

Vitassay qPCR

MRSA

PCR en tiempo real para la identificación y diferenciación específica de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA) y/o sensible a Meticilina (MSSA) y/o *Staphylococci* coagulasa negativos resistentes a Meticilina (MRCoNS) en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the specific identification and differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and/or methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* (MRCoNS) in clinical samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR MRSA permite la detección cualitativa de DNA genómico específico de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA) y/o *Staphylococci* coagulasa negativa resistente a meticilina (MRCoNS) en colonias aisladas provenientes de hisopados nasales, faríngeos y perianales, sembrados en medio sólido cromogénico, muestras de hemocultivo y muestras directas de hisopados en medio de transporte. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, junto con los datos clínicos del paciente, factores de riesgo epidemiológico, y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

Referencias

Vitassay qPCR MRSA 8x8-well strip, low profile	7041066
Vitassay qPCR MRSA 8x8-well strip, high profile	7042066

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S066A/ 7042S066A	MRSA 1 strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7041S066B/ 7042S066B	MRSA 2 strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C066	MRSA Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	8 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o \leq -70°C).
- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva aislada por primera vez en 1880 por el Dr Ogston. A pesar de ser uno de los primeros patógenos descritos, el *S. aureus* es una de las principales causas de infección en humanos, aunque se encuentra como comensal en la piel, glándulas y mucosas membranosas en personas asintomáticas. Se ha descrito que hasta un 20% de la población es portador asintomático de esta bacteria de manera habitual, y un 30% lo es de manera intermitente.

La importancia de este patógeno radica en la gran adaptabilidad al medio que posee, provocando un gran número de infecciones. Es causante de un gran número de infecciones nosocomiales adquiridas en hospitales y en instituciones y, dado que tiene una gran capacidad de diseminación por el torrente sanguíneo e infectividad en la piel y tejidos, puede resultar en infecciones respiratorias, cardíacas y óseas con consecuencias fatales.

Uno de los mayores retos que presenta este microorganismo es la rápida adquisición de mecanismos de virulencia, como aquellos responsables del síndrome del choque tóxico o el síndrome de la piel escaldada, así como la conocida resistencia a agentes antimicrobianos. En concreto, el conocido *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (o MRSA, por sus siglas en inglés), que fue descrito en la década de los 60, apareció al poco de empezar a utilizar el antibiótico meticilina en la práctica clínica habitual. Esta resistencia es adquirida por la transferencia horizontal del elemento génico móvil *SCCmec*, que codifica para los genes *mecA* y *mecC*, los cuales confieren resistencia a meticilina y, por extensión, a la mayoría de los antibióticos de la familia de los β -lactámicos.

En concreto, el gen *mecA* codifica para la proteína PBP2a (*acquired penicillin-binding protein*) que tiene una reactividad muy baja frente a los antibióticos β -lactámicos, permitiendo la síntesis de la pared celular en presencia de éstos. Por otro lado, *mecC* fue identificado más tarde y se sabe codifica para una proteína homóloga a PBP2a que también confiere resistencia antimicrobiana.

De acuerdo con la WHO, el MRSA es uno de los microorganismos con resistencia a antibióticos de mayor amenaza y su alta prevalencia, sobre todo asociada a la mortalidad, sigue preocupando.

La rápida identificación de MRSA es clave a la hora de administrar un tratamiento eficaz y aislar la infección. Los ensayos comúnmente utilizados para el diagnóstico de la infección por *S. aureus* se basan en métodos de aglutinación mediante anticuerpos anti-PBP2a, ensayos de fluorescencia o PCR convencionales. Sin embargo, muchos de ellos no son capaces de detectar las cepas resistentes producidas por la expresión del gen *mecC*. Para solventar ese problema, las PCR a tiempo real multiplex ofrecen una cómoda y rápida solución.

