

## RIDA® GENE MRSA

**REF** PG0605



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Alemanha

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



## 1. Uso previsto

Para diagnóstico *in vitro*. O teste RIDA<sup>®</sup>GENE MRSA, realizado no Roche LightCycler<sup>®</sup> 480 II, é uma PCR multiplex em tempo real para a detecção qualitativa direta de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e de *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) em esfregaços nasais/garganta humana não tratados, esfregaços de feridas e cultura em indivíduos assintomáticos e em indivíduos que apresentem sinais e sintomas de infecção causada por MRSA.

O teste RIDA<sup>®</sup>GENE MRSA destina-se a apoiar o diagnóstico de infecções por estafilococo (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA)) em indivíduos assintomáticos e em indivíduos que apresentam sintomas de infecção causada por MRSA em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais.

Resultados negativos não excluem a infecção por estafilococo (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA)) e não devem ser usados como única base para o diagnóstico.

O produto é destinado ao uso profissional.

## 2. Sumário e explicação do teste

Os estafilococos estão difundidos como colonizadores naturais da pele e da mucosa da orofaringe em humanos e animais. Eles são divididos em estafilococos coagulose positivos (*S. aureus*) e estafilococos coagulose negativos (como o *S. epidermidis*). O *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos mais significativos das infecções nosocomiais nos hospitais e outras instituições de saúde.<sup>1,2</sup> O patógeno é transmitido através do pessoal médico ou de outros pacientes. Estima-se que 30% da população saudável é colonizada com *S. aureus* (portadores assintomáticos). O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é a principal causa de infecções nosocomiais em todo o mundo (MRSA adquirido em meio hospitalar, também chamado HA-MRSA). Além das infecções por HA-MRSA, há também infecções por MRSA adquirido na comunidade (CA-MRSA) que podem ser apanhadas fora do hospital.<sup>3,4</sup> Nos últimos anos, as infecções por MRSA ou LA-MRSA associadas à produção pecuária têm ocorrido no contexto de animais de engorda, em especial entre os suinocultores.<sup>5,6</sup> A resistência à meticilina (oxacilina) de *S. aureus* é mediada pela proteína PBP2a, que é codificada pelo gene cromossômico *mecA*. O gene *mecA* está localizado no cassete de genes SCCmec variável e instável (cassete cromossômico estafilocócico mec). Até agora, 14 tipos de cassetes SCCmec foram descritos, dos quais os tipos I a V ocorrem com mais frequência.<sup>3,7,8</sup>

O cassete tipo XI SCCmec (SCCmec XI), que contém outro homólogo *mecA* (também chamado *mecC* ou *mecLGA251*), foi descrito pela primeira vez em 2011. O gene *mecC* tem apenas uma homologia de nucleotídeos de 70% com *mecA* e não é

detectável usando testes de PCRs e aglutinação PBP2a específicos de *mecA* normais. Isto foi descrito em isolados de *S. aureus* de humanos e gado bovino.<sup>9</sup> Ao contrário das infecções com MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina), as infecções por MRSA estão associadas a uma elevada morbidade, mortalidade, internação hospitalar prolongada e maiores custos de tratamento.<sup>10,11</sup> Os fatores de risco para infecção por MRSA nas unidades de saúde são o contato com pacientes com uma infecção por MRSA, um histórico conhecido de MRSA, o tempo de internação hospitalar e a antibioticoterapia de longo prazo.<sup>12</sup> Cada infecção por MRSA gera até 10.000 dólares em custos adicionais.<sup>13</sup> Na União Europeia, mais de 150.000 pacientes hospitalares sofrem de uma infecção por MRSA. Os custos hospitalares resultantes para o sistema de saúde europeu estão estimados em 380 milhões de euros.<sup>14</sup> A triagem precoce, rápida e sistemática de MRSA permite que pacientes infectados sejam tratados especificamente e que métodos de higiene adequados sejam introduzidos para prevenir a transmissão e a propagação de MRSA. Usando métodos de cultivo convencionais, são necessárias 48 a 72 horas para detectar MRSA. Os testes PCR em tempo real permitem uma triagem precoce e rápida de MRSA na data de admissão no hospital como parte do programa de prevenção de infecções (estratégia de “busca e destruição”).<sup>15</sup>

### 3. Princípio do teste

RIDA®GENE MRSA é um PCR multiplex em tempo real para detecção qualitativa direta e diferenciação entre *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) em amostras de cultura de espécimes de esfregaço de nariz humano e nariz/garganta. Após o isolamento do DNA, os fragmentos de genes específicos (se presentes) de MRSA (o gene *mecA/mecC*, a junção *SCCmec/orfX* e o gene SA442) são amplificados. As sequências-alvo amplificadas são detectadas usando sondas de hidrólise que são etiquetadas com um supressor em uma extremidade e um corante de repórter fluorescente (fluoróforo) na outra. As sondas hibridam com o fragmento amplificado na presença de uma sequência-alvo. Durante a extensão, a **Taq Polymerase** separa o repórter do supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade óptica de um dispositivo de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados. O teste RIDA®GENE MRSA contém **Internal Control DNA** (ICD) para controlar o preparo da amostra e/ou qualquer potencial inibição da PCR.

