

RIDA® GENE MRSA

REF PG0605



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

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



1. Uso previsto

Para el uso diagnóstico *in vitro*. El ensayo RIDA®GENE MRSA, realizado en el LightCycler® 480 II de Roche, es una PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (SASM) en hisopos nasales o faríngeos humanos no tratados, hisopos de heridas y cultivos de personas asintomáticas y personas que muestran signos y síntomas de infección causada por SARM.

El ensayo RIDA®GENE MRSA está previsto para asistir en el diagnóstico de infecciones por estafilococos (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, SARM; *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina, SASM) en personas asintomáticas y en personas que presentan síntomas de infección causada por SARM en conjunción con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan la infección por estafilococos (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (SASM)) y no deben utilizarse como única base para el diagnóstico. El producto está destinado a un uso profesional.

2. Resumen y descripción del ensayo

Los estafilococos se encuentran muy extendidos como colonizadores naturales de la piel y la mucosa de la orofaringe en humanos y animales. Se dividen en estafilococos coagulasa positivos (*S. aureus*) y estafilococos coagulasa negativos (como *S. epidermidis*). *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos más importantes de las infecciones nosocomiales en los hospitales y otros centros sanitarios.^{1,2} El patógeno se transmite a través del personal médico o de otros pacientes. Se estima que el 30 % de la población sana está colonizada por *S. aureus* (portadores asintomáticos). El *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) es uno de los patógenos más frecuentes de las infecciones nosocomiales en todo el mundo (SARM adquirido en el hospital, o simplemente, SARM-AH). Además de las infecciones por SARM-AH, también existen infecciones por SARM adquiridas en la comunidad (SARM-AC) que pueden contraerse fuera del hospital.^{3,4} En los últimos años, se han producido infecciones por SARM asociadas al ganado o SARM-AG en el contexto de los animales de engorde, en particular entre los criadores de cerdos.^{5,6} La resistencia a la meticilina (oxacilina) de *S. aureus* está mediada por la proteína de unión a la penicilina PBP2a, codificada por el gen cromosómico *mecA*. El gen *mecA* se ubica en el casete genético variable e inestable *SCCmec* (cassette cromosómico estafilocócico mec). Hasta la fecha, se han descrito 14 tipos de cassette *SCCmec*, de los cuales, los tipos I a V son los más frecuentes.^{3,7,8}

El casete *SCCmec* tipo XI (*SCCmec* XI), que contiene otro homólogo de *mecA* (también denominado *mecC* o *meCLGA251*, fue descrito por primera vez en 2011. El gen *mecC* tiene solo una homología nucleotídica del 70 % con *mecA* y no es

detectable mediante ensayos normales de PCR específicos de *mecA* ni de aglutinación de PBP2a. Se ha caracterizado en aislados de *S. aureus* de humanos y ganado.⁹

A diferencia de las infecciones por SASM (*Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina), las infecciones por SARM se asocian a una elevada morbilidad, mortalidad, estancias hospitalarias prolongadas y mayores costos de tratamiento.^{10,11} Los factores de riesgo de infección por SARM en los centros sanitarios son el contacto con pacientes con una infección por SARM, antecedentes conocidos de SARM, la duración de la estancia hospitalaria y el tratamiento antibiótico a largo plazo.¹²

Cada infección por SARM genera hasta 10 000 USD en costos adicionales.¹³ En la Unión Europea, más de 150 000 pacientes hospitalizados sufren una infección por SARM. Los costos hospitalarios resultantes para el sistema sanitario europeo se estiman en 380 millones EUR.¹⁴

La detección precoz, rápida y sistemática del SARM permite tratar específicamente a los pacientes infectados e introducir métodos de higiene adecuados para prevenir la transmisión y la propagación del SARM.

Con los métodos de cultivo convencionales, se necesitan entre 48 y 72 horas para detectar el SARM. Los ensayos de PCR en tiempo real permiten una detección precoz y rápida del SARM en la fecha de ingreso en el hospital como parte del programa de prevención de infecciones (estrategia de "búsqueda y destrucción").¹⁵

3. Principio del ensayo

RIDA®GENE MRSA es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación entre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (SASM) en cultivos de muestras de nariz o faringe humanas. Tras aislar el ADN, se amplifican los fragmentos de genes específicos (si están presentes) del SARM (el gen *mecA/mecC*, la unión *SCCmec/orfX* y el gen *SA442*). Las secuencias diana amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis marcadas con un extintor de fluorescencia en un extremo y un colorante fluorescente indicador (fluoróforo) en el otro. Las sondas se hibridan con el amplicón en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la **Taq-Polymerase** separa al indicador del extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta con la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA®GENE MRSA contiene **Internal Control DNA** (ICD) para controlar la preparación de las muestras o cualquier posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones).