Principio del test

Vitassay qPCR MRSA se basa en la amplificación a tiempo real de los genes *SA442 / CoA*, *SCCmec-orfX* junction y *mecA/ mecC*. Tras la extracción de los ácidos nucleicos, la presencia de los patógenos se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrolisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5'- 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR MRSA, se trata de una prueba lista para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *SA442/CoA* (*S. aureus*) y *mecA/mecC*, así como el Control Interno (CI). Tras la reacción de amplificación, los genes *SA442/CoA* (*S. aureus*) se detectan en el canal FAM, los genes *mecA/ mecC* se detectan en el canal ROX y el Control Interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado). La segunda tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *SCCmec-orfX* junction así como el Control Interno (CI). Tras la reacción de amplificación, *SCCmec-orfX* junction se detecta en el canal FAM y el control interno (CI) en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Asegurarse de utilizar un pocillo para la determinación de *SA442/CoA* (*S. aureus*) y *mecA/mecC*, y otro pocillo para la determinación de *SCCmec-orfX* junction. Preste atención para no mezclarlos durante todo el proceso.
- Evitar la posible contaminación de muestras y reactivos por parte del operador debido a que *S. aureus* se encuentra en el ambiente y además la mayoría de las personas sanas lo portan en la piel y las membranas mucosas (con mayor frecuencia en el área nasal).

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de DNA

Realizar el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de extracción utilizado. Los siguientes sistemas de extracción han sido validados:

- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el Maxwell® 16 instrument (Promega).
- MagDEA® Dx SV kit utilizando el MagLEAD® 6gC instrument (Precision System Science)
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex Molecular).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del MRSA Positive Control (tubo rojo) con 200 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo para cada uno de los ensayos).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la polimerasa	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia se deben recoger durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (*SA442/CoA* y *SCCmec-orfX* junction), ROX (*mecA/mecC*), y HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación compruebe la emisión de señal del control interno (CI).

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales FAM, y ROX.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM, y ROX.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el control positivo para cualquier canal. El ensayo se debe de repetir.

El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación en los pocillos del control positivo y control negativo.

Una vez validado el resultado de los controles, con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados de las muestras:

MRSA 1			MRSA 2		Interpretación
<i>S. aureus</i> (SA442/CoA) (FAM) ¹	<i>mecA/mecC</i> (ROX) ¹	Control Interno (HEX)	<i>SCCmec-orfX</i> junction (FAM) ²	Control Interno (HEX)	
+	+	+/- ³	+	+/- ³	MRSA*
+	+	+/- ³	-	+/- ³	MSSA** y MRCoNS***
+	-	+/- ³	+	+/- ³	MSSA**
+	-	+/- ³	-	+/- ³	MSSA**
-	+	+/- ³	-	+/- ³	MRCoNS*** (resistencia meticilina/oxacilina distinta a <i>S. aureus</i>)
-	-	+	-	+	Negativo
-	-	-	-	-	Invalido

**S. aureus* resistente a meticilina

** *S. aureus* sensible a meticilina

****Staphylococci* coagulasa negativo resistente a meticilina.

¹ Para SA442/CoA y *mecA/mecC* se ha establecido un Ct de corte de 37. Así:

(+) Positivo: Señal de amplificación (Ct ≤37)

(-) Negativo: No hay señal de amplificación (Ct ≥37 o no hay señal)

² Para *SSCmec-orfX* se ha establecido un Ct de corte de 40. Así:

(+) Positivo: Señal de amplificación (Ct ≤40)

(-) Negativo: No hay señal de amplificación (Ct ≥40 o no hay señal)

³ En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación.

En caso de ausencia de señal del control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la

intensidad de fluorescencia. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado.

