e os reagentes dentro de 30 minutos após a abertura da tampa do cartucho.
- Não utilize quaisquer reagentes que tenham ficado turvos ou descoloridos.

Materiais necessários não fornecidos

- Sistema GeneXpert Dx (a referência varia com a configuração): instrumento GeneXpert, computador, leitor de códigos de barras e Manual do utilizador
- Impressora (consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx* para obter as orientações de compatibilidade)
- Agitador vortex
- Pipetas de transferência esterilizadas, descartáveis

Materiais disponíveis mas não fornecidos

KWIK-STIKs™ MicroBiologics ref. 0158MRSA e ref. 0360MSSA como controlos positivos e ref. 0371MSSE (*Staphylococcus epidermidis* sensíveis à meticilina) como controlo negativo.

Advertências e precauções

- Trate todas as amostras biológicas, incluindo os cartuchos usados, como sendo 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. As directivas para o manuseamento de amostras biológicas estão disponíveis nos Centers for Disease Control and Prevention[6] 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 para trabalhar com produtos químicos e manusear amostras biológicas.
- O ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture não fornece resultados de susceptibilidade. É necessário tempo adicional para as culturas e para efectuar testes de susceptibilidade.
- Não substitua o reagente de ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture por outros reagentes.
- Não abra a tampa do cartucho do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture, excepto ao adicionar a amostra e o reagente ou ao repetir um teste.
- Não utilize um cartucho que tenha caído ou sido agitado depois de ter adicionado a amostra e o reagente.
- Não utilize um cartucho que tenha um tubo de reacção danificado.
- Cada cartucho de utilização única do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture é utilizado para processar um teste. Não reutilize cartuchos usados.
- Consulte o pessoal responsável pelos resíduos ambientais da instituição para obter informações sobre a eliminação adequada dos cartuchos usados e dos reagentes não utilizados. Este material pode apresentar características de resíduos perigosos de acordo com a lei federal "Resource Conservation and Recovery Act" (RCRA - Lei da Recuperação e Conservação dos Recursos) da Associação de Protecção Ambiental (EPA - Environmental Protection Agency) dos EUA e deve cumprir os requisitos específicos sobre eliminação. Consulte os regulamentos locais e estatais, podem diferir dos regulamentos de eliminação federais. As instituições fora dos EUA devem consultar os requisitos sobre eliminação de resíduos perigosos do país.
- Conserve o kit do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture a 2 – 28°C.
- Não abra a embalagem de um cartucho até estar pronto para realizar o teste.
- O reagente de eluição contém tiocianato de guanidina (H402, EUH301), que é nocivo para os organismos aquáticos e o contacto com ácido liberta gases tóxicos.
- O reagente 2 contém hidróxido de sódio (pH > 12,5); (H314), que é corrosivo para os olhos e a pele, exigindo a utilização de protecção dos olhos e da pele.
- Os seguintes meios de hemocultura podem ser utilizados no ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture:
  - BACTEC™ PEDS PLUS™/F Medium
  - BACTEC™ Plus Aerobic/F Medium
  - BACTEC™ Plus Anaerobic/F Medium
  - BACTEC™ Standard Anaerobic/F Medium
  - BACTEC™ Standard/10 Aerobic/F Medium
  - BACTEC™ LYTIC/10 Anaerobic/F Culture Vials
  - bioMérieux BacT/ALERT SA standard aerobic
  - bioMérieux BacT/ALERT SN standard anaerobic
  - VersaTREK REDOX 1® (aeróbio)
  - VersaTREK REDOX 2® (anaeróbio)
- Os meios de hemocultura contendo carvão activado não podem ser utilizados com o ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture.
- Teste apenas frascos de hemocultura que são positivos para crescimento microbiano com o ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture.

Colheita, transporte e conservação de amostras

1. Na altura da determinação da positividade, retire os frascos de hemocultura da incubação. Deve ser efectuada uma coloração Gram para as hemoculturas positivas, seguindo o procedimento laboratorial padronizado. Se não for possível retirar o frasco de hemocultura do instrumento no momento em que é detectada como sendo positiva, faça-o assim que lhe for conveniente.
2. Para os frascos de hemocultura positiva que revelem cachos de cocos Gram positivos ou cocos Gram positivos isolados através da coloração Gram, retire uma alíquota com 1 ml de caldo de cultura homogeneizado e identifique-o com a ID da amostra.

Nota: Os resultados das hemoculturas são críticos para o tratamento dos pacientes. Siga as directrizes e políticas em vigor no seu laboratório/instituição quanto à comunicação de resultados positivos de hemoculturas (oral, por escrito ou via electrónica) aos profissionais de saúde.