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1100 µl	Amarillo
2	Taq-Polymerase	1x	11 µl	Rojo
D	Internal Control DNA	2x	1800 µl	Café
L	Lysis Buffer 1	2x	12 ml	Incoloro
N	PCR Water	1x	500 µl	Blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	Azul

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben almacenarse lejos de la luz a -16 °C y -28 °C, y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez alcanzada la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 °C - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 15 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a las propiedades del ensayo (si es necesario, prepare alícuotas tras la primera descongelación y vuelva a congelar los reactivos de inmediato).
- Refrigere todos los reactivos adecuadamente durante la preparación de la PCR (2 °C - 8 °C).

6. Reactivos necesarios no suministrados

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE MRSA puede usarse con los siguientes dispositivos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipo necesario

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

Si necesita usar otros procedimientos de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm para comprobar la compatibilidad en pcr@r-biopharm.de.

- Sistema de recolección con hisopo estéril (p. ej., eSwab®, Copan Diagnostic Inc.)
- RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) al usar el LightCycler® 480II
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, viales de reacción, cubiertas de plástico)
- Centrífuga con rotor para placas o viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Agitador térmico
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas de pipeta con filtros
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua sin nucleasas)

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

- Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.
- Siga siempre las instrucciones de uso al llevar a cabo esta prueba.
- No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.
- Lleve equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lávese las manos después de finalizar el ensayo.
- No fume, ni coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.
- Asegúrese de que la extracción, la preparación de PCR y la PCR se lleven a cabo en cuartos separados, con el fin de evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.
- Deseche el kit de ensayo cuando alcance la fecha de caducidad.
- Los usuarios serán los responsables de desechar de forma correcta y responsable todos los reactivos y materiales usados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Para obtener información más detallada, consulte las hojas de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de ADN a partir de hisopos

Para aislar el ADN de los hisopos se recomienda el siguiente método de aislamiento: Añada 200 µl de **Lysis Buffer 1** a un vial de preparación. Sumerja la punta del hisopo en el tampón de lisis 1 prepipeteado y rompa o corte el palo. Si se utilizan hisopos con medio, puede añadir 100 µl de medio de hisopado a los 200 µl de tampón de lisis y seguir tratándolo. Selle bien los viales de preparación y agítelos en un mezclador vórtex a alta velocidad durante 60 segundos. Caliente durante 10 minutos a 95 °C en un bloque térmico mientras se agita. A continuación, centrifugue durante 1 minuto a 13 000 x g y utilice el sobrenadante como muestra.

Nota: Repita si la preparación se vuelve muy opaca mientras se centrifuga.

El ensayo RIDA®GENE MRSA contiene un **Internal Control DNA** que indica la posible inhibición de la PCR, comprueba la integridad de los reactivos y confirma la extracción correcta de los ácidos nucleicos. El **Internal Control DNA** puede usarse ya sea únicamente como control de inhibición o como control de extracción para la preparación de las muestras, y como control de inhibición.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición, se debe añadir 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla maestra por cada reacción (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción para la preparación de las muestras **y** como control de inhibición, se debe añadir 20 µl de **Internal Control DNA** durante la extracción por cada muestra. El **Internal Control DNA** debe agregarse a la mezcla de muestra y búfer de lisado, y **no** directamente al material de muestra. Se recomienda agregar 1 µl por reacción del **Internal Control DNA** tanto a la mezcla para PCR de control negativo como a la de control positivo.

8.2 Preparación de ADN a partir de muestras de cultivo

Para aislar el ADN de las muestras de cultivo se recomienda el siguiente método de aislamiento: Añada 200 µl de **Lysis Buffer 1** a un vial de preparación. Con un asa de inoculación, recoja varias colonias y suspéndalas en el tampón de lisis 1 prepipeteado. Rompa o corte el palo del asa de inoculación. Selle bien los viales de preparación y agítelos en un mezclador vórtex a alta velocidad durante 60 segundos. Caliente durante 10 minutos a 95 °C en un bloque térmico mientras se agita. A continuación, centrifugue durante 1 minuto a 13 000 x g y utilice el sobrenadante como muestra.

Nota: Repita si la preparación se vuelve muy opaca mientras se centrifuga.