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

En un primer estudio se evaluó la funcionalidad del kit con 105 muestras positivas de colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianales humanos en medio sólido cromogénico. Estas muestras se tomaron de pacientes con sospecha clínica de colonización por *Staphylococcus aureus*, a partir de tejido del tracto respiratorio superior y de la zona del perineo. Tras el análisis rutinario mediante cultivo celular en medio agar selectivo para MRSA, las colonias positivas se resuspendieron y los remanentes se guardaron a -20°C hasta la extracción de los ácidos nucleicos para el posterior análisis. Del total de remanentes analizados, el kit de Vitassay fue capaz de detectar la presencia de *S. aureus* en todas menos en una de las muestras. Por otro lado, noventa y nueve fueron identificadas como MRSA positiva, una fue identificada como MRCoNS, dos como MSSA, y tres como *S. aureus* sensible a metilicina y MRCoNS simultáneamente. Se concluyó una alta sensibilidad (0.97 (0.91-0.99)) para la detección de MRSA, MSSA y MRCoNS en muestras de colonias aisladas.

En un segundo estudio se evaluó la funcionalidad del kit en muestras de hemocultivo y muestras directas de hisopados en medio de transporte de diferentes tejidos: tracto respiratorio superior, recto, zona axilar e inguinal, heridas, tejido ulceroso, entre otras. Estos especímenes se tomaron tanto de pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos, por lo que el muestreo fue de carácter epidemiológico, como de pacientes con sospecha de infección bacteriana o de colonización por microorganismos multirresistentes. El análisis rutinario se realizó mediante la siembra en diferentes medios no selectivos y selectivos. En el caso de sospecha antimicrobiana, se usaron técnicas específicas (MALDI-TOF, combo paneles, disk-diffusion y método de aglutinación de PBP2a, además de antibiogramas).

En total, se analizaron 689 muestras de hisopados provenientes de ambas poblaciones de pacientes. La caracterización inicial mostró 57 muestras positivas para *S. aureus*, 52 muestras positivas para MRSA y 34 para *Staphylococci* diferente al *S. aureus* (MRCoNS). Por otro lado, 537 fueron positivas a otros patógenos o a flora comensal y 10 no contaron con ningún diagnóstico inicial. Tras el análisis con el kit Vitassay, y tras resolver los resultados incongruentes con un tercer método molecular, los resultados fueron los siguientes:

Diana	Overall agreement	TP	TN	FP	FN	SE	SP
MRSA	0.99 (0.98-0.99)	43	640	2	4	0.91 (0.79-0.97)	0.99 (0.98-1)
MSSA	0.99 (0.98-0.99)	49	635	4	1	0.98 (0.89-0.99)	0.99 (0.98-0.99)
MRCoNS	1 (0.99-1)	345	344	0	0	1 (0.98-1)	1 (0.98-1)
MRCoNS y MSSA	0.98 (0.97-0.99)	45	635	9	0	1 (0.92-1)	0.98 (0.97-0.99)

TP: Verdadero positivo; TN: Verdadero Negativo; FP: Falso Positivo; FN: Falso Negativo; SE: Sensibilidad; SP: Especificidad. IC=95%

Por otro lado, se analizaron 152 muestras de hemocultivo. Los valores de sensibilidad clínica y especificidad en estas muestras fueron: para MRSA 1 (0.76-1) y 1 (0.97-1), respectivamente; para MSSA 1 (0.89-1) y 1 (0.96-1), respectivamente; para MRCoNS 1 (0.91-1) y 0.97 (0.92-0.99), respectivamente. Para MRCoNS y MSSA simultáneos se obtuvo una sensibilidad de 1 (0.97-1).

