

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus

Handbook for the following references/

Manual para las siguientes referencias:

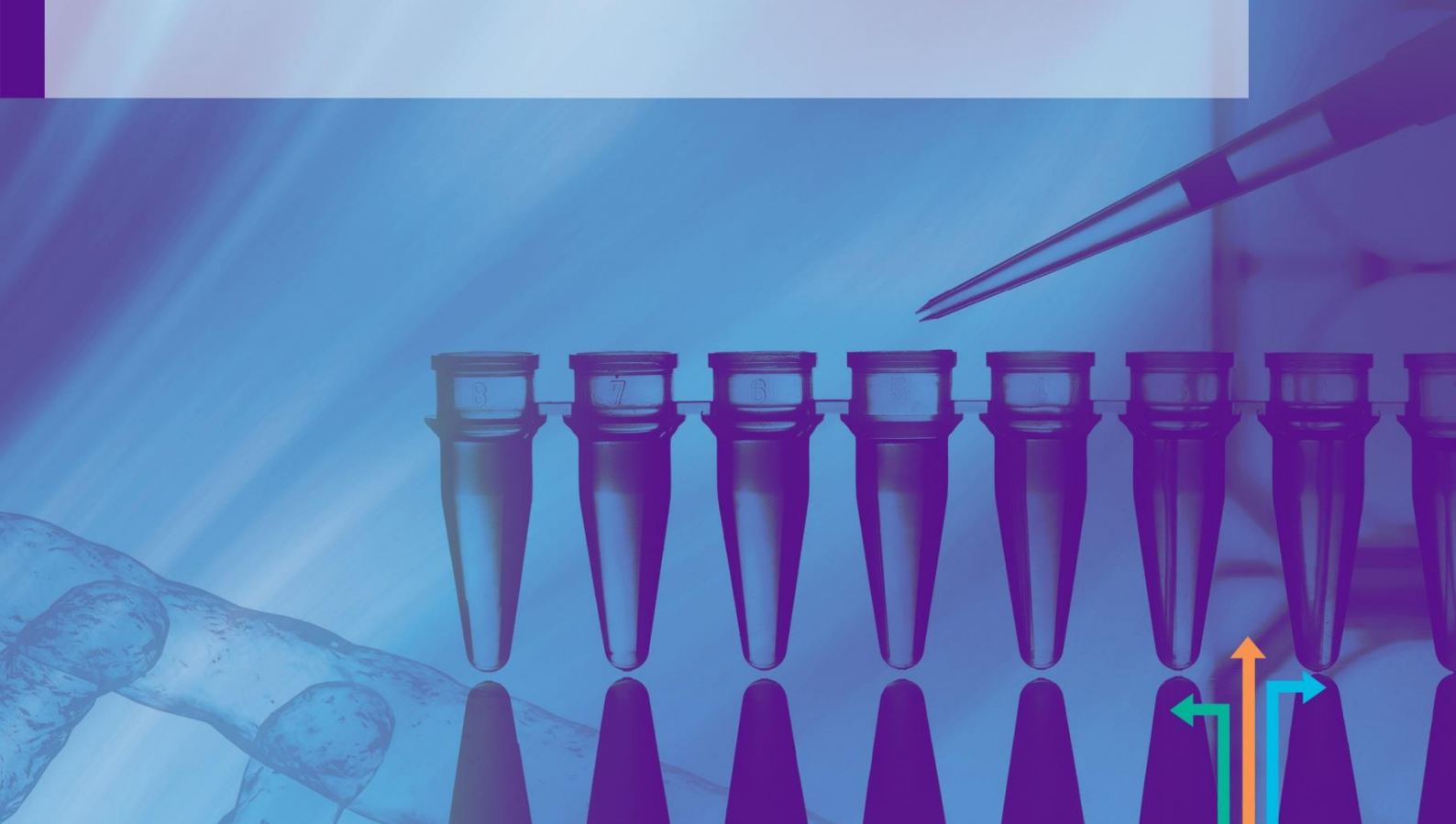
VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile VS-MSA106L

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile VS-MSA106H

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile VS-MSA112L

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile VS-MSA112H

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene® VS-MSA136



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and/or methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* (MRCoNS) from isolated colonies from human nasal, pharyngeal and perianal swabs plated onto chromogenic solid medium. This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of MRSA infection in combination with patient's clinical signs and symptoms and epidemiological risk factors. DNA is extracted from colonies, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probes for identification of *Staphylococcus aureus* and determination of methicillin resistance.

2. Summary and Explanation

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is perhaps the greatest concern of human pathogens because of its intrinsic virulence because of its ability to cause a diverse array of life-threatening infections and its capacity to adapt to different environmental condition. Nowadays, this organism is the leading overall cause of health-care associated infections globally and, as more patients are treated outside the hospital settings, is an increasing concern in the community. There are many anti-staphylococcal drugs, including methicillin, tetracyclines, fluoroquinolones, linezolid and daptomycin, but they quickly loss their therapeutic value due to the ability of the bacterium to develop effective mechanisms to confront this agent.