El ensayo RIDA®GENE MRSA contiene un **Internal Control DNA** que indica la posible inhibición de la PCR, comprueba la integridad de los reactivos y confirma la extracción correcta de los ácidos nucleicos. El **Internal Control RNA** puede usarse ya sea únicamente como control de inhibición o como control de extracción para la preparación de las muestras, y como control de inhibición.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición, se debe añadir 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla maestra por cada reacción (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción para la preparación de las muestras **y** como control de inhibición, se debe añadir 20 µl de **Internal Control DNA** durante la extracción por cada muestra. El **Internal Control DNA** debe agregarse a la mezcla de muestra y búfer de lisado, y **no** directamente al material de muestra. Se recomienda agregar 1 µl por reacción del **Internal Control DNA** tanto a la mezcla para PCR de control negativo como a la de control positivo.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Debe calcularse el número total de reacciones (reacciones de muestras y de control) necesario para la PCR. En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda añadir un volumen adicional del 10 % a la mezcla maestra para compensar las pérdidas por pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Antes de su uso, descongele, mezcle y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq Polymerase**, el **Positive Control**, el **PCR Water** y el **Internal Control DNA**. Refrigere siempre los reactivos de forma adecuada durante las etapas del trabajo (2 °C- 8 °C).

Tabla 3: Ejemplo del cálculo y la producción de la mezcla maestra para 10 reacciones (ICD como control de extracción e inhibición)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más 10 %)
1	Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq-Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle la mezcla maestra y centrifugue durante un breve lapso.

Tabla 4: Ejemplo del cálculo y la producción de la mezcla maestra para 10 reacciones (ICD solo como control de inhibición)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más 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	11,0 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mezcle la mezcla maestra y centrifugue durante un breve lapso.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (vial/placa).

Control negativo: Añada 5 µl del **Positive Water** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Se recomienda agregar 1 µl del **Internal Control DNA** en la mezcla para PCR del control negativo al usar el **Internal Control DNA** como control de extracción para la preparación de muestras y como control de la inhibición.

Muestras: Añada 5 µl de eluato a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Añada 5 µl del **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Se recomienda agregar 1 µl del **Internal Control DNA** en la mezcla para PCR del control positivo al usar el **Internal Control DNA** como control de extracción para la preparación de muestras y como control de la inhibición.

Selle los viales o placas de reacción, centrifugue brevemente y transfiera al dispositivo de PCR en tiempo real. Comience la PCR de acuerdo con la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5 y 6).

9.3 Configuración del dispositivo de PCR

9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil de ADN por PCR en tiempo real en el LightCycler® 480II

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
PCR Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/ Velocidad de rampa	Tiempo máximo de

Nota: La hibridación y la extensión pueden ocurrir en el mismo paso.

Tabla 6: Perfil de PCR en tiempo real del ADN para Mx3005P, ABI 7500 y CFX96™

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/ Velocidad de rampa	Tiempo máximo de

Nota: La hibridación y la extensión pueden ocurrir en el mismo paso.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 7: Selección de los canales de detección adecuados

Dispositivo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Comentario
Roche LightCycler® 480 II	Unión <i>SCCmec/orfX</i>	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001).
	ICD	533/580	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	533/610	
	<i>mecA/mecC</i>	618/660	
Agilent Technologies Mx3005P	Unión <i>SCCmec/orfX</i>	FAM	Establezca el colorante de referencia en "none" (ninguno).
	ICD	HEX	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	ROX	
	<i>mecA/mecC</i>	Cy5	
ABI 7500	Unión <i>SCCmec/orfX</i>	FAM	Establezca el colorante de referencia pasivo ROX en "none" (ninguno).
	ICD	VIC	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	ROX	
	<i>mecA/mecC</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	Unión <i>SCCmec/orfX</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	ROX	
	<i>mecA/mecC</i>	Cy5	

10. Control de calidad

Las muestras se evalúan con el software de análisis del dispositivo de PCR en tiempo real respectivo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los controles negativo y positivo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 8 y las figuras 1, 2 y 3).

El **Positive Control** tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. Se usa en una cantidad total de 5×10^3 copias en cada corrida de PCR.

Tabla 8: Una corrida de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado	Ct del ICD	Ct de genes diana
Control positivo	Positivo	N/D *1	Ver Certificate of Analysis
Control negativo	Negativo	Ct > 20	No es detectable

**1 No es necesario tener un valor de Ct para el ICD para obtener un resultado positivo del control positivo.*

Los controles positivo y negativo son válidos cuando cumplen las condiciones especificadas en la tabla. El rango de Ct para el control positivo se especifica en el Certificado de Garantía de Calidad incluido con el producto. Si uno de los dos controles no cumple las condiciones para una corrida válida, todas las reacciones deben volver a analizarse, incluidos los controles.