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de las diferentes dianas (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 100 copias de DNA por reacción para *S. aureus* (genes *SA442 / CoA*), ≥ 50 copias de DNA por reacción para genes *mecA / mecC* y ≥ 10 copias de DNA por reacción para *SCCmec-orfX* junction.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de MRSA fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Pruebas de reactividad cruzada					
<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge y Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz y Schleifer 1984 VP tipo VanC	-	<i>Enterococcus faecium</i> cepa LMG16165 tipo VanA	-	<i>Enterobacter cloacae</i> -complex con gen NDM-7	-
<i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142 tipos VanC y VanB	-	<i>Enterococcus avium</i> tipo VanA	-	<i>Enterobacter cloacae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) y NDM-1	-
<i>E. faecalis</i> (Andrewes y Horder) Schleifer y Kilpper-Balz tipo VanB	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2147G)	-	<i>Enterobacter cloacae</i> con genes SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) y OXA-48	-
<i>Enterococcus faecalis</i> tipo VanA	-	<i>H. pylori</i> resistente a Claritromicina (23S rRNA A2146G)	-	<i>Escherichia coli</i> con genes TEM-1 (non-ESBL) y IMP-1	-
<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1 tipo VanA	-	Aislado <i>Citrobacter freundii</i> -complex con genes KPC-3 y VIM-4	-	<i>Escherichia coli</i> con el gen OXA-244	-
<i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2 tipo VanB	-	<i>Citrobacter braakii</i> con gen VIM-1	-	Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL) y KPC-2	-
Aislado <i>Serratia marcescens</i> con el gen OXA-48	-	Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> con genes SHV-1 (non-ESBL), KPC-3 y OXA-48	-		

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR MRSA para MRSA se evaluó frente a Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain N315, MRSA sequence type 398, MRSA strain (*oxa^R*, PVL-positive, spa type t310), MRSA strain (*oxa^R*, PVL-positive, spa type t008), MRSA strain (*oxa^R*, PVL-neg), MRSA spa type t002, MRSA spa type t020, MRSA spa type t127, MRSA spa type t4545, MRSA (*mecC*, spa type t7734), mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR MRSA para MSSA + MRCoNS se evaluó frente a: *S. aureus* + *S. epidermidis* (*oxa^R*, PVL-pos); and MSSA ATCC 29213 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach) + MRCoNS 634 (Meticillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* 634), mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR MRSA para MRCoNS se evaluó frente a MRCoNS 634 (Meticillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* 634), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de Vitassay qPCR MRSA para MSSA se evaluó frente a MSSA (spa type t177), mostrando un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR MRSA ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)

Limitaciones

- Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido validado con DNA extraído de colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianales humanos en medio sólido cromogénico, en hemocultivos y en muestras directas de hisopados en medio de transporte. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por el MRSA positive control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de MRSA, dando lugar a resultados falsos negativos.
- Un resultado positivo con esta prueba no indica necesariamente un fracaso del tratamiento de erradicación, ya que el DNA puede persistir. Un resultado negativo obtenido tras un resultado positivo anterior de la prueba puede indicar el éxito del tratamiento de erradicación, o puede deberse a una colonización intermitente.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de organismos viables. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de DNA de MRSA.

Adjunto I. Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾
Azure Cielo 6
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Roche
LightCycler® 480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}
LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}

Formatos especiales ⁽⁷⁾
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cycler
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Qiagen
Rotor-Gene® Q

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 ⁽¹⁾
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena
qTOWER
BIONEER
Exicycler™ 96
BIOER
QuantGene 9600
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽⁸⁾
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
QIAquant 96

- (1) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos de PCR a tiempo real.
- (2) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (3) No lectura en canal ROX.
- (4) No lectura en canal Cy5.
- (5) Lectura solo en canales FAM y HEX.
- (6) Se requiere compensación de color específica.
- (7) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento de la prueba) y transvasar a los tubos específicos Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q o geneLEAD VIII System.
- (8) Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición.

Adjunto II. Canales de detección de los equipos a tiempo real más comunes

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®4 80II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition"
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III. Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

Intended use

Vitassay qPCR MRSA allows the qualitative detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and/or methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* (MRCoNS) specific genomic DNA in colonies isolated from nasal, pharyngeal, and perianal swabs, seeded on solid chromogenic medium, blood culture samples and direct swab samples in transport medium. This product is intended to facilitate the diagnosis of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, together with the patient's clinical data, epidemiological risk factors, and the results of other laboratory tests.