Besides the growing significance of *S. aureus* as pathogen of nosocomial infections, its resistance against a number of antibiotics has become increasingly worse. Methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) is not only resistant against all beta-lactam antibiotics but is also often multi-resistant against several classes of antibiotics, thus limiting the treatment options. MRSA infections involve the skin or deeper areas of the body in the form of, as wound infections or sepsis. The disease causing properties of MRSA are not differentiated from those of antibiotic sensitive staphylococci.

Methicillin resistance in *Staphylococcus* spp. is due to the acquisition of an altered penicillin-binding protein PBP2a (PBP2'), encoded by the *mecA* gene. The *mecA* gene is carried on large staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) mobile elements, which are found in both MRSA and MRCoNS isolates. Eight different SCC*mec* types (I–VIII) have been recognized, which vary in size from 21 to 67 kb, and have different sets of *ccr* recombinase genes. The SCC*mec* element type XI contains a new *mecA* homologue (*mecC*). This gene exhibits only a 70% nucleotide homology with *mecA* and is not detectable by usual *mecA*-specific OCRs and PBP2a agglutinations tests.

S. aureus and MRSA are spread from fomite to person and from person to person yet few environmental reservoirs outside the healthcare setting and closed communities. MRSA is a growing problem in shared facilities such as hospitals, healthcare facilities and nursing homes. Studies indicate that the incidence of MRSA in the past few years has extensively increased worldwide. However, there are considerable differences between various



countries. Whereas in the USA, Japan and southern European countries a high prevalence of MRSA between 20 and 60% exists, the prevalence in the Netherlands and Scandinavian countries is less than three percent.

Along with non-critical antibiotic use, the insufficient implementation of prophylactic hygiene measures and inadequate staff training are the reasons for the significant increase in MRSA colonisation. Insufficient MRSA management thus leads to the continued spread of MRSA in our hospitals. Urgently needed measures in this case are the introduction of standard hygiene and adequate outbreak management, as well as control of antibiotic use. In particular, the introduction of MRSA screening based on rapid and reliable diagnosis during or even better before inpatient admission of patients is indispensable.

Methicillin resistant strains of *S. aureus* (MRSA) are implicated in serious infections and nosocomial outbreaks, and show resistance to a wide range of antibiotics, thus limiting the treatment options. Therefore, rapid detection is clinically crucial for both treatment and infection control measures.

The adoption of molecular techniques has allowed for more rapid detection and identification of MRSA in clinical samples. Thus, it provides the critical information for determining appropriate therapies for patients with suspected MRSA infections and controlling of the outbreak.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of MRSA, MSSA and Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci (MRCoNS) in isolated colonies. After DNA isolation, the identification of MRSA, MSSA and MRCoNS is performed by the amplification of SA442 (if present)/CoA genes, SCCmec-orfX junction and *mecA/mecC* genes.

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bounded to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence can be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Each kit includes two kind of strips and each one corresponds to one different assay. The first strip contains the multiplex reaction mix for the detection of *Staphylococcus aureus* and *mecA/mecC* genes (MRSA 1: SAU + MEC A/C 4/8-well strips). SA442/CoA genes (*S. aureus*) are amplified and detected in FAM channel, *mecA/mecC* are amplified and detected in ROX channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2). The second strip contains the multiplex reaction mix for the detection of SCCmec-orfX junction (MRSA 2: ORFX 4/8-well strips). SCCmec-orfX junction is amplified and detected in FAM channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).



4. Reagents provided

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables 1 and 2. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table 1 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices (See Annex 1). Table 2 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
MRSA 1: SAU + MEC A/C 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	3/6 x 8-well strip
MRSA 2: ORFX 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	3/6 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 x 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MSA106L, VS-MSA106H, VS-MSA112L and VS-MSA112H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
MRSA 1: SAU + MEC A/C 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	Transparent	9 x 4-well strip
MRSA 2: ORFX 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers in stabilized format	Transparent	9 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	18 x 4-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MSA136. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.



- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips (if available).
- Vortexer.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with and Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments).

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System and VIASURE 96 Real Time PCR System. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

To check thermocycler compatibility, see Annex 1, to check most common detection channels see Annex 2 and to check optical measurement exposure setting see Annex 3.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- The product is indented for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- Do not use past expiration date.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (if available, Ref. VS-MSA136). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different envelopes and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.



- For reference VS-MSA136 (compatible with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Make sure to use a well for the detection of MRSA 1: SAU + MEC A/C and another well for MRSA 2: ORFX assay. Be careful not to mix them throughout the process.
- Consult safety data sheets, upon request.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.
- *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). When this VIASURE assay is conducted, special care must be taken to avoid potential contamination of samples and reagents by the operator.

8. Test procedure

8.1. DNA extraction

For DNA extraction from isolated colonies from human nasal, pharyngeal and perianal swabs plated onto chromogenic solid medium samples you can use your manual or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. We have validated the following extraction kits:

- Maxwell®RSC Blood DNA Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).

8.2. Lyophilized positive control

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.



8.3. PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA extracted from each sample, reconstituted *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene® kits).