3. Se a alíquota não for testada imediatamente com o ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture, coloque-a a 2 - 8°C, nos 30 minutos seguintes à sua recolha do frasco de hemocultura. A alíquota da hemocultura positiva deve ser testada com o ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture nas 4 horas seguintes à sua recolha do frasco positivo.

Procedimento

Preparação do cartucho

Importante: Inicie o teste nos 15 minutos seguintes à adição dos reagentes ao cartucho.

Para adicionar a amostra e os reagentes ao cartucho:

1. Retire o cartucho e os reagentes da embalagem.
2. Com a pipeta de transferência pequena transfira uma gota de hemocultura positiva (50 µl) para o reagente de eluição.
3. Feche a tampa do frasco de eluição e agite-o em vortex a alta velocidade, durante 10 segundos.
4. Abra a tampa do cartucho. Com uma pipeta de transferência esterilizada, transfira todo o conteúdo do reagente de eluição para a câmara "S" do cartucho do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture.
5. Feche a tampa do cartucho.

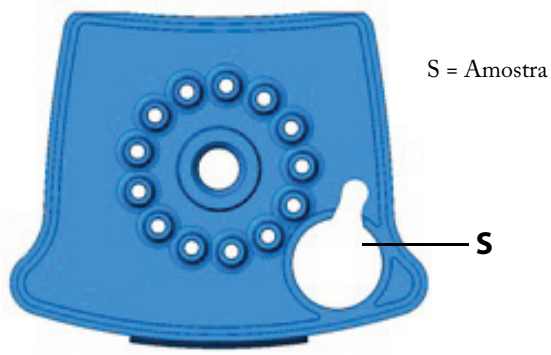

Figura 1. Cartucho do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture (vista de cima)

Início do teste

Importante: Antes de iniciar o teste, certifique-se de que o ficheiro de definição do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture é importado para o software.

Esta secção lista os passos básicos para realizar o teste. Para obter instruções detalhadas, consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx.*

1. Ligue o instrumento GeneXpert Dx e depois ligue o computador. O software GeneXpert arranca automaticamente.
2. Inicie sessão no software do sistema GeneXpert Dx utilizando o nome de utilizador e a palavra-passe.
3. Na janela do sistema **GeneXpert Dx**, clique em **Create Test** (**Criar teste**). Surge a caixa de diálogo **Scan Cartridge Barcode** (**Ler código de barras do cartucho**).

4. Leia o código de barras do cartucho do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture. Surge a janela **Create Test** (**Criar teste**). Utilizando as informações do código de barras, o software vai preencher automaticamente as caixas dos campos seguintes: Select Assay (Seleccionar ensaio), Reagent Lot ID (ID do lote de reagente), Cartridge SN (N.º série do cartucho) e Expiration Date (Prazo de validade).
5. Na caixa **Sample ID** (**ID da amostra**), leia ou introduza a ID da amostra. Certifique-se de que introduz a ID da amostra correcta. A ID da amostra está associada aos resultados do teste e é apresentada na janela "**View Results**" (**Ver resultados**) e em todos os relatórios.
6. Clique em **Start Test** (**Iniciar teste**). Na caixa de diálogo apresentada, introduza a sua palavra-passe.
7. Abra a porta do módulo do instrumento com a luz verde a piscar e coloque o cartucho.
8. Feche a porta. O teste inicia-se e a luz verde pára de piscar. Quando o teste termina, a luz desliga-se.
9. Antes de abrir a porta do módulo e retirar o cartucho, aguarde até o sistema desbloquear a porta.
10. Os cartuchos usados devem ser eliminados nos contentores adequados para resíduos biológicos, de acordo com as práticas padrão da sua instituição.

Visualização e impressão dos resultados

Para obter instruções detalhadas sobre como visualizar e imprimir os resultados, consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert® Dx.*

CONTROL

Controlo de qualidade

Cada teste inclui um SPC e um 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 de esporos secos que é incluído em cada cartucho para verificar o processamento adequado da amostra do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture. O SPC verifica se ocorreu a lise do *Staphylococcus aureus* , se os organismos estiverem presentes e verifica se o processamento da amostra é o adequado. Adicionalmente, este controlo detecta a inibição associada à amostra do ensaio de PCR em tempo real. O SPC deve ser positivo numa amostra negativa e pode ser negativo ou positivo numa amostra positiva. O SPC é aprovado se preencher os critérios de aceitação validados.

Controlo de verificação da sonda (PCC) — Antes do início da reacção de PCR, o sistema GeneXpert® Dx mede o sinal de fluorescência das sondas para monitorizar a reidratação das esferas, o enchimento do tubo de reacção, a integridade da sonda e a estabilidade do corante. A verificação da sonda é aprovada se preencher os critérios de aceitação atribuídos.