References

Vitassay qPCR MRSA 8x8-well strip, low profile	7041066
Vitassay qPCR MRSA 8x8-well strip, high profile	7042066

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S066A/ 7042S066A	MRSA 1 strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7041S066B/ 7042S066B	MRSA 2 strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C066	MRSA Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	8 x 8-cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated on the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. To avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Staphylococcus aureus is a gram-positive bacterium first isolated in 1880 by Dr Ogston. Despite being one of the earliest pathogens described, *S. aureus* is a major cause of infection in humans. It is found, however, as a commensal in skin, glands, and membranous mucosa of asymptomatic individuals. Up 20% of the population has been reported as asymptomatic carriers of this bacterium on a regular basis, and 30% are intermittent carriers.

The importance of this pathogen lies in its high adaptability to the environment, causing a large number of infections. *S. aureus* is responsible of many hospitals and institutionally acquired nosocomial infections and due to its high capacity for bloodstream dissemination, and skin and tissue infectivity, it can result in respiratory, cardiac and bone infections with fatal consequences.

One of the major challenges of this microorganism is the rapid acquisition of virulence mechanisms, such as those responsible for toxic shock syndrome or scalded skin syndrome, as well as the well-known resistance to antimicrobial agents. In particular, the well-known methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), described in the 1960s, appeared shortly after the antibiotic methicillin was introduced into routine clinical practice. This resistance is acquired by horizontal transfer of the mobile gene element *SCCmec*. This cassette encodes for *mecA* and *mecC* genes, which confer resistance to methicillin and, by extension, to most antibiotics in the β -lactam family.

Specifically, *mecA* gene encodes for the acquired penicillin-binding protein PBP2a, which has a very low reactivity to β -lactam antibiotics, allowing cell wall synthesis in their presence. On the other hand, *mecC* was later identified and encodes for a PBP2a homologous protein that also confers antimicrobial resistance.

According to WHO, MRSA is one of the antibiotic-resistant microorganisms of major concern being especially associated with high prevalence and mortality.

Rapid identification of MRSA is key to implement effective treatment and isolation. The commonly performed assays for the diagnosis of *S. aureus* infection are based on agglutination methods using anti-PBP2a antibodies, fluorescence assays or conventional PCR. Nevertheless, many of them are unable to detect resistant strains produced by *mecC* gene expression. To overcome this matter, real-time PCR multiplexes offer a convenient and rapid solution.

Principle of the test

Vitassay qPCR MRSA is based on real-time amplification of the *SA442 / CoA*, *SCCmec-orfX* junction and *mecA/ mecC* genes. After nucleic acids extraction, the pathogens presence is detected by an increase in fluorescence observed during the reaction, following hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect the accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to extend the primers, the probe is hydrolysed by its 5'- 3' exonuclease activity resulting in spatial separation of the fluorophore and the quencher. The resulting increase in fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR MRSA is a ready-to-use test that contains in each well all the necessary reagents in a stabilised format to perform real-time PCR. In addition, an internal control allows the detection of a possible inhibition reaction. Each kit includes two types of strips, each one corresponding to a different assay. The first strip contains the multiplex reaction mix for the detection of *SA442/CoA* (*S. aureus*) and *mecA/mecC* as well as the Internal Control (IC). After the amplification reaction, the *SA442/CoA* (*S. aureus*) genes are detected in the FAM channel, the *mecA/mecC* genes are detected in the ROX channel and the Internal Control (IC) is detected in the HEX, VIC, or JOE channel (depending on the equipment used). The second strip contains the multiplex reaction mix for the detection of *SCCmec-orfX* junction as well as the Internal Control (IC). After the amplification reaction, *SCCmec-orfX* junction is detected in the FAM channel and the Internal Control (IC) is detected in the HEX, VIC, or JOE channel (depending on the equipment used).

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.

- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Make sure to use one well for the determination of *SA442/CoA* (*S. aureus*) and *mecA/mecC*, and another well for the determination of *SCCmec-orfX* junction. Pay attention not to mix them during the whole process.
- Avoid potential contamination of samples and reagents by the operator due to *S. aureus* is found in the environment and is also carried by most healthy individuals on the skin and mucous membranes (most often the nasal area).