#### 4. Reagentes fornecidos

**Tabela 1:** Reagentes fornecidos (Os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 100 determinações)

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Reaction Mix	2x	1100 µl	Amarelo
2	Taq Polymerase	1x	11 µl	Vermelho
D	Internal Control DNA	2x	1800 µl	Castanho
L	Lysis Buffer 1	2x	12 ml	incolor
N	PCR Water	1x	500 µl	Branco
P	Positive Control	1x	200 µl	Azul

#### 5. Instruções de armazenamento

- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz a -20 °C e, se não abertos, podem ser usados até a data de validade impressa no rótulo. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término do prazo de validade.
- Todos os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira entre 2 °C a 8 °C).
- O congelamento/descongelamento repetidos até 15 vezes não afeta a propriedade do teste (se necessário, crie alíquotas após o primeiro descongelamento e recongele os reagentes imediatamente).
- Arrefecer todos os reagentes adequadamente durante a preparação da PCR (2 °C a 8 °C).

## 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

O teste PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE MRSA pode ser usado com os seguintes dispositivos PCR em tempo real:

**Tabela 2:** Equipamento necessário

Dispositivos PCR em tempo real	
Roche	LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™

Caso queira usar outros dispositivos PCR em tempo real, entre em contato com a R-Biopharm para verificar a compatibilidade em [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

- Sistema de coleta de esfregaço esterilizado (por exemplo, eSwab®, Copan Diagnostics Inc.)
- RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) ao usar o LightCycler® 480II
- Consumíveis de PCR em tempo real (placas, tubos de ensaio, filmes)
- Centrífuga com rotor para tubos de ensaio ou placas
- Vortexer
- Agitador térmico
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1.000 µl)
- Pontas da pipeta com filtros
- Luvas descartáveis sem pó
- Água PCR (livre de nuclease)

## 7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

- Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas.
- Sempre cumpra estritamente as instruções de uso para a realização desse teste.
- Não pipete amostras ou reagentes usando a boca. Evite o contato com membranas mucosas e pele lesionada.
- Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste.
- Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas.
- Garanta que a extração, a preparação da PCR e a PCR sejam realizadas em salas diferentes, a fim de evitar contaminações cruzadas.
- As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.
- Descarte o kit de teste assim que o prazo de validade expirar.
- Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização. Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

Para maiores detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDSs) em [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Coleta e armazenamento de amostras

### 8.1 Preparação de DNA a partir de esfregaços

O seguinte método de isolamento é recomendado para isolar o DNA dos esfregaços: adicione 200 µl de tampão de lise 1 a um frasco de preparação. Mergulhe a ponta do esfregaço no tampão de lise 1 pré-pipetado e quebre ou corte a fita. Ao utilizar esfregaços com meio, 100 µL do meio de esfregaço podem ser adicionados ao tampão de lise de 200 µL e tratados posteriormente. Vede os frascos de preparação com firmeza e agite no vórtice por 60 segundos. Aqueça durante 10 minutos a 95 °C em um bloco de aquecimento enquanto agita. Depois, centrifugue durante 1 min a 13.000 x g e use o sobrenadante como amostra.

**Nota:** Repita se a preparação se tornar muito opaca durante a centrifugação.

O teste RIDA®GENE MRSA contém um Internal Control DNA que indica potencial inibição da PCR, verifica a integridade dos reagentes e confirma a extração bem-sucedida de ácido nucleico. O Internal Control DNA pode ser usado apenas como um controle de inibição ou como um controle de extração para a preparação de amostras e como um controle de inibição.

Se o **Internal Control DNA** for usado apenas como um controle de inibição, 1 µl do **Internal Control DNA** deve ser adicionado à mistura principal para cada reação (consulte a Tabela 4).

Se o **Internal Control DNA** for usado como um controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, durante o procedimento de extração, devem ser usados 20 µl do **Internal Control DNA** para cada amostra. O **Internal Control DNA** deve ser adicionado à mistura de tampão de amostra/lise e **não** deve ser adicionado diretamente ao material da amostra. Recomendamos pipetar 1 µL por reação do **Internal Control DNA** tanto para o controle negativo como para o controle positivo.

## 8.2 Preparação do DNA a partir de amostras de cultura

O seguinte método de isolamento é recomendado para isolar o DNA das amostras de cultura: adicione 200 µl de tampão de lise 1 a um frasco de preparação. Usando uma rede de inoculação, recolha várias colônias e suspenda-as no tampão de lise pré-pipetado 1. Quebre ou corte a fita da rede de inoculação. Vede os frascos de preparação com firmeza e agite no vórtice por 60 segundos. Aqueça durante 10 minutos a 95 °C em um bloco de aquecimento enquanto agita. Depois, centrifugue durante 1 min a 13.000 x g e use o sobrenadante como amostra.

**Nota:** Repita se a preparação se tornar muito opaca durante a centrifugação.

O teste RIDA®GENE MRSA contém um **Internal Control DNA** que indica potencial inibição da PCR, verifica a integridade dos reagentes e confirma a extração bem-sucedida de ácido nucleico. O **Internal Control DNA** pode ser usado apenas como um controle de inibição ou como um controle de extração para a preparação de amostras e como um controle de inibição.

Se o **Internal Control DNA** for usado apenas como um controle de inibição, 1 µl do **Internal Control DNA** deve ser adicionado à mistura principal para cada reação (consulte a Tabela 4).

Se o **Internal Control DNA** for usado como um controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, durante o procedimento de extração, devem ser usados 20 µl do **Internal Control DNA** para cada amostra. O **Internal Control DNA** deve ser adicionado à mistura de tampão de amostra/lise e **não** deve ser adicionado diretamente ao material da amostra. Recomendamos pipetar 1 µL por reação do **Internal Control DNA** tanto para o controle negativo como para o controle positivo.