- Controlos externos — KWIK-STIKs™ (MicroBioLogics, ref. 0158MRSA e ref. 0360SA como controlos positivos e ref. 0371MSSE como controlo negativo) podem ser utilizados para formação, testes de proficiência e controlo de qualidade 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 do controlo externo da MicroBioLogics descrito a seguir:
    1. Abra a bolsa no entalhe e retire o KWIK-STIK.
    2. Aperte o fundo da ampola na tampa para libertar o líquido hidratante.
    3. Segure na vertical e bata levemente para facilitar a passagem do líquido pela haste até ao fundo da unidade que contém o pellet.
    4. Para facilitar a dissolução do pellet de células liofilizadas, esmague-o e aperte suavemente a câmara inferior.
    5. Rasgue o KWIK-STIK para libertar a zaragatoa e insira-a no tubo que contém o reagente de eluição (tampa preta).
    6. A zaragatoa KWIK-STIK está agora pronta para análise com o ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture.

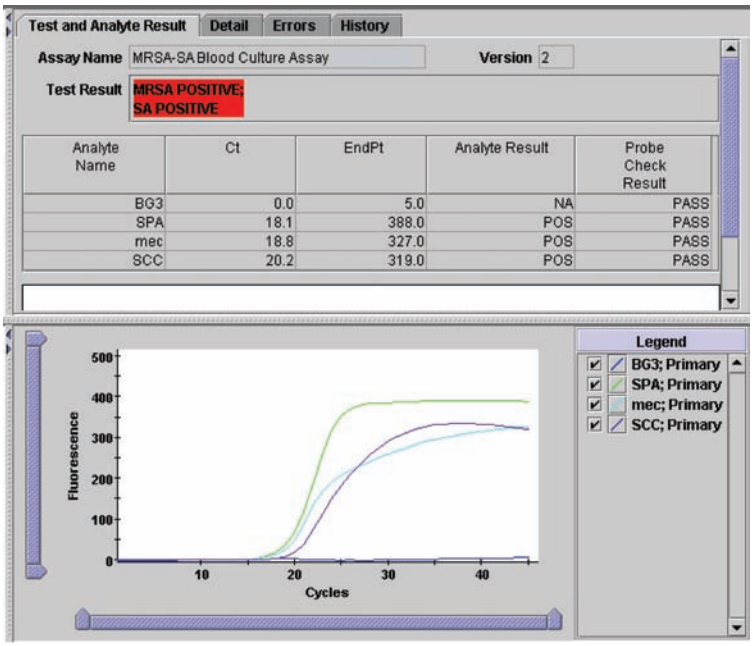

Figura 2. Exemplo de um resultado positivo

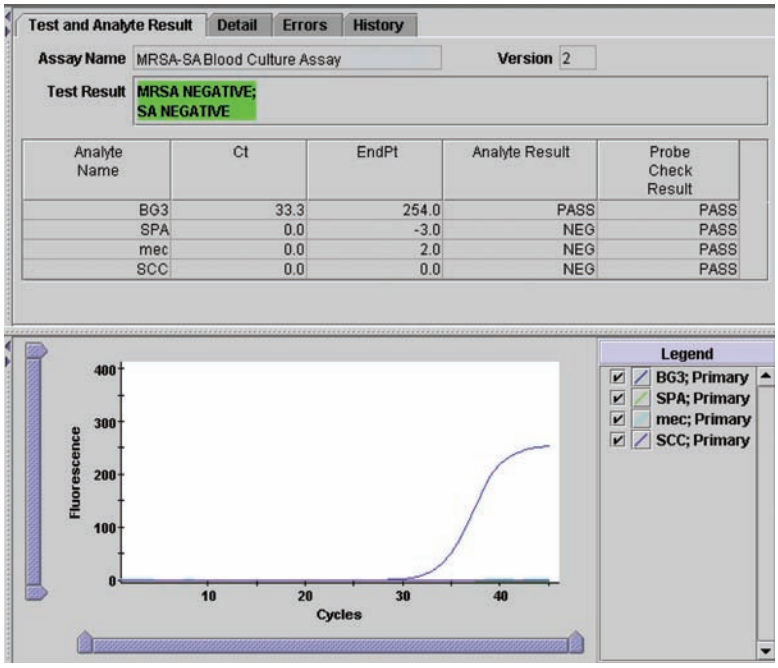

Figura 3. Exemplo de um resultado negativo

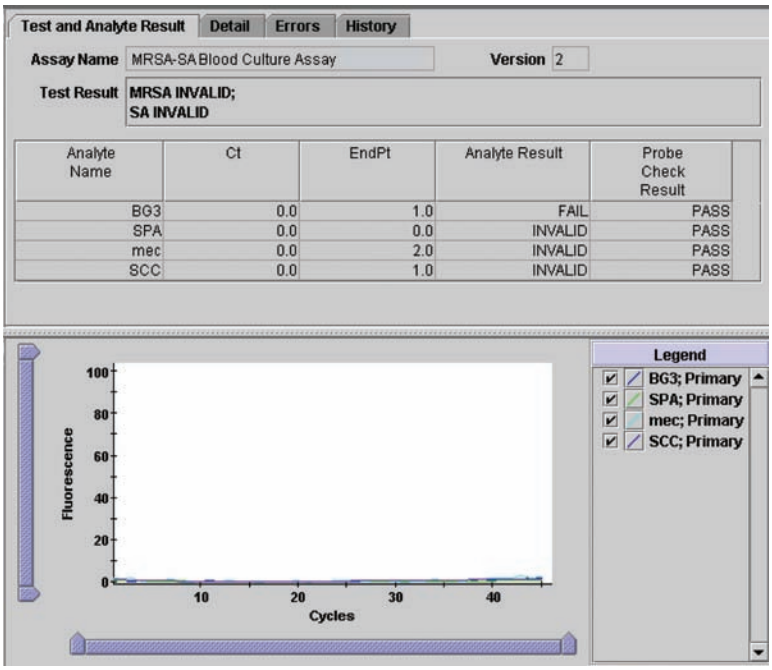

Figura 4. Exemplo de um resultado inválido

Interpretação dos resultados

Os resultados são interpolados pelo sistema GeneXpert® Dx a partir dos sinais de fluorescência medidos e dos algoritmos de cálculo incorporados, sendo apresentados na janela "**View Results**" (**Ver resultados**). Os resultados possíveis são:

MRSA POSITIVE/SA POSITIVE (MRSA positivo/SA positivo)

Detectadas sequências-alvo de ADN de MRSA/detectada sequência-alvo de ADN de SA.

- MRSA POSITIVE (MRSA positivo) — todos os alvos MRSA têm um limite de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e endpoint acima do valor mínimo.
- SPC — NA (não aplicável); o SPC é ignorado porque a amplificação de MRSA pode competir com este controlo.
- Probe Check — PASS (Verificação da sonda—Aprovada); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

MRSA NEGATIVE/SA POSITIVE (MRSA negativo/SA positivo)

Não foram detectadas sequências-alvo de ADN de MRSA/detectada sequência-alvo de ADN de SA.