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

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

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*S. aureus* (SA442/CoA genes) and SCCmec-orfX junction), ROX (*mecA/mecC* genes) and HEX, JOE or VIC channels (IC). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* in the positive control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions. Interpretation of results:



<i>S. aureus</i> (SA442/CoA genes) (FAM, strip 1)	<i>mecA/mecC</i> genes (ROX, strip 1)	SCC <i>mec-orfX</i> junction (FAM, strip 2)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	MRSA*
+	+	-	+/-	-	+	MSSA** and MRCoNS***
+	-	+	+/-	-	+	MSSA**
+	-	-	+/-	-	+	MSSA**
-	+	-	+/-	-	+	MRCoNS*** (methicillin/oxacillin resistance different from <i>S. aureus</i>)
-	-	-	+	-	+	Negative
-	-	-	-	-	+	Invalid

Table 4. Sample interpretation

+: Amplification curve

-: No amplification curve

*MRSA. Methicillin-resistant *S. aureus*.

** MSSA. Methicillin-sensitive *S. aureus*.

*** MRCoNS. Methicillin-resistant Coagulase-negative *Staphylococci*.

A sample is considered positive if the **Ct value obtained is less than 35** and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. (MRSA 1: SAU + MEC A/C).

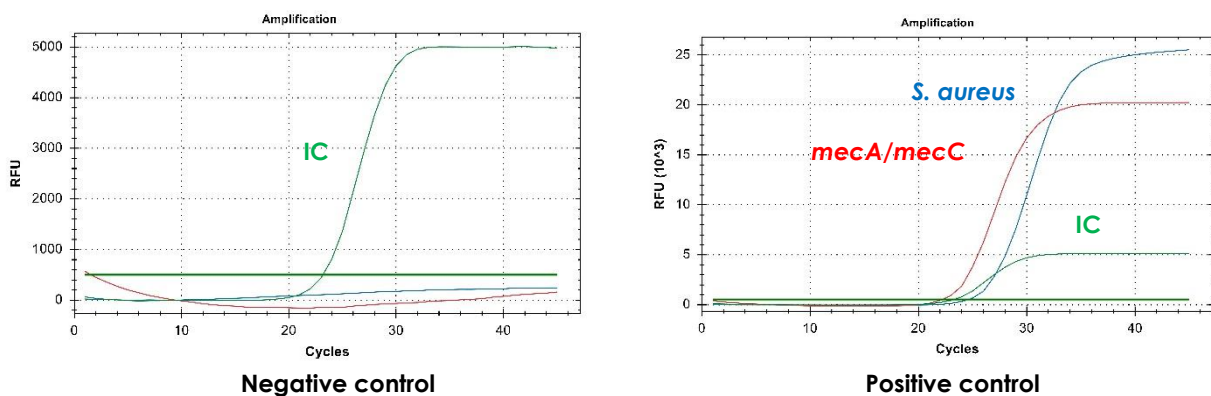
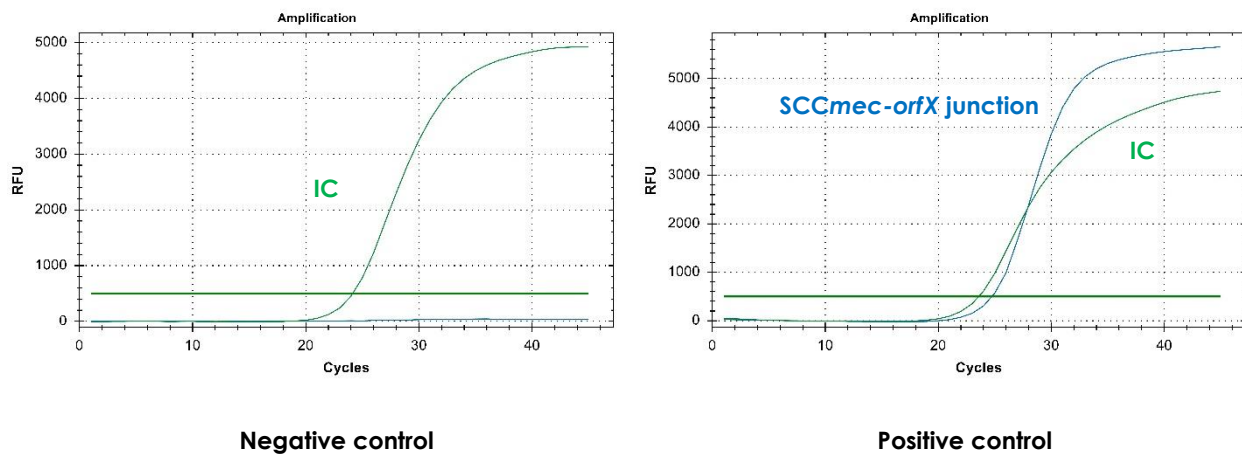


Figure 2. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. (MRSA 2: ORFX).



The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

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

In case of a doubtful interpretation result, it is recommended to verify the correct performance of each of the steps and review the parameters and the sigmoid shape of the curve. If the situation is not solved, it is recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated only with DNA extracted from isolated colonies from human nasal, pharyngeal and perianal swabs plated onto chromogenic solid medium samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- 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 by *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control, either 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 detection of new or unknown MRSA variants resulting in a false negative result with the VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.