## 9. Realização do teste

### 9.1 Preparação da mistura principal

O número total de reações necessárias para a PCR (amostras e reações de controle) deve ser calculado. Em cada teste realizado, devem ser incluídos um controle positivo e um controle negativo.

É recomendável adicionar um volume adicional de 10% à mistura principal para equilibrar a perda de pipeta (consulte a Tabela 3, Tabela 4). Antes de usar, descongele, misture e centrifugue brevemente o **Reaction Mix**, a **Taq polymerase**, o **Positive Control**, a **PCR Water** e o **Internal Control DNA**. Sempre resfrie adequadamente os reagentes durante as etapas de trabalho (2 °C a 8 °C).

**Tabela 3:** Exemplo do cálculo e produção da mistura principal para 10 reações (extração e controle de inibição de ICD)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Quantidade por reação	10 reações (mais 10%)
1	Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq polymerase	0,1 µl	1,1 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Misture a mistura principal e depois centrifugue por pouco tempo.

**Tabela 4:** Exemplo do cálculo e produção da mistura principal para 10 reações (ICD somente como controle de inibição)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Quantidade por reação	10 reações (mais 10 %)
1	Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq polymerase	0,1 µl	1,1 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Misture a mistura principal e depois centrifugue por pouco tempo.



## 9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µl da mistura principal em cada tubo de ensaio (frasco/placa).

**Controle negativo:** Adicione 5 µl do **PCR Water** à mistura principal pré-pipetada.

**Nota:** Recomendamos a pipetagem de 1 µL do **Internal Control DNA** na mistura de PCR para o controle negativo quando se utiliza o **Internal Control DNA** como controle de extração para a preparação de amostras e como controle de inibição.

**Amostras:** Adicione 5 µl de eluato à mistura principal pré-pipetada.

**Controle positivo:** Adicione 5 µl de **Positive Control** à mistura principal pré-pipetada.

**Nota:** Recomendamos a pipetagem de 1 µL do **Internal Control DNA** na mistura de PCR para o controle positivo quando se utiliza a **Internal Control DNA** como controle de extração para a preparação de amostras e como controle de inibição.

Selar os tubos de ensaio ou placas, centrifugar brevemente em velocidade lenta e transferir para o dispositivo de PCR em tempo real. Iniciar a PCR de acordo com a configuração do dispositivo de PCR (consulte a Tabela 5 e a Tabela 6).

## 9.3 Configuração do dispositivo de PCR

### 9.3.1 Perfil de PCR em tempo real do DNA

**Tabela 5:** Perfil de PCR em tempo real de DNA para LightCycler® 480II

Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<b>PCR</b> Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Máximo

**Nota:** O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

**Tabela 6:** Perfil de PCR em tempo real de DNA para Mx3005P, ABI 7500, e CFX96™

Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Máximo

**Nota:** O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

#### 9.4 Configuração do canal de detecção

**Tabela 7:** Seleção dos canais de detecção adequados

Dispositivo de PCR em tempo real	Deteção	Canal de deteção	Comentário
Roche LightCycler® 480 II	Junção SCCmec / orfX	465/510	É necessário o RIDA® GENE Color Compensation Kit I (PG0001).
	ICD	533/580	
	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	533/610	
	mecA / mecC	618/660	
Agilent Technologies Mx3005P	Junção SCCmec / orfX	FAM	Defina o corante de referência como nenhum.
	ICD	HEX	
	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	ROX	
	mecA / mecC	Cy5	
ABI 7500	Junção SCCmec / orfX	FAM	Defina o corante de referência passiva ROX como nenhum.
	ICD	VIC	
	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	ROX	
	mecA / mecC	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	Junção SCCmec / orfX	FAM	-
	ICD	VIC	
	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	ROX	
	mecA / mecC	Cy5	

## 10. Controle de qualidade

As amostras são avaliadas usando o software de análise do respectivo dispositivo de PCR em tempo real, de acordo com as instruções do fabricante. Os controles negativos e positivos devem mostrar os resultados corretos (consulte a Tabela 8, Fig. 1, Fig. 2 e Fig. 3)

O **Positive Control** vem em uma concentração de  $10^3$  cópias/ $\mu$ l. É usado em uma quantidade total de  $5 \times 10^3$  cópias em cada execução de PCR.