- SA POSITIVE (SA positivo) — apenas o SA-alvo tem um Ct dentro do intervalo válido e um endpoint acima do valor mínimo.
- SPC — NA (não aplicável); o SPC é ignorado porque a amplificação de SA pode competir com este controlo.
- Probe Check — PASS (Verificação da sonda—Aprovada); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

MRSA NEGATIVE/SA NEGATIVE (MRSA negativo/SA negativo)

Não foi detectada sequência-alvo de ADN de *Staphylococcus aureus*. O SPC cumpre os critérios de aceitação.

- NEGATIVE (Negativo) —Não é detectado ADN-alvo de *Staphylococcus aureus*.
- SPC — PASS (SPC — Aprovado); o SPC tem um Ct dentro do intervalo válido e um endpoint acima do valor mínimo.
- Probe Check — PASS (Verificação da sonda—Aprovada); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

INVALID (Inválido)

A presença ou a ausência de sequências-alvo de MRSA/SA não pode ser determinada, repita o teste com uma nova amostra.
O SPC não preenche os critérios de aceitação, a amostra não foi processada adequadamente ou o PCR foi inibido.

- INVALID (Inválido) — Não pode ser determinada a presença ou ausência de ADN de *Staphylococcus aureus*.

- SPC-FAIL (SPC-Não aprovado) — o resultado do alvo do SPC é negativo, o Ct do SPC não está dentro do intervalo válido e o endpoint está abaixo do valor mínimo.
- Probe Check — PASS (Verificação da sonda—Aprovada); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

ERROR (Erro)

A presença ou a ausência de MRSA/SA não pode ser determinada, repita o teste com uma nova amostra. O controlo de verificação da sonda falhou, provavelmente devido ao enchimento inadequado do tubo de reacção, à detecção de um problema de integridade da sonda ou porque os limites máximos da pressão foram excedidos.

- MRSA — NO RESULT (MRSA — Sem resultado)
- SA — NO RESULT (SA — Sem resultado)
- SPC — NO RESULT (SPC — Sem resultado)
- Probe Check — FAIL* (Verificação da sonda — Não aprovada)*; um ou mais resultados da verificação da sonda falharam

*Se a verificação da sonda for aprovada, o erro é causado por uma falha de um componente do sistema.