Si los valores especificados no se cumplen, compruebe lo siguiente antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

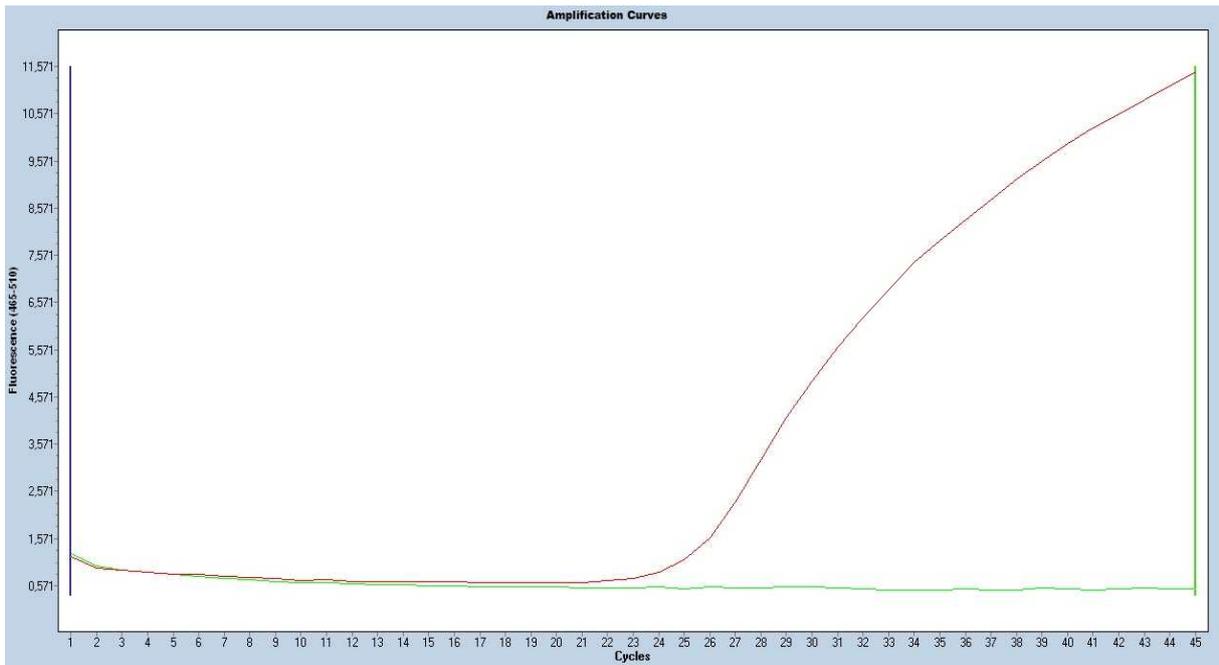


Figura 1: Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (unión *SCCmec/orfX*) en el LightCycler® 480II

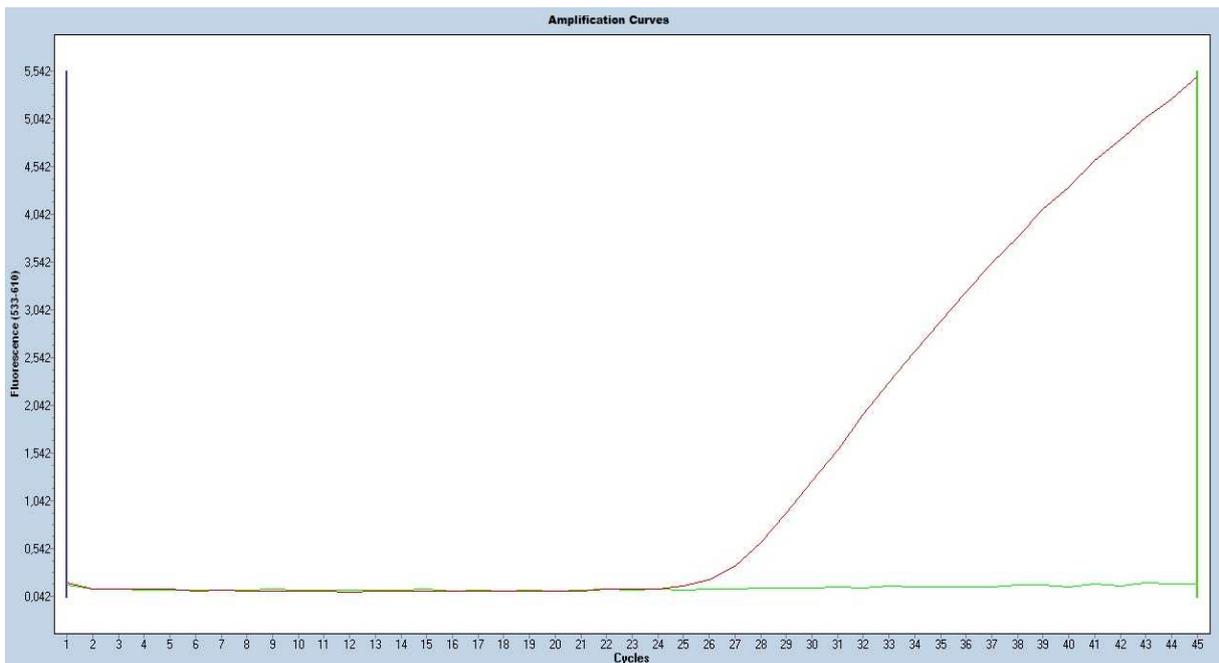


Figura 2: Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y el control negativo (verde) (SA442 [*S. aureus*]) de SA442 en el LightCycler® 480II