Procedures

Sample collection, processing, and DNA extraction

For nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The following extraction kits have been validated:

- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- MagDEA® Dx SV kit using the MagLEAD® 6gC instrument (Precision System Science)
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex Molecular).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized MRSA Positive Control (red tube) with 200 μ L of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run for each assay.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 μ L of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 μ L of DNA sample, negative (yellow tube) or positive (red tube) controls and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Polymerase activation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (*SA442/CoA* and *SCCmec-orfX* junction), ROX (*mecA/mecC*), and HEX, JOE, or VIC (Internal Control). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System or Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none (See Attached II).

Analysis and interpretation of results

The results analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control (IC) signal emission.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve in FAM, and ROX channels, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence in FAM, and ROX channels, which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is amplification signal in negative control or signal absence in the positive control for any channel. The assay should be repeated.

The Internal Control (IC) should show an amplification signal in positive control and negative control wells.

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

MRSA 1			MRSA 2		Interpretation
<i>S. aureus</i> (SA442/CoA) (FAM) ¹	<i>mecA/mecC</i> (ROX) ¹	Internal Control (HEX)	<i>SCCmec-orfX</i> junction (FAM) ²	Internal Control (HEX)	
+	+	+/- ³	+	+/- ³	MRSA*
+	+	+/- ³	-	+/- ³	MSSA** y MRCoNS***
+	-	+/- ³	+	+/- ³	MSSA**
+	-	+/- ³	-	+/- ³	MSSA**
-	+	+/- ³	-	+/- ³	MRCoNS*** (methicillin/oxacillin resistance different than <i>S. aureus</i>)
-	-	+	-	+	Negative
-	-	-	-	-	Invalid

* Meticillin-resistant *S. aureus*

** Meticillin-sensitive *S. aureus*

***Meticillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci*

¹ For SA442/CoA and *mecA/mecC* a cut-off of Ct 37 has been set. Therefore:

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤37)

(-) Negative: No amplification signal (Ct ≥37 or no signal)

² For *SSCmec-orfX* a cut-off of Ct 40 has been set. Therefore:

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤40)

(-) Negative: No amplification signal (Ct ≥40 or no signal)

³ Sometimes, the Internal Control (IC) detection is not necessary since a high copies number of the target can cause a preferential amplification of target-specific nucleic acids. The Internal Control (IC) shows or not an amplification signal.

In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend repeating the assay by diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each qPCR steps

and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate.

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

Quality Control

To confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Moreover, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

A first study was conducted to evaluate the kit's functionality with 105 positive samples of colonies isolated from human nasal, pharyngeal and perianal swabs on solid chromogenic medium. These samples were taken from patients with clinical suspicion of *Staphylococcus aureus* colonization, from upper respiratory tract tissue and from the perineal area. After routine analysis by cell culture on MRSA-selective agar medium, positive colonies were resuspended and remnants were stored at -20°C until extraction of nucleic acids for subsequent analysis. Of the total number of leftovers tested, Vitassay kit was able to detect the *S. aureus* presence in all but one of the samples. On the other hand, ninety-nine samples were identified as MRSA positive, one was identified as MRCoNS, two were identified as MSSA positive, and three were identified as methicillin-sensitive *S. aureus* and MRCoNS simultaneously. A high sensitivity (0.97 (0.91-0.99)) was concluded for the detection of MRSA, MSSA and MRCoNS in colony isolates.

On a second study the kit's functionality was evaluated on blood culture samples and direct swab samples in transport medium from different tissues: upper respiratory tract, rectum, axillary and inguinal area, wounds, ulcer tissue, among others. These specimens were taken both from patients admitted to the intensive care unit, so the sampling was epidemiological in nature, and from patients with suspected bacterial infection or colonization by multidrug-resistant microorganisms. Routine analysis was performed by sowing on different non-selective and selective media. In the case of antimicrobial suspicion, specific techniques were used (MALDI-TOF, combo panels, disk-diffusion and PBP2a agglutination method, as well as antibiograms).