NO RESULT (Sem resultado)

A presença ou a ausência de MRSA/SA não pode ser determinada, repita o teste com uma nova amostra. Não foram recolhidos dados suficientes para produzir um resultado de teste. Por exemplo, isto pode ocorrer se o operador interrompeu um teste que estava a decorrer.

- MRSA — NO RESULT (MRSA — Sem resultado)
- SA — NO RESULT (SA — Sem resultado)
- SPC — NO RESULT (SPC — Sem resultado)
- Probe Check — NA (Verificação da sonda — não aplicável)

Motivos para repetir o ensaio

Se ocorrer alguns dos resultados mencionados a seguir, repita o teste usando um novo cartucho (não reutilize o cartucho). Efectue o procedimento de repetição de teste no prazo de 3 horas após a obtenção de um resultado indeterminado.

- Um resultado INVÁLIDO indica que o controlo SPC falhou. A amostra não foi processada correctamente ou o PCR foi inibido.
- Um resultado com ERRO indica que o controlo de verificação da sonda falhou e que o ensaio foi cancelado, possivelmente devido ao enchimento inadequado do tubo de reacção, à detecção de um problema de integridade da sonda de reagente ou porque os limites máximos da pressão foram excedidos.
- SEM RESULTADO indica que os dados recolhidos foram insuficientes. Por exemplo, o operador parou um teste que estava a decorrer. Para efectuar a repetição do teste:
  1. Transfira todo o conteúdo restante da câmara “S” para um novo reagente de eluição.
  2. Agite em vortex e adicione todo o conteúdo do reagente de eluição à câmara “S” do novo cartucho do ensaio MRSA/SA Blood Culture.
  3. Feche a tampa e inicie o novo teste.

Limitações

- O desempenho do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture foi validado utilizando apenas os procedimentos fornecidos neste folheto. Qualquer modificação destes procedimentos pode alterar o desempenho do teste. Os resultados do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture devem ser interpretados em conjunto com outros dados laboratoriais e clínicos à disposição do médico.
- Os meios de hemocultura contendo carvão activado não podem ser utilizados com o ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture.
- O ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture pode produzir resultados falsos negativos para MRSA quando se está a testar *S. aureus* com resistência reduzida à oxacilina (BORSA). O mecanismo da resistência à oxacilina nas estirpes BORSA deve-se ao aumento da produção de B-lactamases e não ao gene *mecA*. Os BORSA com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 4-8 µg/ml são considerados como tendo resistência reduzida, e seriam classificados como MRSA negativo pelo ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture. As estirpes BORSA são raras nos EUA.
- O ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture pode produzir resultados falsos negativos para MRSA quando se está a testar *S. aureus* modificado (MOD-SA). O mecanismo da resistência à oxacilina nas estirpes MOD-SA deve-se a alterações da afinidade das proteínas de ligação à penicilina para a oxacilina e não ao gene *mecA*. Os MOD-SA com uma CIM de 4-8 µg/ml são considerados como tendo resistência reduzida, e seriam classificados como MRSA negativo pelo ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture. As estirpes MOD-SA são raras nos EUA.

- Podem ocorrer resultados de teste errados devido a colheita de amostra incorrecta, incumprimento dos procedimentos recomendados para colheita, manipulação e conservação da amostra, erro técnico, troca de amostras ou porque o número de organismos na amostra está abaixo do limite de detecção do teste. O cumprimento cuidadoso das instruções deste folheto é necessário para evitar resultados errados.
- Como a detecção de MRSA e SA depende do número de organismos presentes na amostra, os resultados fidedignos dependem da correcta colheita, manipulação e conservação da amostra.
- Um teste positivo não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Indica, no entanto, a presença presumível de MRSA ou SA.
- Os testes com o ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture devem ser utilizados como auxiliares de outros métodos disponíveis.
- Mutações ou polimorfismos nas zonas de ligação do primer ou da sonda podem afectar a detecção de variantes de MRSA novas ou desconhecidas, resultando num resultado falso negativo.
- Numa cultura mista contendo MRSA e SA, o limite de detecção (LoD) analítico do MRSA é variável quando estão presentes concentrações extremamente elevadas de SA. Foi observada competição do SA num rácio MRSA:SA de $1:1\times10^6$.
- O ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture produz um resultado falso positivo para MRSA quando se testa uma amostra de hemocultura de infecção mista que contenha *Staphylococcus* coagulase negativo resistente à meticilina (MRCNS) e *Staphylococcus aureus* (SA) de cassete vazia sensível-à meticilina (SA).
- Tal como acontece com todos os testes de diagnóstico *in vitro* baseados em PCR, podem ser detectados níveis extremamente baixos do alvo, abaixo do LoD do ensaio, mas os resultados poderão não ser reprodutíveis.
- Por vezes, os resultados do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture podem ser “INVÁLIDOS” devido a falha de um controlo SPC, “ERRO” ou “SEM RESULTADO” e pode ser necessário a repetição do teste, levando a um atraso na obtenção dos resultados finais.