**Tabela 8:** Uma execução de PCR válida deve atender às seguintes condições:

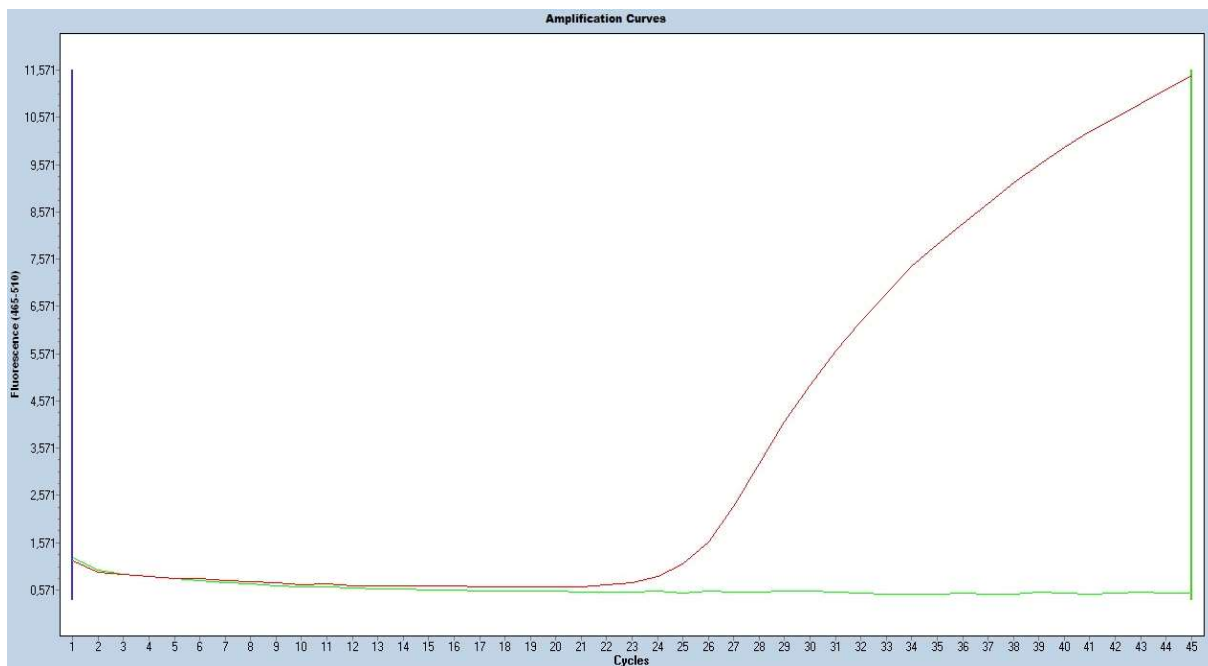
Amostra	Resultado	ICD Ct	Gene-alvo Ct
Controle positivo	Positivo	N/A *1	Ver Certificate of Analysis
Controle negativo	Negativo	Ct > 20	Não detectável

*\*1 Um valor de Ct para o ICD não é necessário para obter um resultado positivo do controle positivo.*

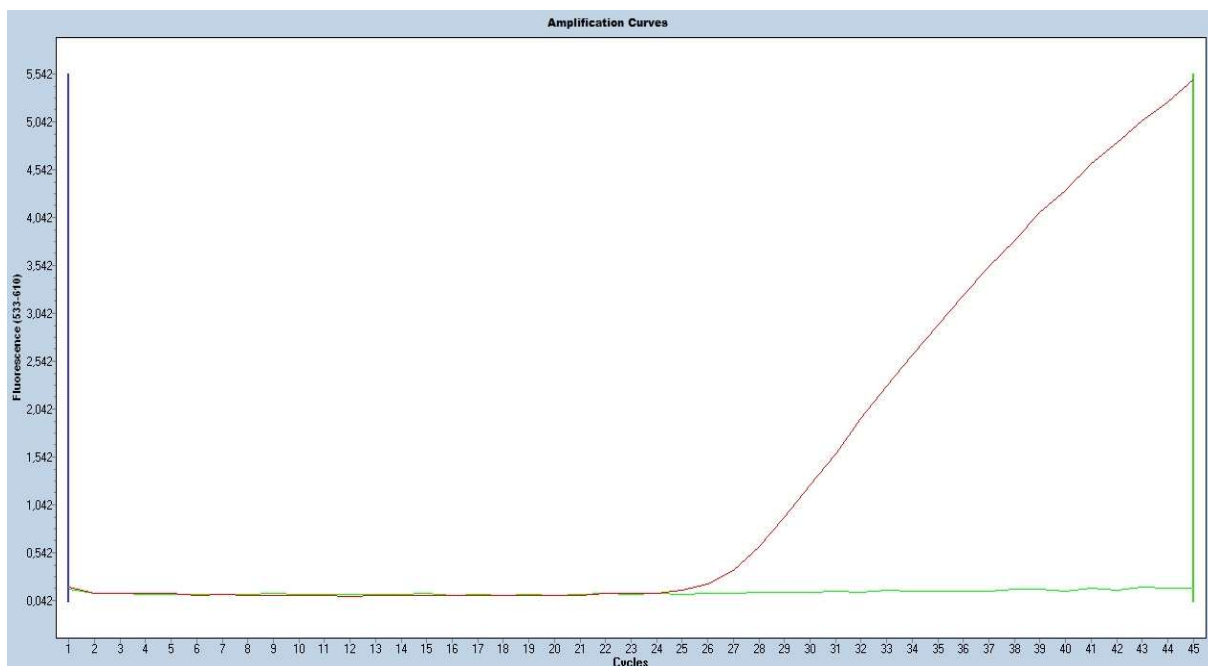
Os controles positivo e negativo são válidos quando atendem às condições especificadas na tabela. A faixa de Ct para o controle positivo é especificada no Certificado de Garantia de Qualidade incluído no produto. Se um dos dois controles não atender às condições para uma execução válida, todas as reações precisarão ser analisadas novamente, incluindo os controles.