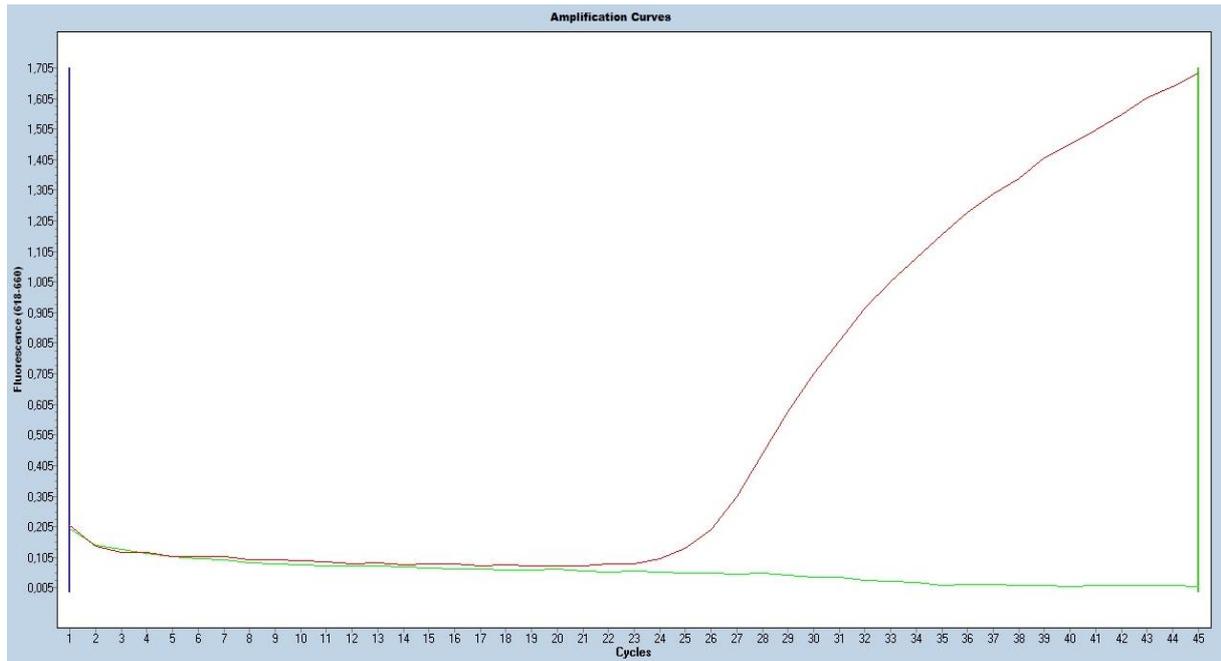


Figura 3: Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*mecA/mecC*) en el LightCycler® 480II

11. Interpretación de las muestras

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 9.

Tabla 9: Interpretación de las muestras

Detección de			ICD	Resultado
Unión <i>SCCmec/orfX</i>	SA442 (<i>S.aureus</i>)	<i>mecA</i> / <i>mecC</i>		
positivo	positivo	positivo	positivo / negativo	SARM* detectable (ver Limitaciones del método en el punto 8)
positivo	positivo	negativo	positivo / negativo	SARM no detectable; SASM** detectable (ver Limitaciones del método en el punto 7)
negativo	positivo	negativo	positivo / negativo	SASM detectable
negativo	negativo	positivo	positivo / negativo	SARM no detectable (ver Limitaciones del método en el punto 9)
negativo	positivo	positivo	positivo / negativo	SARM no detectable; SASM detectable (ver Limitaciones del método en el punto 8)
positivo	negativo	positivo	positivo / negativo	SARM no detectable (ver Limitaciones del método en el punto 7)
negativo	negativo	negativo	positivo	Gen diana no detectable
negativo	negativo	negativo	negativo	No válido
positivo	negativo	negativo	positivo / negativo	No se detectan ni SARM ni SASM (ver Limitaciones del método en el punto 7)

* SARM = *S. aureus* resistente a la metilina

** SASM = *S. aureus* sensible a la metilina

Se determina que una muestra es positiva si tanto el ADN de la muestra como el **Internal Control DNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

También se determina que una muestra es positiva si el ADN de la muestra presenta una señal de amplificación pero no puede encontrarse ninguna señal de amplificación del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La detección del **Internal Control DNA** no es necesaria en este caso debido a que las concentraciones

altas de amplicón pueden dar lugar a una señal débil o ausente del Internal Control DNA.

La muestra se considera negativa si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero sí hay señal de amplificación del Internal Control DNA en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del Internal Control DNA.