Substâncias interferentes

Foi realizado um estudo para avaliar os potenciais efeitos inibitórios, se existentes, de substância(s) que possam estar presentes em hemoculturas positivas com o ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture. As potenciais substâncias inibitórias podem incluir, entre outras, sangue e componentes dos meios de hemocultura. As substâncias foram testadas não diluídas em triplicado com células MRSA enriquecidas junto do Limite de detecção analítico (~2,5 x LoD) e superior (~10 x LoD).

- Não se observaram efeitos inibitórios na presença de BACTEC™ (Becton Dickinson), caldo digestivo padrão de soja-caseína aeróbio/anaeróbio com o anticoagulante SPS ou os seus meios aeróbios/anaeróbios “PLUS” com resinas de troca iónica e resinas absorventes não iónicas para remover antimicrobianos, quando comparados com os controlos de tampão.
- Não se observaram efeitos inibitórios na presença de BacT/ALERT® (bioMérieux), caldo padrão de tripticase-soja aeróbio/anaeróbio com o anticoagulante SPS, quando comparado com os controlos de tampão.
- Não se observaram efeitos inibitórios na presença de sangue total, quando comparado com os controlos de tampão.

Características de desempenho

As características de desempenho do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture foram determinadas num estudo de investigação prospectivo multicêntrico em cinco instituições (4 nos Estados Unidos e 1 na UE), comparando o Xpert MRSA/SA Blood Culture no sistema GeneXpert (ensaio Xpert MRSA/SA) com cultura. Foram incluídos indivíduos cujas hemoculturas eram positivas para crescimento. O estudo incluiu amostras de nove tipos diferentes de frascos de hemocultura para adultos e um frasco pediátrico. Foram excluídos frascos de hemocultura contendo carvão.

Foi testada uma alíquota de cada frasco de hemocultura com o ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture e por cultura. Os métodos de cultura variaram entre os centros, embora a susceptibilidade à oxacilina/meticilina fosse determinada em todos os centros através de um teste de difusão em disco de 30 µg de cefoxitina e um cutoff de 21/22 mm.

O desempenho do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture foi calculado relativamente aos resultados da cultura de referência.

Resultados totais

Foram analisadas 406 amostras para MRSA e SA com o Xpert e cultura; 212 nos EUA e 194 na UE.

O ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture identificou 98,3% de amostras positivas para MRSA e 99,4% de amostras negativas para MRSA, relativamente ao método de cultura. Para as amostras testadas, o valor preditivo positivo para MRSA foi 96,6% e o valor preditivo negativo para MRSA foi 99,7%.

O ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture identificou 100% de amostras positivas para SA e 98,6% de amostras negativas para SA, relativamente ao método de cultura. Para as amostras testadas, o valor preditivo positivo para SA foi 96,7% e o valor preditivo negativo para SA foi 100%.

Tabela 1. MRSA — Centros EUA e UE combinados

		Cultura +	Cultura -			
Ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture	+	57	2	59	Sens	98,3%
	-	1*	346	347	Espec.	99,4%
		58	348	406		

* A amostra falsa negativa obtida no ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture foi depois investigada pela detecção da PBP2a pelo teste de aglutinação em látex (Oxoid, UK) com métodos laboratoriais padrão. Os resultados deste teste mostraram que o isolado sobreproduziu penicilinase e tinha sido erradamente identificado por cultura como sendo MRSA.

Tabela 2. SA — Centros EUA e UE combinados

		Cultura +	Cultura -			
Ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture	+	120	4	124	Sens	100%
	-	0	282	282	Espec.	98,6%
		120	286	406		

Especificidade analítica

Usando o ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture, foram testadas culturas de 98 estirpes da American Type Culture Collection (ATCC) e 7 estirpes da Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA), representando espécies filogeneticamente relacionadas com o *Staphylococcus aureus* ou com estafilococos potencialmente existentes num ambiente hospitalar, 29 estirpes de estafilococos coagulase negativos sensíveis à meticilina e 9 estirpes de estafilococoscoagulase negativos resistentes à meticilina. Os organismos testados foram representados por 74 espécies Gram positivas, 28 Gram negativas, 3 leveduras, 95 aeróbias e 10 anaeróbias. Duas ou mais réplicas de cada isolado foram testadas a 1,7-3,2 unidades McFarland. Nas condições do estudo, todos os isolados foram notificados como sendo MRSA negativos e SA negativos; nenhum dos isolados foi detectado pelo ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture. Foram incluídos controlos positivos e negativos no estudo. A especificidade foi de 100%.