- A VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit positive result does not necessarily indicate eradication treatment failure since DNA may persist. A negative result following a previously positive test result may indicate eradication treatment success or may occur due to intermittent colonization.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. However, a positive result is indicative for the presence of MRSA DNA since the VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit detects the *SCCmec/orfX* junction, specific *S. aureus* sequences located within the *SA442* and *CoA* genes and the *mecA* and *mecC* genes.

11. Quality control

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit was evaluated using 105 MRSA positive samples by conventional microbiological culture. Briefly, nasal/pharyngeal and perineum specimens with clinical suspicion of MRSA colonization were seed on *S. aureus* MRSA agar medium (oxid) and incubated in aerobic conditions at 37°C for 18-24 hours. Colonies were selected and boiled samples were prepared and analysed with VIASURE detection kit. 103/105 samples were MRSA-positive according to both detection methods. 2/105 were detected as positive for MSSA (positives for *S. aureus* and *SCCmec-orfX*), 1/105 positive sample for methicillin/oxacillin resistance different from *S. aureus* (positive for *mecA/mecC*), 3/ 105 positive samples for MSSA and MRCoNS (positives for *S. aureus* and *mecA/mecC*, but negatives for *SCCmec-orfX*).

In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and/or methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* using VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 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 *SCCmec-orfX* junction (Figure 3, 4 and 5).



Figure 3. Dilution series of *S. aureus* (SA442/CoA genes) (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix MRSA 1: SAU + MEC A/C, channel FAM).

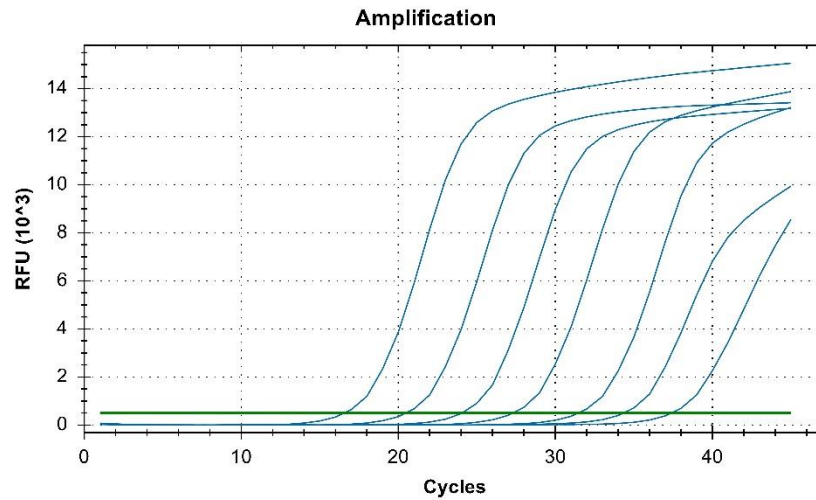


Figure 4. Dilution series of *mecA/mecC* genes (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix MRSA 1: SAU + MEC A/C, channel ROX).

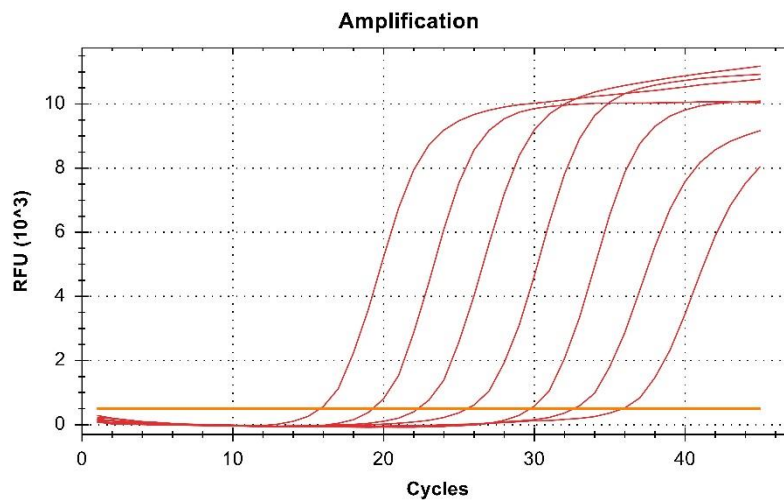
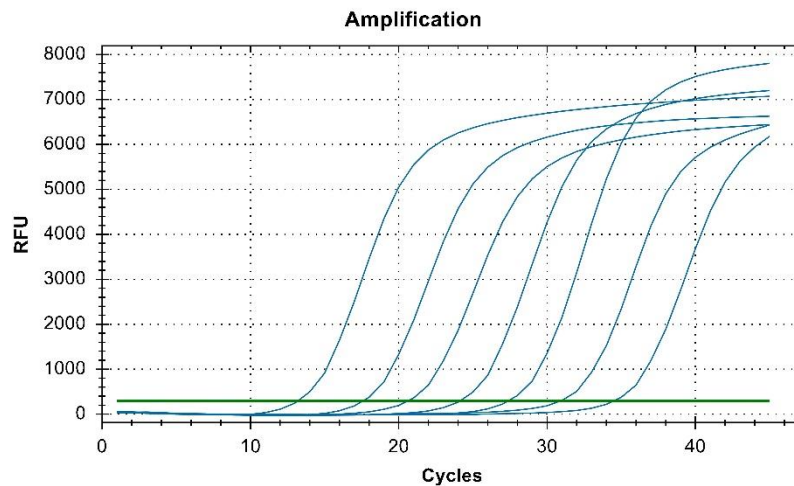