In total, 689 swab samples from both patient populations were tested. Initial characterization showed 57 samples positive for *S. aureus*, 52 positives for MRSA and 34 for *Staphylococci* other than *S. aureus* (MRCoNS). On the other hand, 537 were positive for other pathogens or commensal flora and 10 had no initial diagnosis. After

analysis with the Vitassay kit, and after resolving inconsistent results with a third molecular method, the results were as follows:

Target	Overall agreement	TP	TN	FP	FN	SE	SP
MRSA	0.99 (0.98-0.99)	43	640	2	4	0.91 (0.79-0.97)	0.99 (0.98-1)
MSSA	0.99 (0.98-0.99)	49	635	4	1	0.98 (0.89-0.99)	0.99 (0.98-0.99)
MRCoNS	1 (0.99-1)	345	344	0	0	1 (0.98-1)	1 (0.98-1)
MRCoNS and MSSA	0.98 (0.97-0.99)	45	635	9	0	1 (0.92-1)	0.98 (0.97-0.99)

TP: True Positive; TN: True Negative; FP: False Positive; FN: False Negative; SE: Sensitivity; SP: Specificity. CI=95%.

On the other hand, 152 blood culture samples were analyzed. Clinical sensitivity and specificity values for these samples were: for MRSA 1 (0.76-1) and 1 (0.97-1), respectively; for MSSA 1 (0.89-1) and 1 (0.96-1), respectively; for MRCoNS 1 (0.91-1) and 0.97 (0.92-0.99), respectively. For simultaneous MRCoNS and MSSA detection, clinical sensitivity was 1 (0.97-1).

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of standards from the different targets ranging from 10^7 to 10^1 copies/reaction. This assay has a detection limit of ≥ 100 DNA copies per reaction for *S. aureus* (SA442/CoA genes), ≥ 50 DNA copies per reaction for *mecA/mecC* genes and ≥ 10 DNA copies per reaction for SCC*mec-orfX* junction.

Analytical specificity

The analytical specificity for the MRSA detection was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed between any of the species:

Cross-reactivity testing

VanC type- <i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge and Sneath 1982) Collins, Jones, Farrow, Kilpper-Balz and Schleifer 1984 VP	-	VanA- type <i>Enterococcus faecium</i> LMG16165 strain	-	<i>Enterobacter cloacae</i> -complex with NDM-7 gene	-
VanC and VanB- types <i>Enterococcus gallinarum</i> ENT20120142	-	VanA-type <i>Enterococcus avium</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i> with TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL) and NDM-1 genes	-
VanB-type <i>E. faecalis</i> (Andrews and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz	-	<i>H. pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rRNA A2147G)	-	<i>Enterobacter cloacae</i> with SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL) and OXA-48 genes	-
VanA-type <i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>H. pylori</i> Clarithromycin resistant (23S rRNA A2146G)	-	<i>Escherichia coli</i> with TEM-1 (non-ESBL) and IMP-1 genes	-
VanA- type <i>Enterococcus faecium</i> IOWA 1	-	<i>Citrobacter freundii</i> -complex isolate with KPC-3 and VIM-4 genes	-	<i>Escherichia coli</i> with OXA-244 gene	-
VanB- type <i>Enterococcus faecium</i> IOWA 2	-	<i>Citrobacter braakii</i> with VIM-1 gene	-	<i>Klebsiella pneumonia</i> isolate with TEM-1 (non-ESBL), SHV-1 (non-ESBL), CTX-M-2 (ESBL), and KPC-2 genes	-
<i>Serratia marcescens</i> isolate with OXA-48 gene	-	<i>Klebsiella pneumonia</i> isolate with SHV-1 (non-ESBL), KPC-3, and OXA-48 genes	-		

Analytical reactivity

The Vitassay qPCR MRSA kit's reactivity for MRSA was evaluated against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain N315, MRSA sequence type 398, MRSA strain (*oxa^R*, PVL-positive, *spa* type t310), MRSA strain (*oxa^R*, PVL-positive, *spa* type t008), MRSA strain (*oxa^R*, PVL-neg), MRSA *spa* type t002, MRSA *spa* type t020, MRSA *spa* type t127, MRSA *spa* type t4545, MRSA (*mecC*, *spa* type t7734), showing positive results.