Ubiquidade analítica (Inclusividade)

A ubiquidade analítica (inclusividade) do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture foi determinada utilizando 25 estirpes de *Staphylococcus aureus* fornecidas pelo Dr. Fred C. Tenover do Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Estas espécies são reportadas como sendo representativas das estirpes MRSA e MSSA (S. aureus sensível à meticilina) que actualmente podem ser encontradas na comunidade dos cuidados de saúde. Todas as estirpes foram testadas em triplicado utilizando 100 µl de suspensões de células em fase estacionária diluídas 10 milhões de vezes. O painel consiste em estirpes de MRSA representando os tipos SCC*mec* II, IV, IVa, IVb e IVc para além de vários tipos desconhecidos. Os dados fornecidos pelo CDC indicam que estas estirpes, quando caracterizadas por electroforese em gel de campo pulsado (PFGE), representam numerosos tipos USA, incluindo o tipo USA 100, a estirpe adquirida com maior frequência nos hospitais e o USA 300 e 400, as estirpes adquiridas com maior frequência na comunidade.[8]

Como se ilustra na Tabela 3, todas as estirpes de MRSA foram correctamente notificadas como sendo MRSA positivo e SA positivo, usando o ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture. Adicionalmente, cada estirpe de MSSA foi correctamente notificada como sendo MRSA negativo e SA positivo. Depois dos resultados do CHROMagar e do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture terem sido comunicados ao CDC, estes revelaram que o ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture não identificou correctamente a amostra 95:99. A amostra 95:99 foi rotulada incorrectamente pelo CDC. A amostra 95:99 foi correctamente notificada como sendo MRSA negativo e SA negativo pelo ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture. As unidades formadoras de colónias por ensaio foram determinadas por contagens em placa em duplicado.

Tabela 3. Ubiquidade analítica do ensaio Xpert™ MRSA/SA Blood Culture

ID lab.	Remetente	Origem	Tipo PFGE	Tipo SCC*mec*	Resultado CHROMagar MRSA	Resultado ensaio Xpert MRSA/SA BC	Ct SPC	Ct *spa*	Ct *mecA*	Ct SCC	UFC/ ensaio
94:1013	VT	Lesão cutânea	USA1000	IV	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34,7	30,7	31	32,6	152
*95:99	CT	Sangue	USA500	IV	-	MRSA NEGATIVO; SA NEGATIVO	34,1	0	0	0	37
96:308	NM	Fezes	USA900	MSSA	-	MRSA NEGATIVO; SA POSITIVO	34	29,4	0	0	201
96:281	NC	Sangue	USA200	II	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,4	33,6	34	35,3	101
148-99	NY	Sangue	USA600	II	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34,3	33,2	33,1	35,2	43
182-99	MN	Descon-hecido	USA400	IVa	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	43,7	26,7	27,1	28,7	417
18626	OH	Sangue	USA100	II	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34,8	30,7	31	32,7	138
0:50	TN	Fezes	USA600	sem tipagem	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,6	31,2	31,4	33,2	115
0-25-4	MS	Nasal	USA700	IVa	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	35,5	29,1	29,3	30,9	178
0-25-37	MS	Pele/teci-dos moles	USA300	IVa	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34,7	32,3	32,7	34,2	94
1-1-81	WA	Nasal	USA400	sem tipagem	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34,3	33	33,7	35,5	106
1-1-493	WA	Ferida	USA800	IV	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,7	31,5	31,7	33,4	113
N7129	NHANES	Nasal	USA900	MSSA	-	MRSA NEGATIVO; SA POSITIVO	34,3	29,9	0	0	84
107-03	NV	Sangue	USA200	sem tipagem	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34	33	33,3	34,9	99
GA201	GA-ABC	Desconhe-cido	USA100	II	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,6	32,3	32,4	34	95
GA217	GA-ABC	Desconhe-cido	USA300	IVb	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,6	30,8	31,2	33	121
GA229	GA-ABC	Desconhe-cido	USA500	IV	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	37,8	31,7	31,9	33,3	81
7031	AK	Abcesso	USA1100	IVa	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34,2	30,8	31,5	32,9	73
102-04	CA	Nasal	USA1200	MSSA	-	MRSA NEGATIVO; SA POSITIVO	33,9	29,4	0	0	110
8-03	WI	Desconhe-cido	USA700	sem tipagem	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,3	29	29,2	30,9	202
510-04	Uruguai	Abcesso	USA1100	IVc	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34,6	31,5	32	33,8	143
27-05	HI	Ferida	USA800	IVc	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	40,7	27,8	28,1	29.8	373
CA46	CA	Sangue	USA1000	IV	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,4	32,6	33,7	35,8	81
398-05	HI	Ferida	USA1000	IVb	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	33,6	32,8	33,4	35,9	59
N4151	NHANES	Nasal	USA800	IVb	+	MRSA POSITIVO; SA POSITIVO	34	30,7	31,2	32,9	101