Figure 6. Dilution series of SCCmec-*orfX* junction (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix MRSA 2: ORFX, channel FAM).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* assay was confirmed by testing a panel consisting of different antimicrobial resistant organism. No cross-reactivity was detected between almost any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay.

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

Table 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 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 reactivity of VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit for **MSSA + MR-CoNS** was evaluated against a mixture of: *S. aureus* + *S. epidermidis* (oxa^R, PVL-pos); and MSSA ATCC 29213 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach) + MRCoNS 634 (*Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci* 634), showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit for **MR-CoNS** was evaluated against MRCoNS 634 (*Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci* 634), showing positive results.



The reactivity of VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit **for MSSA** was evaluated against MSSA (spa type t177), showing positive results.



ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a low profile block, like the systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a high or regular profile block, like the systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Select Ramp Speed "Standard".

(2) See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.

(3) The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into the specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.

(4) Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.

(5) No detection in Cy5 channel.

(6) Detection in FAM and HEX channels only.

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.



ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

The fluorescence detection channels for some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, in the Settings menu, select the option Apply Fluorescence Drift Correction for Baseline Settings to correct it.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none. Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, please modify the baseline: Select the Start Cycle and End Cycle values so that the baseline ends before significant fluorescence is detected.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the appropriate 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	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.



ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -500*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

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



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica 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 a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianales humanos en medio sólido cromogénico. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por MRSA en combinación con los signos y síntomas clínicos del paciente y los factores de riesgo epidemiológico. El DNA es extraído a partir de las colonias, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para la identificación de *Staphylococcus aureus* y la determinación de la resistencia a la meticilina.

2. Introducción y explicación

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es quizás el patógeno humano más preocupante debido a su virulencia intrínseca, a su capacidad para causar una gran variedad de infecciones potencialmente mortales y a su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Hoy en día, este organismo es la principal causa global de infecciones asociadas a la atención de la salud en todo el mundo y, a medida que se trata a más pacientes fuera del ámbito hospitalario, es una preocupación creciente en la comunidad. Existen muchos medicamentos antiestafilocócicos, que incluyen meticilina, tetraciclinas, fluoroquinolonas, linezolid y daptomicina, pero pierden rápidamente su valor terapéutico debido a la capacidad de la bacteria para desarrollar mecanismos efectivos para enfrentar este agente.

Además de la creciente importancia de *S. aureus* como patógeno de las infecciones nosocomiales, su resistencia contra varios antibióticos ha empeorado cada vez más. Las cepas de *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistentes a la meticilina no solo son resistentes contra todos los antibióticos beta-lactámicos, sino que también suelen ser multiresistentes contra varias clases de antibióticos, lo que limita las opciones de tratamiento. Las infecciones por MRSA involucran la piel o áreas más profundas del cuerpo en forma de infecciones de la herida o sepsis. Las propiedades causantes de la enfermedad del MRSA no se diferencian de las de los estafilococos sensibles a los antibióticos.

Resistencia a la meticilina en *Staphylococcus* spp. se debe a la adquisición de una proteína de unión a penicilina alterada PBP2a (PBP2'), codificada por el gen *mecA*. El gen *mecA* se transporta en elementos móviles del cromosoma *mec* (SCCmec) estafilocócico de casete grande, que se encuentran en los aislamientos de MRSA y MRCoNS. Se han reconocido ocho tipos diferentes de SCCmec (I-VIII), que varían en tamaño de 21 a 67 kb, y tienen diferentes conjuntos de genes de recombinasa *ccr*. El tipo de elemento SCCmec XI contiene un nuevo homólogo de *mecA* (*mecC*). Este gen muestra solo un 70% de homología de nucleótidos con *mecA* y no es detectable por las pruebas de OCRs específicas de *mecA* y de aglutinación de PBP2a.

S. aureus y MRSA se propagan de vector a persona y de persona a persona, pero existen pocas reservas ambientales fuera del ámbito de la atención médica y las comunidades cerradas. El MRSA es un problema



creciente en instalaciones compartidas como hospitales, centros de salud y hogares de ancianos. Los estudios indican que la incidencia de MRSA en los últimos años ha aumentado considerablemente en todo el mundo. Sin embargo, hay diferencias considerables entre varios países. Mientras que en los Estados Unidos, Japón y los países del sur de Europa existe una alta prevalencia de MRSA entre 20 y 60%, la prevalencia en los países holandeses y escandinavos es inferior al tres por ciento.