The Vitassay qPCR MRSA kit's reactivity for MSSA + MRCoNS was evaluated against: *S. aureus* + *S. epidermidis* (*oxa^R*, PVL-pos); and MSSA ATCC 29213 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach) + MRCoNS 634 (Meticillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* 634), showing positive results.

The Vitassay qPCR MRSA kit's reactivity for MRCoNS was evaluated against MRCoNS 634 (Meticillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* 634), showing positive results.

The Vitassay qPCR MRSA kit's reactivity for MSSA was evaluated against MSSA (*spa* type t177), showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR MRSA has been validated on the following equipment:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)

Limitations

- All obtained results must be interpreted by a specialist together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay has been validated with DNA extracted from isolated colonies from human nasal, pharyngeal and perianal swabs plated onto chromogenic solid medium, blood culture samples and direct swab samples in transport medium. The use of other samples has not been established.
- The test quality depends on the sample's quality; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination either by MRSA Positive Control during its reconstitution, by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect the detection of new or unknown MRSA variants, resulting in a false negative result.
- A positive result with this test does not necessarily indicate a failure of eradication treatment, as DNA may persist. A negative result obtained after a previous positive test result may indicate successful eradication treatment or may be due to intermittent colonization.
- A positive result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. However, a positive result may be indicative of the presence of MRSA DNA.

Attached I. Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Azure Biosystems	Agilent Technologies
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Excycler™ 96	qTOWER
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Excycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	BIOER
Roche	QuantGene 9600
LightCycler®480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	Bio-Rad
LightCycler®96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™ Real-Time PCR
	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Special Formats ⁽⁷⁾	DNA-Technology
Bio Molecular Systems	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Mic Real Time PCR Cycler	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Precision System Science Co., Ltd.	Qiagen
geneLEAD VIII System	QIAquant 96
Qiagen	
Rotor-Gene® Q	

- (1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.
- (2) Select Ramp Speed "Standard".
- (3) No ROX caption.
- (4) No Cy5 caption.
- (5) Only FAM and HEX caption.
- (6) Specific compensation color is required.
- (7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.
- (8) See Attached III to configure exposure settings.

Attached II. Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR thermocyclers are specified in the following table:

Thermocycler	Vitassay Channel	Detection Channel	Observations
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®48 0II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range must be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III. Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

*If result in FAM channel is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.










Bibliography/Bibliografía

- Kim C, et al. (2012) Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the β -lactam-resistant phenotype. *J Biol Chem*. Oct 26;287(44):36854-63.
- Kourtis AP, Hatfield K, Baggs J, et al. (2019) Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*;68:214–219.
- Lakhundi S, Zhang K. (2018) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. Sep 12;31(4):e00020-18.
- Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, Harbarth S. (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers*. May 31;4:18033.
- Mitevska E, Wong B, Surewaard BGJ, Jenne CN. (2021) The Prevalence, Risk, and Management of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection in Diverse Populations across Canada: A Systematic Review. *Pathogens*. Mar 25;10(4):393.
- Palavecino EL. (2020) Rapid Methods for Detection of MRSA in Clinical Specimens. *Methods Mol Biol*.;2069:29-45.
- Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. (2014) The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*. Jan;22(1):42-7.
- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5:751–762.
- World Health Organization (WHO). (2017) Prioritization of Pathogens to Guide Discovery, Research and Development of New Antibiotics for Drug-Resistant Bacterial Infections, Including Tuberculosis.

Trademarks

All trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
			Número de referencia Catalogue number



VA Vitassay

Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com