Se determina que una muestra no es válida si tanto el ADN de la muestra como el Internal Control DNA no presentan señal de amplificación en el sistema de detección. Hay inhibidores de la PCR en la muestra o se produjo un error durante el proceso de extracción. La muestra extraída debe diluirse 1:10 con agua para PCR y amplificarse de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

12. Limitaciones del método

1. Esta prueba solo es adecuada para las muestras de hisopo y de cultivo descritas.
2. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de las muestras, o una carga de patógenos inferior a la sensibilidad analítica, pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
3. El uso de métodos de detección de SARM basados en PCR está sujeto a las directrices específicas de cada país. El usuario es responsable de emplear y aplicar estas directrices. Por ejemplo, según KRINKO en Alemania, los métodos de detección basados en PCR deben considerarse provisionales hasta que se obtengan los resultados definitivos del cultivo. Sin embargo, pueden servir de base provisional para una política de higiene hospitalaria.
4. En la literatura se describen 14 tipos de *SCCmec*. El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE MRSA puede detectar los tipos I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X y XI de *SCCmec*. RIDA®GENE MRSA puede no detectar otros tipos de *SCCmec* y mostrar resultados negativos.
5. La presencia de inhibidores de la PCR puede dar lugar a resultados no evaluables.
6. Las mutaciones o polimorfismos en los sitios de unión de la sonda o el cebador pueden interferir con la detección de variantes nuevas o desconocidas, y pueden dar lugar a resultados negativos falsos con RIDA®GENE MRSA.
7. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de las secuencias diana, por debajo del límite de detección (LD). Los resultados obtenidos no son siempre reproducibles.
8. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Un resultado positivo indica la existencia de los genes diana correspondientes (gen *mecA/mecC*, la unión *SCCmec/orfX* y el gen *SA442*).
9. Es posible que no se produzca una señal en todos los canales para las muestras de LoD, incluso con una muestra que sea SARM positiva.

10. Dada la evidencia del gen de resistencia, puede existir una infección mixta de SARM (*S. aureus* sensible a la meticilina) y SCN (estafilococos coagulasa negativos).
11. Si sólo se detecta el gen de resistencia *mecA/mecC*, el SARM no es detectable. Sin embargo, si se detecta el gen de resistencia, también puede haber una infección por estafilococo coagulasa negativo, ya que también puede poseer el gen de resistencia *mecA/mecC*.
12. A una concentración probada de 2,1 % y superior, el enjuague bucal ProntOral (polihexanida) muestra un efecto inhibitorio.
13. A una concentración probada de 2,1 % y superior, el gel nasal Prontoderm (polihexanida) muestra un efecto inhibitorio.
14. A una concentración probada de 1,5 % y superior, la sangre humana muestra un efecto inhibitorio.
15. A partir de una cantidad probada de 6 mg, el agar COS tiene un efecto inhibitorio.

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo por PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE MRSA tiene un límite de detección de ≥ 10 copias/reacciones de ADN para la unión *SCCmec/orfX*, el gen *mecA/mecC* y el gen *SA442* (*S. aureus*).

Las figuras 4, 5, 6 y 7 siguientes muestran las diluciones seriadas de la unión *SCCmec/orfX*, el gen *mecA/mecC* y el gen *SA442* (*S. aureus*)

(En cada caso, 10^5 a 10^1 copias de ADN/ μ l) en el LightCycler 480II

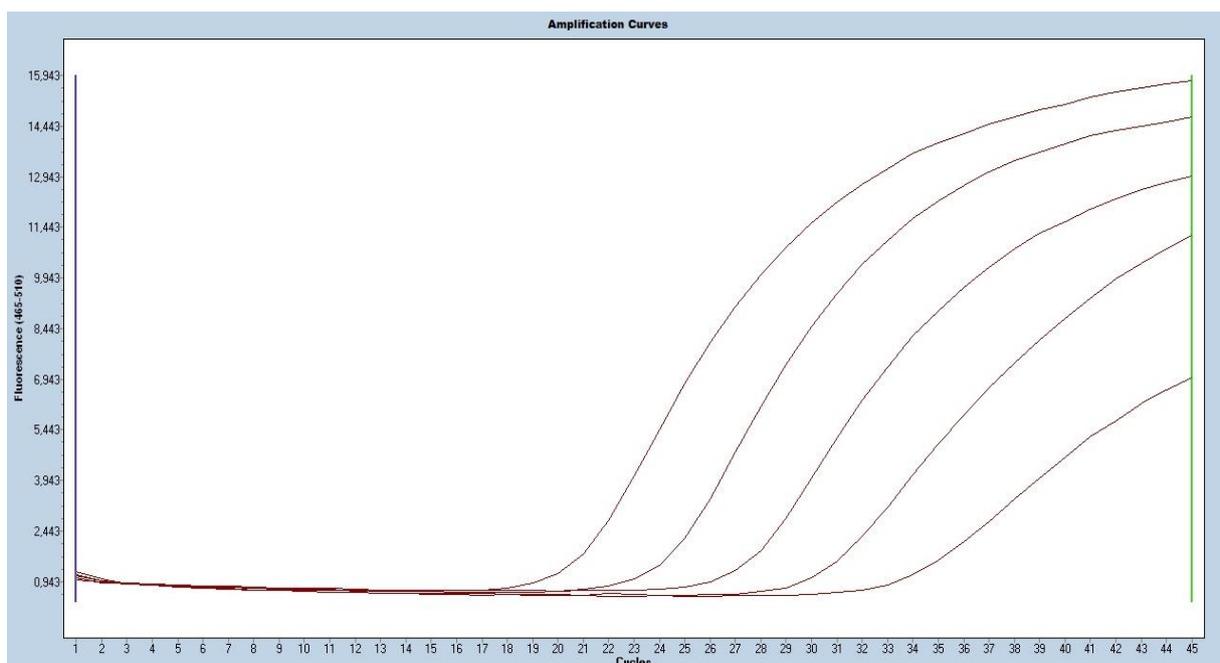


Figura 4: Dilución seriada de la unión *SCCmec/orfX* (10^5 a 10^1 copias de ADN/ μ l) en el LightCycler® 480II

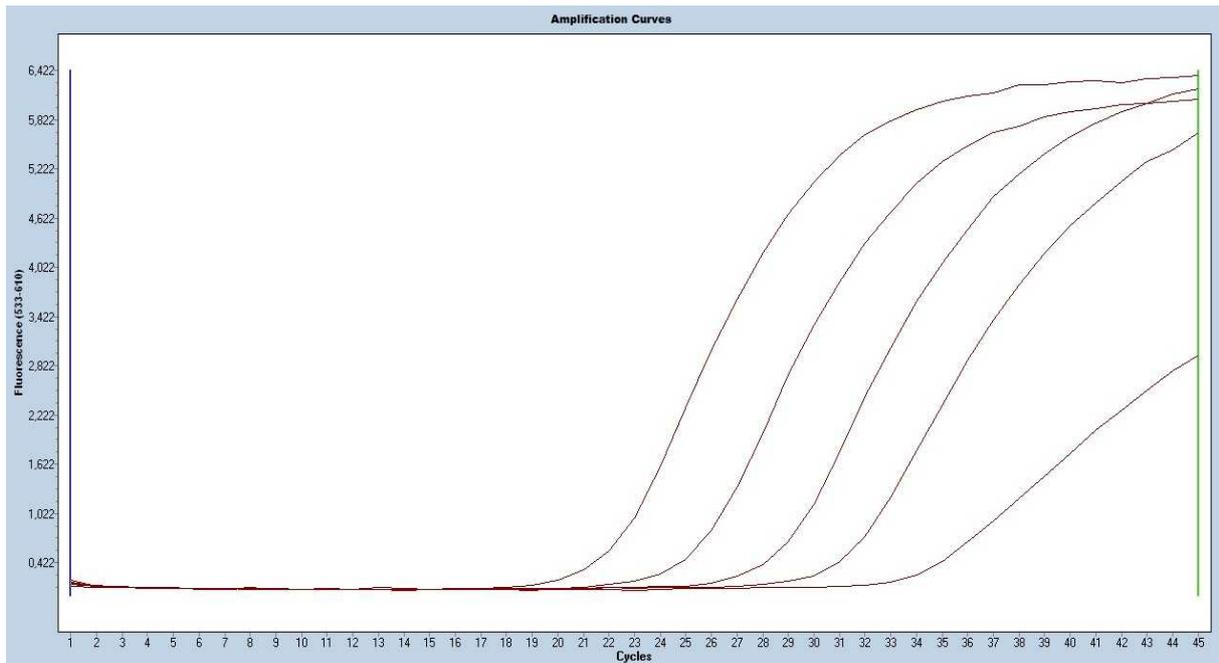


Figura 5: Dilución seriada del gen *SA442* específico para *S. aureus* (10^5 a 10^1 copias de ADN/ μ l) en el LightCycler® 480II