Junto con el uso de antibióticos no críticos, la implementación insuficiente de medidas de higiene profiláctica y la capacitación inadecuada del personal son las razones del aumento significativo en la colonización por MRSA. La gestión insuficiente de MRSA conduce a la continua propagación de MRSA en nuestros hospitales. Las medidas urgentemente necesarias en este caso son la introducción de la higiene estándar y el manejo adecuado de brotes, así como el control del uso de antibióticos. En particular, es indispensable la introducción del examen de MRSA basado en un diagnóstico rápido y confiable durante o incluso mejor antes del ingreso hospitalario de pacientes.

Las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) están implicadas en infecciones graves y brotes nosocomiales, y muestran resistencia a una amplia gama de antibióticos, lo que limita las opciones de tratamiento. Por lo tanto, la detección rápida es clínicamente crucial tanto para el tratamiento como para las medidas de control de infecciones.

La adopción de técnicas moleculares ha permitido una detección e identificación más rápida de MRSA en muestras clínicas. Por lo tanto, proporciona la información crítica para determinar las terapias adecuadas para los pacientes con sospecha de infecciones por MRSA y controlar el brote.

3. Procedimiento

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de MRSA, MSSA y *Staphylococci* coagulasa negativa resistente a meticilina (MRCoNS) en colonias aisladas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de MRSA, MSSA y MRCoNS se lleva a cabo mediante la amplificación de los genes SA442 (si está presente) / CoA, SCCmec-orfX junction y los genes *mecA* / *mecC*.

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. 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 *Staphylococcus aureus* y los genes *mecA*/*mecC* (MRSA 1: SAU + MEC A/C 4/8-well strips). Los genes SA442/CoA (*S. aureus*) se amplifican y detectan en el canal FAM, los genes *mecA*/*mecC* se amplifican y detectan en el canal ROX y el control interno (IC) en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado, seleccione el adecuado) canal de detección, ver



Anexo 2). La segunda tira contiene la mezcla de reacción múltiple para la detección de la unión SCCmec-orfX (MRSA 2: tiras ORFX de 4/8 pocillos). SCCmec-orfX junction se amplifica y se detecta en el canal FAM y el control interno (IC) en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado, consulte el Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
MRSA 1: SAU + MEC A/C 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
MRSA 2: ORFX 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MSA106L, VS-MSA106H, VS-MSA112L y VS-MSA112H.



Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
MRSA 1: SAU + MEC A/C 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Transparente	9 tiras de 4 pocillos
MRSA 2: ORFX 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	9 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	18 tiras de 4 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MSA136. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 mL (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.



6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-MSA136). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para referencia VS-MSA136 (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, 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 usar un pocillo para la detección de MRSA 1: SAU + MEC A/C y otro para el ensayo de MRSA 2: ORFX. Tener precaución para que no se mezclen durante el proceso.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.
- *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). Cuando se lleve a cabo el test VIASURE, se debe tener especial cuidado para evitar la posible contaminación de muestras y reactivos por parte del operador.

8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA a partir de colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianal humanos en medio sólido cromogénico puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.



Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) en diferentes pocillos y cerrar los pocillos con los tapones suministrados.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

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

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*S. aureus* (genes *SA442/CoA*) y *SCCmec-orfX* junction), ROX (genes *mecA/mecC*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). 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. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Interpretación de los resultados:



<i>S. aureus</i> (genes SA442/CoA) (FAM, strip 1)	Genes <i>mecA/mecC</i> (ROX, strip 1)	SCC <i>mec-orfX</i> junction (FAM, strip 2)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	MRSA*
+	+	-	+/-	-	+	MSSA** y MRCoNS***
+	-	+	+/-	-	+	MSSA**
+	-	-	+/-	-	+	MSSA**
-	+	-	+/-	-	+	MRCoNS*** (Resistencia meticilina/oxacilina diferente de <i>S. aureus</i>)
-	-	-	+	-	+	Negativo
-	-	-	-	-	+	Inválido

Tabla 4. Interpretación

+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

*MRSA. *S. aureus* resistente a la meticilina.

** MSSA. *S. aureus* sensible a la meticilina.

*** MRCoNS. *Staphylococci coagulasa negativa* resistente a meticilina.

Una muestra se considera positiva, si el **valor Ct obtenido es menor de 35** y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. 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.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (MRSA 1: SAU + MEC A/C).