Se os valores especificados não forem atingidos, verifique os seguintes itens antes de repetir o teste:

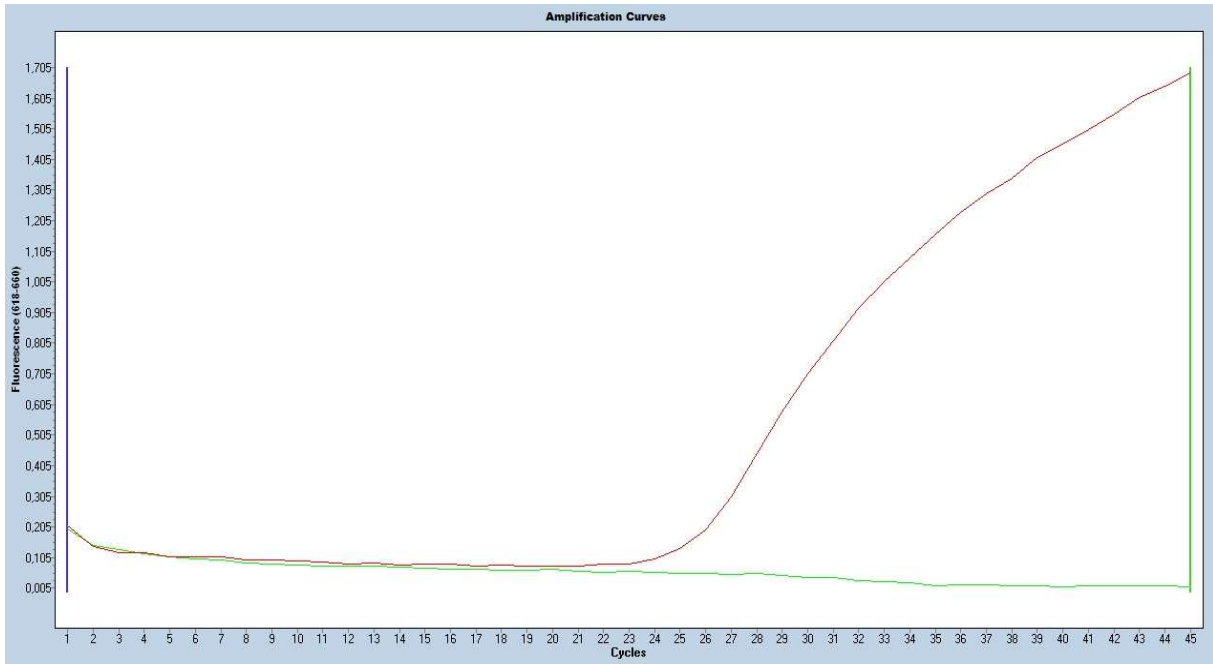
- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo utilizado
- Execução correta do teste



**Fig. 1:** Execução correta do controle positivo (vermelho) e negativo (verde) (junção SCCmec / orfX) no LightCycler® 480II



**Fig. 2:** Execução correta do controle positivo (vermelho) e negativo (verde) SA442 (SA442 (*S.aureus*)) no LightCycler® 480II



**Fig. 3:** Execução correta do controle positivo (vermelho) e negativo (verde) (mecA/mecC) no LightCycler® 480II

## 11. Interpretação das amostras

A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a Tabela 9.

**Tabela 9:** Interpretação das amostras

Detecção de			ICD	Resultado
Junção SCCmec / orfX	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	mecA / mecC		
positivo	positivo	positivo	positivo / negativo	<b>MRSA* detectável (ver Limitações do método no ponto 8)</b>
positivo	positivo	negativo	positivo / negativo	<b>MRSA não detectável; MSSA** detectável (ver Limitações do método no ponto 7)</b>
negativo	positivo	negativo	positivo / negativo	<b>MSSA detectável</b>
negativo	negativo	positivo	positivo / negativo	<b>MRSA não detectável (ver Limitações do método no ponto 9)</b>
negativo	positivo	positivo	positivo / negativo	<b>MRSA não detectável; MSSA detectável (ver Limitações do método no ponto 8)</b>
positivo	negativo	positivo	positivo / negativo	<b>MRSA não detectável (ver Limitações do método no ponto 7)</b>
negativo	negativo	negativo	positivo	<b>Gene-alvo não detectável</b>
negativo	negativo	negativo	negativo	<b>Inválido</b>
positivo	negativo	negativo	positivo / negativo	<b>Nem o MRSA nem o MSSA são detectáveis (ver Limitações do método no ponto 7)</b>

\* MRSA = *S. aureus* resistente à metilina

\*\* MSSA = *S. aureus* sensível à metilina

Uma amostra é considerada positiva se a amostra de DNA e o Internal Control DNA mostrarem um sinal de amplificação no sistema de detecção.

Uma amostra também é considerada positiva se o DNA da amostra apresentar um sinal de amplificação mas não for possível encontrar nenhum sinal de amplificação no sistema de detecção para o Internal Control DNA. A detecção do Internal Control DNA não é necessária neste caso, porque as altas concentrações

de fragmentos amplificados podem causar um sinal fraco ou ausente do Internal Control DNA.

Uma amostra é considerada negativa se o DNA da amostra não mostrar um sinal de amplificação, mas um sinal de amplificação para o Internal Control DNA pode ser encontrado no sistema de detecção. A inibição da reação de PCR pode ser excluída através da detecção do Internal Control DNA.

Uma amostra é inválida se a amostra de DNA e o Internal Control DNA não mostrarem um sinal de amplificação no sistema de detecção. Existem inibidores de PCR na amostra ou ocorreu um erro durante o processo de extração. A amostra extraída deve ser diluída de 1:10 com água de PCR e reamplificada, ou o isolamento e a purificação da amostra devem ser melhorados.

## 12. Limitações do método

1. Este teste só é adequado para as amostras de esfregaços e cultura descritos.
2. Amostragem, transporte, armazenamento e manuseio inadequado de amostras ou carga de patógenos abaixo da sensibilidade analítica do teste podem levar a resultados falso-negativos.
3. O uso de métodos de triagem de MRSA baseados em PCR está sujeito a diretrizes específicas para cada país. O usuário é responsável por empregar e implementar estas diretrizes. Por exemplo, de acordo com KRINKO na Alemanha, os métodos de triagem baseados em PCR devem ser considerados provisórios até que os resultados finais da cultura sejam obtidos. No entanto, ainda podem ser usados como base provisória para uma política de higiene hospitalar.
4. Na literatura, são descritos 14 tipos de SCCmec. O PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE MRSA pode detectar os tipos de SCCmec I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X e XI. O RIDA®GENE MRSA pode não detectar outros tipos de SCCmec, podendo mostrar resultados negativos.
5. A presença de inibidores de PCR pode levar a resultados não avaliáveis.
6. Mutações ou polimorfismos nos locais de ligação do iniciador ou da sonda podem interferir na detecção de variantes novas ou desconhecidas e podem levar a resultados negativos falsos usando o RIDA®GENE MRSA.
7. Como em todos os testes de diagnóstico *in vitro* baseados em PCR, podem ser detectadas concentrações extremamente baixas das sequências-alvo abaixo do limite de detecção (LoD). Os resultados obtidos nem sempre são reproduzíveis.
8. Um resultado positivo nos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Um resultado positivo indica a existência dos genes-alvo correspondentes (gene *mecA/mecC*, a junção *SCCmec/orfX* e o gene *SA442*).
9. Pode não ocorrer um sinal em todos os canais para amostras de LoD, mesmo com uma amostra que seja MRSA-positiva.

10. Dada a evidência do gene de resistência, pode existir uma infecção mista de MSSA (*S. aureus* sensível à meticilina) e CoNS (estafilococos coagulase negativos).
11. Se apenas o gene de resistência *mecA/mecC* for detectado, o MRSA não é detectável. No entanto, se o gene de resistência for detectado, também pode haver uma infecção com *Staphylococcus coagulase negativo*, uma vez que também pode possuir o gene de resistência *mecA/mecC*.
12. Em uma concentração testada de 2,1% e acima, o enxaguante bucal ProntOral (poli-hexanida) mostra um efeito inibidor.
13. Em uma concentração testada de 2,1% e superior, o gel nasal Prontoderm (poli-hexanida) mostra um efeito inibitório.
14. Em uma concentração testada de 1,5% ou superior, o sangue humano mostra um efeito inibitório.
15. A partir de uma quantidade testada de 6 mg, o ágar COS tem um efeito inibidor.

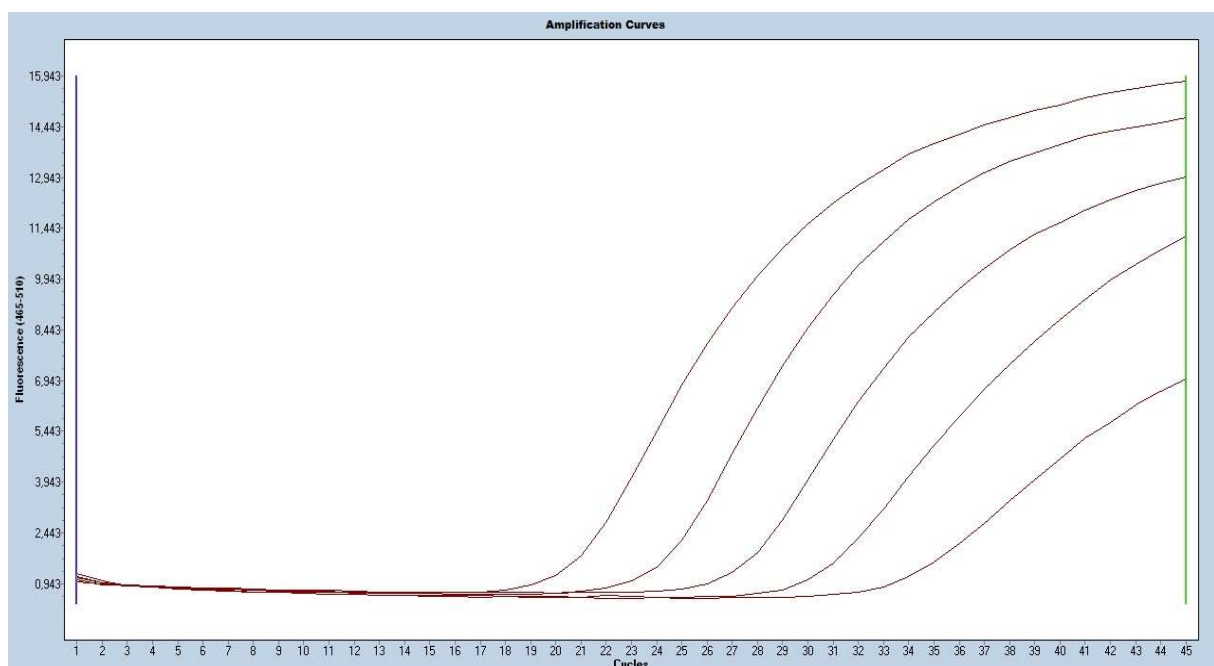
### 13. Características de desempenho

#### 13.1 Sensibilidade analítica

O PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE MRSA tem um limite de detecção de  $\geq 10$  cópias/reações de DNA para a junção SCCmec/orfX, o gene *mecA/mecC* e o gene SA442 (*S. aureus*).

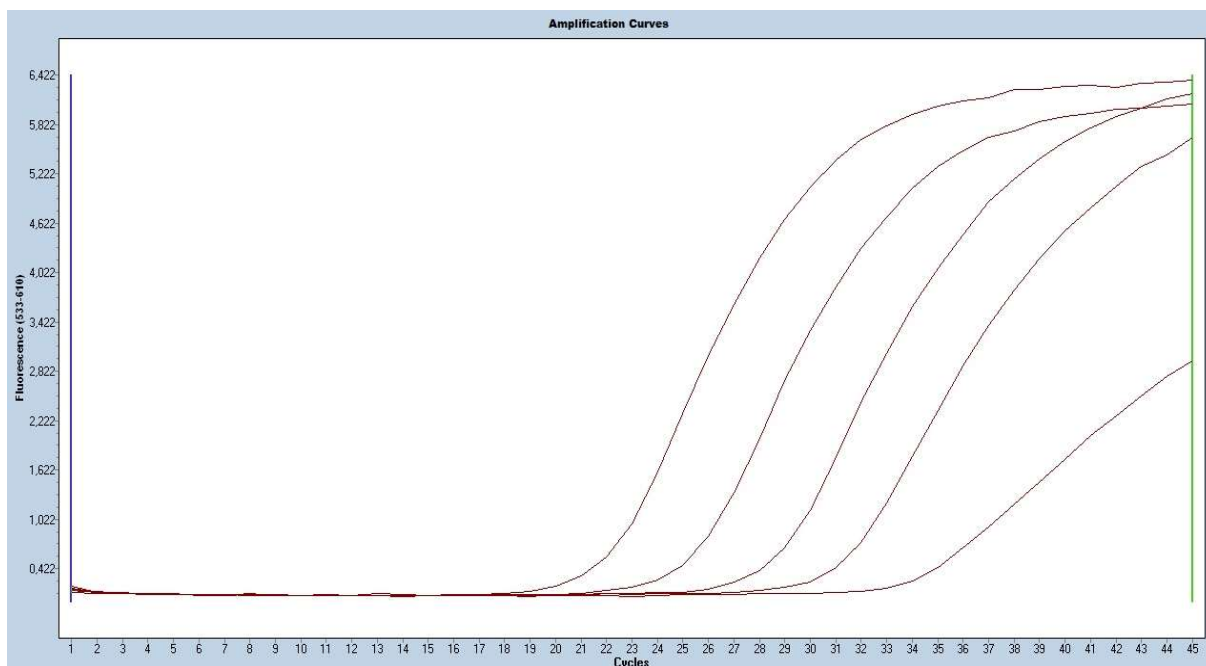
As Fig. 4, 5, 6 e 7 abaixo mostram uma série de diluição da junção SCCmec/orfX, o gene *mecA/mecC* e o gene SA442 (*S. aureus*).

(Em cada caso,  $10^5 - 10^1$  cópias de DNA/ $\mu$ l) no LightCycler® 480II.

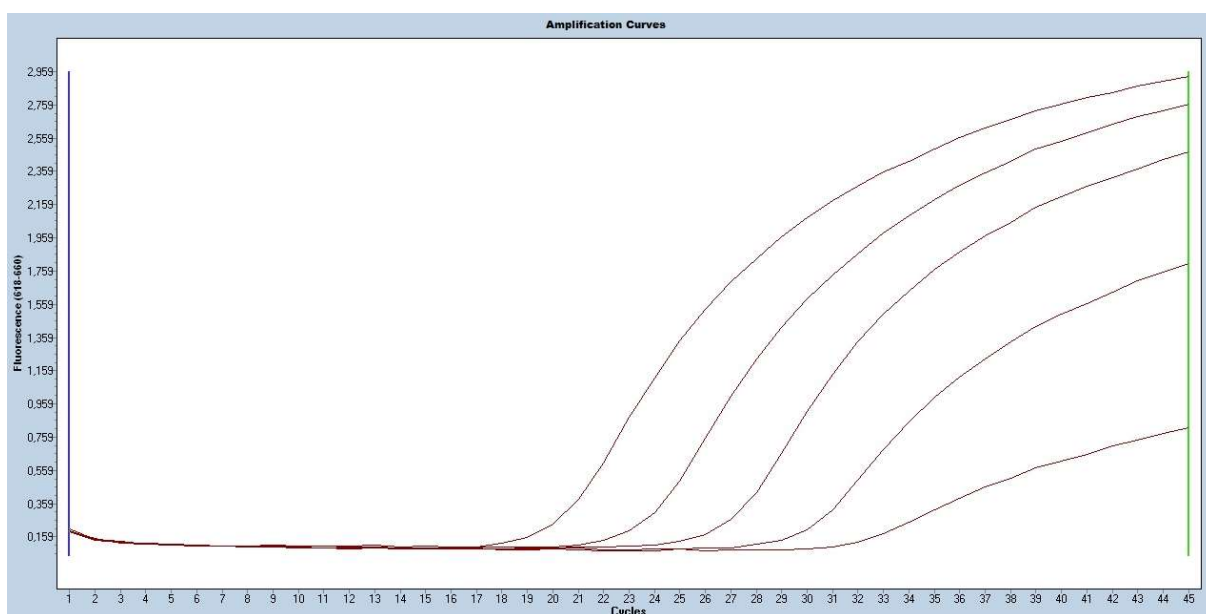


**Fig. 4:** Série de diluição da junção SCCmec/orfX ( $10^5 - 10^1$  cópias de DNA/ $\mu$ l) no LightCycler® 480II





**Fig. 5:** Série de diluição do gene SA442 específico para *S. aureus* ( $10^5$  -  $10^1$  cópias de DNA/ $\mu$ l) no LightCycler® 480II



**Fig. 6:** Série de diluição do gene *mecA/mecC* ( $10^5$  -  $10^1$  cópias de DNA/ $\mu$ l) no LightCycler® 480II

O limite de detecção do processo geral depende da matriz da amostra, da extração do DNA e do conteúdo do DNA.

## 13.2 Especificidade analítica

A especificidade analítica dos testes do RIDA®GENE MRSA foi avaliada utilizando um painel de amostras não estafilocócicas, estafilococos coagulase negativos sensíveis à meticilina (MSCoNS) e estafilococos coagulase negativos resistentes à meticilina (MRCoNS). Não foram detectadas reatividades cruzadas para as seguintes espécies (consulte a Tabela 10):

**Tabela 10:** Testes de reatividade cruzada

<b>Espécies não estafilocócicas</b>					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Acinetobacter iwofii</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>		<i>Candida glabrata</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>E. coli (O157:H7)</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	<i>Streptococcus mitiga</i>	-	<i>Streptococcus mutans</i>	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-		
<b>Estafilococos coagulase negativos sensíveis à meticilina</b>					
<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. hominis</i>	-	<i>S. warneri</i>	-
<b>Estafilococos coagulase negativos resistentes à meticilina</b>					
<i>S. haemolyticus</i>	-	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>	-

### 13.3. Substâncias interferentes

A presença de inibidores de RT-PCR e de substâncias interferentes pode levar a resultados falso-negativos ou inválidos. De forma correspondente, foram investigados os efeitos de várias substâncias que podem existir dada a sua utilização generalizada para infecções respiratórias, ou a existência generalizada nas amostras correspondentes. Foram observados efeitos inibidores nas concentrações testadas (ver Limitações do método) para as substâncias Enxaguante bucal ProntOral (poli-hexanida), sangue humano, gel nasal Prontoderm (poli-hexanida) e ágar COS. Não foi identificada qualquer interferência para as outras substâncias listadas (Tabela 11 e Tabela 12):

**Tabela 11:** Lista das substâncias e concentrações utilizadas no teste (amostras de esfregaço)

Substância/aditivo	Concentração
RatioAllerg (dipropionato de beclometasona)	10,0% (v/v)
Gel nasal de octenisan (dicloridina de octenidina)	7,0% (p/v)
Mucina	5,0% (v/v)
Aciclovir (pomada)	0,5% (p/v)
InfectoPioderm (Mupirocina)	1,80% (p/v)
Tobramina	0,0004% (p/v)
FeniHydrocort (hidrocortisona)	7,0% (p/v)

**Tabela 12:** Lista das substâncias e concentrações utilizadas no teste (cultura)










Substância/aditivo	Concentração
Ágar MRSA	20 mg

## 14. Histórico de versões

Número da versão	Seção e designação
2020-11-17	Versão anterior
2022-07-21	Revisão geral: 1. Uso previsto 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos 9.4 Configuração do canal de detecção 10. Controle de qualidade

## 15. Explicação dos símbolos

### Símbolos gerais

	Para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Respeitar as instruções de utilização
	Número de lote
	Data de validade
	Temperatura de conservação
	Número do item
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

### Símbolos específicos do teste

Reaction Mix

Taq Polymerase

Internal Control DNA

No Template Control

Positive Control

Lysin Buffer 1

## 16. Referências

1. Dulon M et al. MRSA prevalence in european healthcare settings: a review. *BMC Infectious Diseases* 2011, 11:138.
2. Köck R et al. The Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 2011, 108(45): 761-7.
3. Robert Koch Institut. *Staphylokokken (MRSA)*. RKI-Ratgeber für Ärzte 2009.
4. Kuehnert MJ et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization in the United States, 2001–2002. *JID* 2006, 193: 172-179.
5. Golding GR et al. Livestock-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 in Humans, Canada. *EID* 2010, 16(4): 587-594.
6. RKI 2011. Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2010. *Epid. Bull.* 26.
7. International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements 2011. [http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_HomeEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html).
8. Meng, X et al. Rapid Detection of *mecA* and *femA* Genes by Loop-Mediated Isothermal Amplification in a Microfluidic System for Discrimination of Different Staphylococcal Species and Prediction of Methicillin Resistance. *Frontiers in microbiology*. 2020, 11. Jg.
9. García-Álvarez, L et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2011, 11: 595–603.
10. Cosgrove SE et al. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2003, 36(1):53-59.
11. Cosgrove SE et al. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005, 26(2):166-174.
12. Jerningan JA et al. Prevalence of and Risk Factors for Colonization with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* at the Time of Hospital Admission. *Infect Control and Hosp Epidemiol*. 2003, 24 (6): 409-414.
13. Diller R et al. Evidence for cost reduction based on pre-admission MRSA screening in general surgery *Int J Hyg Environ Health* 2008; 211 (1-2): 205-212.
14. Köck R, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill*. 2010, 15(41):19688.
15. Robicsek A et al. Universal Surveillance for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in 3 Affiliated Hospitals. *Ann Intern Med*. 2008, 148(6):409-418.