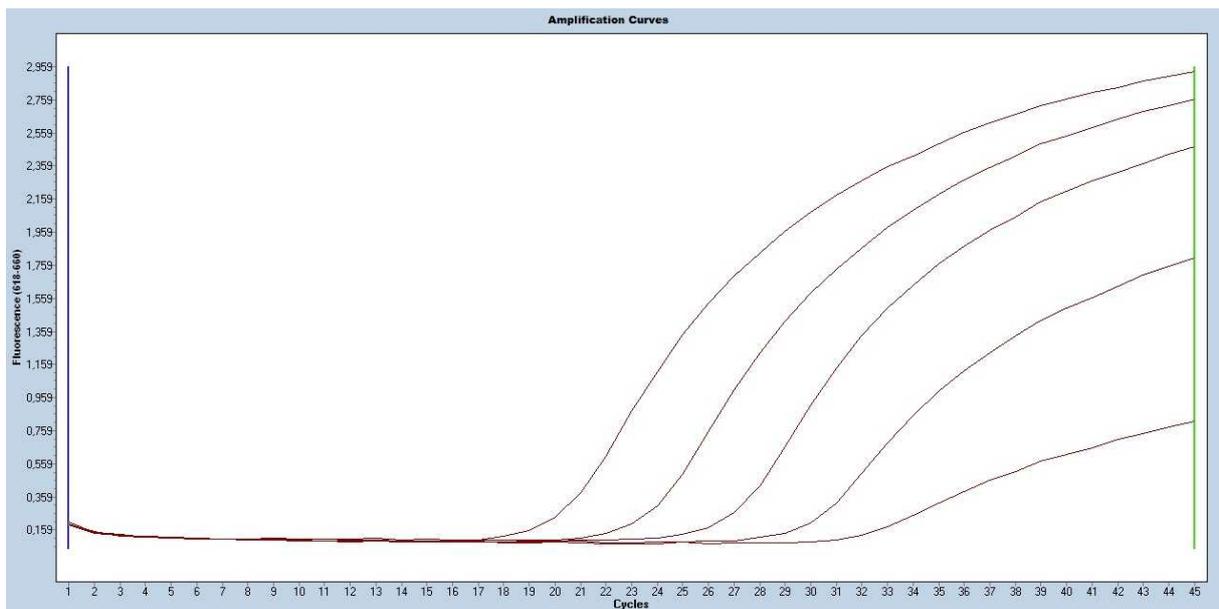


Figura 6: Dilución seriada del gen *mecA/mecC* (10^5 a 10^1 copias de ADN/ μ l) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el proceso depende de la matriz de la muestra, la extracción del ADN y el contenido de ADN.

13.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica de las pruebas RIDA®GENE MRSA se evaluó utilizando un panel de especies no estafilocócicas, estafilococos coagulasa negativos sensibles a la meticilina (SCNSM) y estafilococos coagulasa negativos resistentes a la meticilina (SCNRM). No se detectaron reactividades cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 10):

Tabla 10: Ensayos de reactividad cruzada

Especies no estafilocócicas					
<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 mitis</i>	-	<i>Streptococcus mutans</i>	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-		
Estafilococos coagulasa negativos sensibles a la meticilina					
<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. hominis</i>	-	<i>S. warneri</i>	-
Estafilococos coagulasa negativos resistentes a la meticilina					
<i>S. haemolyticus</i>	-	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>	-

13.3. Sustancias interferentes

La presencia de inhibidores de RT-PCR y sustancias interferentes puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos. En consecuencia, se investigaron los efectos de diversas sustancias que pueden existir dado su uso generalizado para las infecciones de las vías respiratorias, o la existencia generalizada en las muestras correspondientes. Se observaron efectos inhibidores a las concentraciones probadas (véase Limitaciones del método) para las sustancias enjuague bucal ProntOral (polihexanida), sangre humana, gel nasal Prontoderm (polihexanida) y agar COS. No se identificó interferencia con el resto de sustancias enumeradas (tablas 11 y 12):

Tabla 11: Lista de sustancias y concentraciones usadas en el ensayo (muestras de hisopo)

Sustancia/aditivo	Concentración
RatioAllerg (dipropionato de beclometasona)	10,0 % (v/v)
Gel nasal Octenisan (diclorhidrato de octenidina)	7,0 % (p/v)
Mucina	5,0 % (v/v)
Aciclovir (pomada)	0,5 % (p/v)
InfectoPyoderm (Mupirocina)	1,80 % (p/v)
Tobramicina	0,0004 % (p/v)
FeniHydrocort (hidrocortisona)	7,0 % (p/v)

Tabla 12: Lista de sustancias y concentraciones usadas en el ensayo (cultivo)

Sustancia/aditivo	Concentración
Agar SARM	20 mg

14. Historial de versiones

Número de versión	Sección y designación
2020-11-17	Versión anterior
2022-07-21	1. Uso previsto 6. Reactivos necesarios no suministrados 9.4 Configuración del canal de detección 10. Control de calidad
2023-03-21	5. Instrucciones de almacenamiento

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvense las instrucciones de uso
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

Reaction Mix

Taq-Polymerase

Internal Control DNA

PCR Water

Positive Control

Lysis Buffer 1

16. Bibliografía

1. Dulong 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.
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. Methicillin-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.