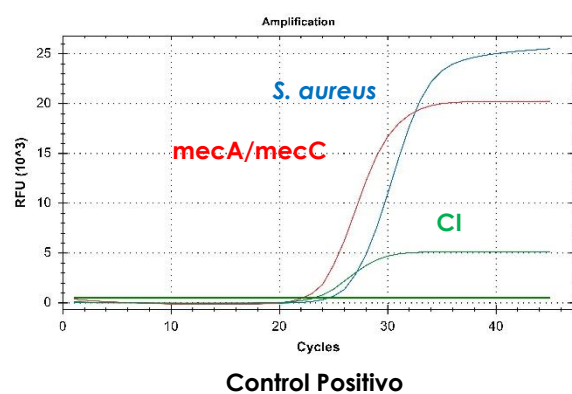
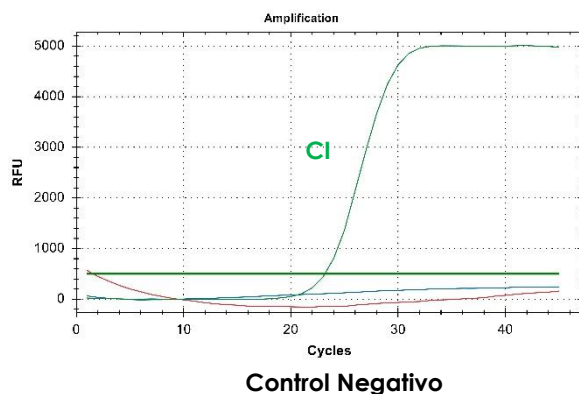
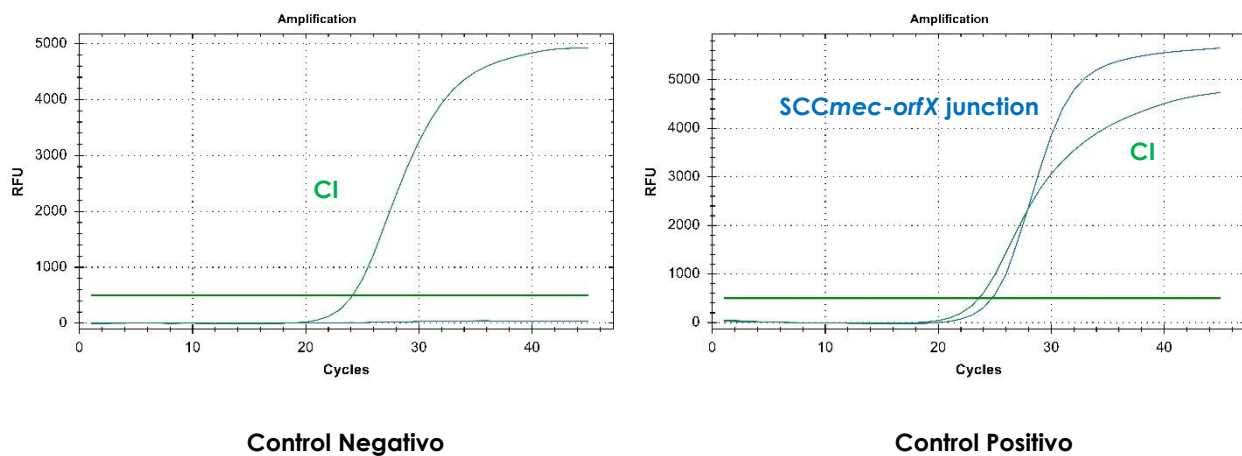


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (MRSA 2: ORFX).



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de 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.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de colonias aisladas a partir de la siembra de hisopos nasales, faríngeos y perianal humanos en medio sólido cromogénico.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Positive Control ya sea 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, lo que da como resultado un falso negativo con VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.



- Un resultado positivo con el test VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 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, ya que el test VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit detecta la región SCCmec/orfX junction, y secuencias específicas de *S. aureus* localizadas en los genes SA442 and CoA, y los genes mecA y mecC.

11. Control de calidad

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit se evaluó utilizando 105 muestras positivas de MRSA mediante cultivo microbiológico convencional. En resumen, las muestras nasales / faríngeas y perineales con sospecha clínica de colonización por MRSA se sembraron en medio de agar MRSA de *S. aureus* (oxoide) y se incubaron en condiciones aeróbicas a 37°C durante 18-24 horas. Se seleccionaron las colonias y se prepararon muestras hervidas, y se analizaron con el kit de detección VIASURE. 103/105 muestras fueron positivas para MRSA de acuerdo con ambos métodos de detección. 2/105 se detectaron como positivos para MSSA (positivos para *S. aureus* y SCCmec-orfX), 1/105 muestra positiva para resistencia a meticilina / oxacilina diferente de *S. aureus* (positiva para mecA / mecC), 3/105 muestras positivas para MSSA y MRCoNS (positivos para *S. aureus* y mecA / mecC, pero negativos para SCCmec-orfX).

En conclusión, los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA) y / o estafilococos coagulasa negativos resistentes a meticilina utilizando VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 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. (Figura 3, 4 y 5).



Figura 3. Diluciones seriadas de *S. aureus* (genes SA442/CoA) (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 1: SAU + MEC A/C, canal FAM).