* Amostra 95:99: Depois dos resultados do CHROMagar e do ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture terem sido comunicados ao CDC, estes revelaram que o ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture tinha identificado correctamente a amostra 95:99. A amostra 95:99 foi incorrectamente rotulada pelo CDC. A amostra 95:99 foi correctamente notificada como sendo MRSA negativo e SA negativo pelo ensaio Xpert MRSA/SA Blood Culture. Os valores de Ct representam a média das três réplicas. A informação contida nas colunas cinzentas foi fornecida à Cepheid pelo Dr. Fred C. Tenover do CDC.

Sensibilidade analítica

Foram realizados estudos adicionais para determinar o intervalo de confiança a 95% para o limite de detecção analítico (LoD) deste ensaio. O limite de detecção é definido como o menor número de unidades formadoras de colónias (UFC) por amostra que pode ser distinguido com reprodutibilidade das amostras negativas com 95% de confiança. Um ciclo máximo válido de 36,0 é programado para análise de dados de MRSA e SA. Qualquer resultado *spa*, mecA ou SCC com um valor de Ct superior a 36,0 é notificado como sendo negativo. Para o MRSA (células do tipo II), foram avaliadas réplicas de 20 em sete concentrações (0, 50, 75, 100, 125, 150 e 200 UFC/amostra). Para o SA, foram avaliadas réplicas de 20 em seis concentrações (0, 20, 25, 40, 50 e 60 UFC/amostra).

Nas condições do estudo e utilizando um Ct máximo válido de 36,0, os resultados indicam que a estimativa do ponto LoD para o SA é de 48,0 UFC/amostra com um intervalo de confiança a 95% compreendido entre 42,4 UCF e 57,2 UFC. A estimativa e os intervalos de confiança foram determinados usando uma regressão logística com dados (número de positivos por número de testes em cada nível) obtidos em seis níveis (0, 20, 25, 40, 50 e 60 UFC/amostra). Note que o LoD analítico para SA será notificado conservadoramente como sendo 58 UFC/50 µl de amostra.

A estimativa do ponto LoD para MRSA é de 109,4 UFC/amostra com um intervalo de confiança a 95% compreendido entre 98,8 UCF e 128,2 UFC. A estimativa e os intervalos de confiança foram determinados usando uma regressão logística com dados (número de positivos por número de testes em cada nível) obtidos em sete níveis (0, 50, 75, 100, 125, 150 e 200 UFC/amostra). Note que o LoD analítico para MRSA será notificado conservadoramente como sendo 130 UFC/50 µl de amostra.

Os intervalos de confiança foram determinados utilizando estimativas de máxima probabilidade sobre os parâmetros do modelo logístico, utilizando a matriz de variância-covariância de grandes amostras.

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. Documento M29 (refere-se à edição mais recente).

8. McDougal L, Steward C, Killgore G, Chaitram J, McAllister S, Tenover F. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a national Database. J Clin Micro 2003; 41(11): 5113-20.

Assistência

Para obter assistência, contacte a Cepheid através de um dos contactos a seguir fornecidos. No seu contacto telefónico ou quando enviar uma mensagem de e-mail, certifique-se de que indica o número de série do instrumento e a ID do lote de reagente.

América do Norte

Para obter apoio técnico, utilize os seguintes contactos:

Telefone: +1.888.838.3222

E-mail: techsupport@cepheid.com

Pode contactar o Apoio Técnico Cepheid através do telefone, de 2.ª a 6.ª feira, das 5 h às 17 h (hora do Pacífico).

União Europeia

Para obter apoio técnico, utilize os seguintes contactos:

Telefone: +33.563.82.53.19

E-mail: techsupport@cepheideurope.fr

Outras localizações

Contacte o representante Cepheid local.

Tabela de símbolos

Símbolo	Significado
REF	Referência
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Não reutilizar
LOT	Código do lote
	Atenção, consultar os documentos anexos
	Fabricante
Σ	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Prazo de validade
CONTROL	Controlo
EC REP	Representante autorizado na Comunidade Europeia
CE	Marcação CE – Conformidade Europeia
	Limites de temperatura
	Riscos biológicos

Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Suécia

Produto da Suécia

EC REP

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
França

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

CE IVD