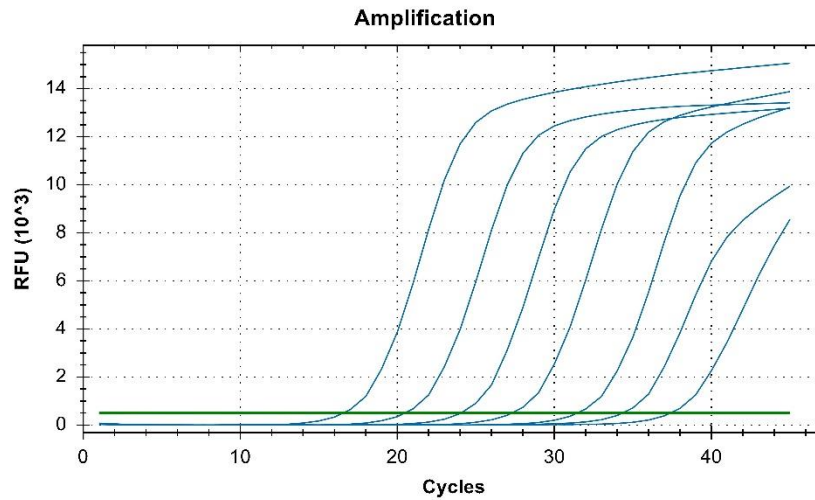


Figura 4. Diluciones seriadas de los genes *mecA/mecC* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 1: SAU + MEC A/C, canal ROX).

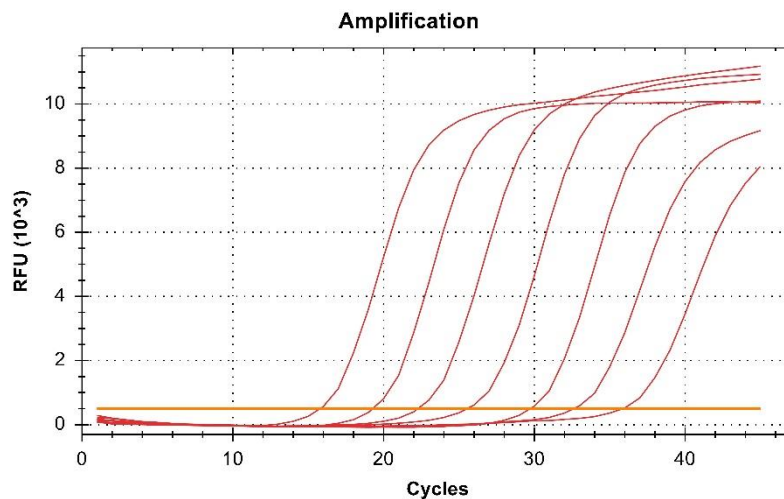
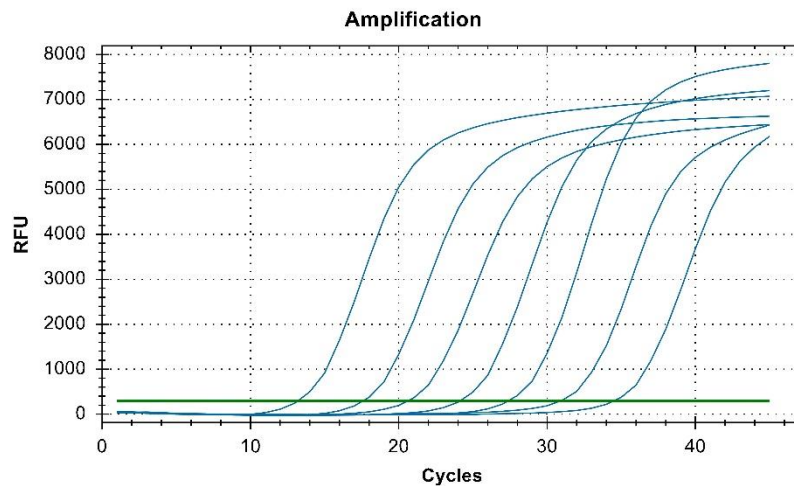


Figura 5. Diluciones seriadas de SCCmec-*orfX* junction (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción MRSA 2: ORFX, canal FAM).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

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

Tabla 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit 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 un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MSSA + MR-CoNS** 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 un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MR-CoNS** se evaluó frente a MRCoNS 634 (Meticillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* 634), mostrando un resultado positivo.



La reactividad de VIASURE *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Real Time PCR Detection Kit para **MSSA** se evaluó frente a MSSA (spa type t177), mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. A. Pournajaf *et al.* PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their antibiotic resistance profiles. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2014. 4(Suppl 1): S293–S297.
2. OO. Soge *et al.* Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from US West Coast public marine beaches. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009. 64(6):1148-55.
3. R.H. Nijhuis *et al.* A rapid and high-throughput screening approach for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on the combination of two different real-time PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52(8): 2861-2867
4. H.Y. Wang *et al.* Multiplex real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant staphylococci directly from positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52(6): 1911-1920.
5. C. Seidel *et al.* Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) for reliable, simple and rapid detection of the methicillin resistance genes *mecA* and *mecC*. *Veterinary Microbiology* 2017; 200: 101-106.
6. J.U. Kim *et al.* Multiplex real-time PCR assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains suitable in regions of high MRSA endemicity. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(3): 1008-1013.
7. N.S. Sabet *et al.* Simultaneous species identification and detection of methicillin resistance in staphylococci using triplex real-time PCR assay. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2006; 56(1): 13-18.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

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



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

(2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.

(3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

(4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.



ANEXO 2

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 Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo de la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), 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	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: September 2019









CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC