



AccuProbe®

STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST
(bioMérieux ref. 39203 / Gen-Probe Cat. No. 102875/2875)

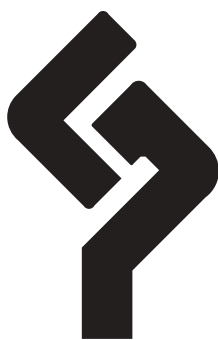
STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTEST
(bioMérieux Best.Nr. 39203 / Gen-Probe Kat. Nr. 102875/2875)

**TEST D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS
AUREUS ISOLE D'UNE CULTURE**
(bioMérieux réf. 39203 / Gen-Probe Cat.No. 102875/2875)

**TEST DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS
DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS**
(bioMérieux ref. 39203 / Gen-Probe Cat. No. 102875/2875)

**TEST D'IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS
AUREUS ISOLATO DA UNA CULTURA**
(bioMérieux cod . 39203 / Gen-Probe Cat. No. 102875/2875)

**STAPHYLOCOCCUS AUREUS
TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA**
(bioMérieux ref. 39203 / Gen-Probe Cat.No. 102875/2875)





STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST FOR EXPORT USE ONLY

(bioMérieux ref. 39203 / Gen-Probe Cat. No. 102875/2875)

INTENDED USE

The ACCUPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST is a rapid DNA probe test which utilizes the technique of nucleic acid hybridization for the identification of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) isolated from culture.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is the causative agent of a wide variety of infections in humans including diseases of the skin and soft tissues. Skin pustules, impetigo as well as more serious infections such as bacteremia, osteomyelitis, renal abscess, pneumonia, endocarditis, meningitis, gastroenteritis and toxic shock syndrome are among these diseases (3). *S. aureus* continues to be a prominent agent of nosocomial infections. Methicillin-resistant strains (MRSA) have emerged as a major epidemiological problem in hospitals throughout the United States.

Within the genus *Staphylococcus*, *S. aureus* is the most clinically significant species due to the incidence and severity of the infections it can cause (6).

Current methods used to identify *S. aureus* include Gram stain morphology, cell morphology, production of catalase, coagulase production, pigment production, susceptibility to lysostaphin and lysozyme, and anaerobic production of acid from glucose (4). In addition, there are several commercially available systems that allow strains to be biochemically characterized.

Among *Staphylococcus* species associated with human infections, *S. aureus* is unique in its ability to clot plasma (coagulase). It should be noted that some *Staphylococcus* species found in animals, such as *S. intermedius* and *S. hyicus* may also share this property. Two different coagulase tests are commonly used to identify *S. aureus*. One is a tube test for free coagulase and the other is a slide test for bound coagulase. The tube coagulase test is thought to be the more definitive of the two, however, it can take several hours to overnight to produce a result. The slide coagulase test may yield a negative result for up to 10 to 15 percent of *S. aureus* strains (2).

Because of the existence of problem clinical isolates that may not be identified using current methods and because of the coagulase-positive strains associated with animals, an alternative rapid and accurate identification method is needed. In clinical studies ACCUPROBE STAPHYLOCOCCUS

AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST detected all of the known methicillin-resistant *S. aureus* strains that were tested.

The ACCUPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST offers a rapid, objective method for the definitive identification of *S. aureus* based on the detection of specific ribosomal RNA sequences that are unique to *S. aureus*.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Nucleic acid hybridization tests are based on the ability of complementary nucleic acid strands to specifically align and associate to form stable double-stranded complexes (5). The ACCUPROBE SYSTEM uses a single-stranded DNA probe with a chemiluminescent label that is complementary to the ribosomal RNA of the target organism. After the ribosomal RNA is released from the organism, the labeled DNA probe combines with the target organism's ribosomal RNA to form a stable DNA:RNA hybrid. The Selection Reagent allows for the differentiation of non-hybridized and hybridized probe. The labeled DNA:RNA hybrids are measured in the GEN-PROBE luminometer. A positive result is a luminometer reading equal to or greater than the cut-off. A value below this cut-off is a negative result.

REAGENTS

Reagents for the ACCUPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST are provided in three separate reagent kits:

ACCUPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS PROBE KIT

Probe Reagent (P) (4 x 5 tubes)
Staphylococcus aureus

ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT

Reagent 1 (Lysis Reagent) (1) 1 x 10 mL
buffered solution containing 0.04% sodium azide

Reagent 2 (Hybridization Buffer) (2) 1 x 10 mL
buffered solution

Reagent 3 (Selection Reagent) (3) 1 x 60 mL
buffered solution

GEN-PROBE DETECTION REAGENT KIT

Detection Reagent I (RI) 1 x 240 mL
0.1% hydrogen peroxide in 0.001 N nitric acid

Detection Reagent II (RII) 1 x 240 mL
1 N sodium hydroxide

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- A. For *in vitro* diagnostic use.
- B. Use universal precautions when performing this assay (1).
- C. Use only for the identification of *S. aureus* isolated from culture.
- D. Use only supplied or specified disposable laboratory ware.
- E. Reagents in this kit contain sodium azide which may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. Upon disposal of these reagents, always dilute the material with a large volume of water to prevent azide buildup in the plumbing.
- F. Avoid contact of Detection Reagents I and II with skin, eyes and mucous membranes. Wash with water if these reagents come into contact with skin. If spills of these reagents occur, dilute with water before wiping dry.

STORAGE AND HANDLING REQUIREMENTS

Probe Reagent Tubes must be stored in the foil pouches at 2° to 8°C. The Probe Reagent Tubes are stable in the unopened pouches until the expiration date indicated. Once opened, the pouch should be resealed and the tubes should be used within two months and prior to the expiration date.

Other reagents used in the ACCU_{PROBE} STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST may be stored between 2° to 25°C and are stable until the expiration date indicated.

DO NOT FREEZE THE REAGENTS.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

The ACCU_{PROBE} STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST is designed to determine the identity of *S. aureus* isolated from culture.

- A. **Solid Media Method.** Growth from appropriate solid media, with morphology suggestive of staphylococci may be tested. The culture should be less than 48 hours old. It can be tested as soon as the growth is visible.
 - 1. Growth can be removed with a 1 µL disposable plastic loop, a wire loop, a disposable plastic needle, or an applicator stick. Swabs should not be used due to the small volume of liquid in which the cells are subsequently resuspended.
 - 2. If a single colony is to be tested, it should be at least 1 mm in diameter. A 1 µL loopful of cells or several (3 - 4) smaller colonies can be tested.
 - 3. Avoid taking any of the solid media with the cells.
 - 4. The operator may elect to inoculate another culture plate at this time to confirm the purity of the isolate.
- B. **Broth Culture Method.** Appropriate broth cultures, such as Trypticase Soy or Brain Heart Infusion with turbidity equivalent to or greater than a McFarland 1 Nephelometer Standard may

be tested. Broth cultures, incubated for up to 72 hours at 37°C may be used. Pipette a 50 µL sample from the well mixed broth suspension into the Probe Reagent Tubes, as described below.

MATERIALS PROVIDED

The ACCU_{PROBE} STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST
bioMérieux ref. 39203 / Gen-Probe Cat. No. 102875/2875

20 Tests

Probe Reagent (P) 4 x 5 tubes

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1 µL plastic sterile inoculating loops, wire loops, plastic needles,
or applicator sticks for selecting colonies.

Control culture strains

Incubator or water bath (35° to 37°C)

Water bath or dry heat bath* (60° ± 1°C)

Micropipettes (50 µL, 300 µL)

Re-pipettor (50 µL, 300 µL)

Vortex mixer

*Heating blocks in the dry heat bath should have wells that are correctly sized for 12 x 75 mm tubes. The use of GEN-PROBE dry heat baths is recommended.

AVAILABLE FROM YOUR GEN-PROBE DISTRIBUTOR

GEN-PROBE LEADER 50i Luminometer
(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)

ACCU_{PROBE} CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT
(bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)

GEN-PROBE DETECTION REAGENT KIT
(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791/1791)

Dry Heat Bath (60° ± 1°C)
(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)

TEST PROCEDURE

A. EQUIPMENT PREPARATION

1. Adjust the incubator or water bath to 35° to 37°C.
2. Adjust the water bath or heating block to 60° ± 1°C.
3. Prepare the GEN-PROBE luminometer for operation. Make sure there is sufficient vol-

ume of Detection Reagents I and II to complete the tests.

B. CONTROLS

Positive and negative control strains should be tested routinely in each laboratory according to local regulations. A culture of *S. aureus* (e.g., American Type Culture Collection, ATCC #12600) may be used as the positive control while a culture of *Staphylococcus epidermidis* (e.g., ATCC, #14990) may be used as the negative control.

C. SAMPLE PREPARATION

1. Open the foil pouch by cutting evenly across the top of the pouch. Remove enough Probe Reagent Tubes to test the culture isolates and/or controls. Reseal the pouch by folding the opened edge over several times and securing with adhesive tape or a clip. **Leave the desiccant pillow in the pouch.**
2. Label a sufficient number of Probe Reagent Tubes to test the culture isolates and/or controls. Remove and retain the caps.
3. Pipette 50 μL of Reagent 1 (Lysis Reagent) into all Probe Reagent Tubes. If broth cultures are to be tested, do not add Reagent 1 to the Probe Reagent Tubes.
4. Transfer the sample from the solid media or 50 μL of a well-mixed broth culture into the labeled Probe Reagent Tubes as described in the SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION Section. Twirl the loop, needle or stick in Reagent 1 (Lysis Reagent) to remove the cells if testing growth from solid media and mix thoroughly.
5. Recap the Probe Reagent Tubes and incubate at 35° to 37°C for 5 minutes in a water bath or 10 minutes at 35° to 37°C in an incubator.

D. HYBRIDIZATION

1. Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or incubator. Remove and retain the caps. Pipette 50 μL of Reagent 2 (Hybridization Buffer) into all Probe Reagent Tubes.
2. Recap the Probe Reagent Tubes and incubate for 15 minutes at 60° \pm 1°C in a water bath or heating block.

E. SELECTION

1. Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or heating block. Remove and retain the caps. Pipette 300 μL of Reagent 3 (Selection Reagent) into each tube. Recap the tubes and VORTEX them to mix completely.
2. Incubate the Probe Reagent Tubes for 5 minutes at 60° \pm 1° C in a water bath or heating block.
3. Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or heating block and leave them at room temperature for at least 5 minutes. Remove and discard the caps. **Read the results in the luminometer within 1 hour after removing from the water bath or heating block.**

F. DETECTION

1. Select the appropriate protocol from the menu of the luminometer software.
2. Using a damp tissue or paper towel, wipe each tube to ensure that no residue is present on the outside of the tube and insert the tube into the luminometer according to the instrument directions.
3. When the analysis is complete, remove the tube(s) from the luminometer.

PROCEDURAL NOTES

- A. REAGENTS: Reagent 2 (Hybridization Buffer) may precipitate. Warming and mixing the solution at 35° to 60°C will dissolve the precipitate.
- B. TEMPERATURE: The Sample Preparation, Hybridization and Selection reactions are temperature dependent. Therefore, it is imperative that the incubator, water bath or heat block is maintained within the specified temperature range.
- C. TIME:
 1. The Hybridization Reaction should be started within 1 hour of adding the cells and Reagent 1 to the Probe Reagent Tubes.
 2. The Hybridization and Selection reactions are time dependent. Hybridize at least 15 minutes but no more than 20 minutes. Incubate the Probe Reagent Tubes during the SELECTION Step for at least 5 minutes but no more than 6 minutes.
- D. WATER BATH: The level of water in the water bath should be maintained to ensure that the entire liquid reaction volume in the Probe Reagent Tubes is submerged.
- E. VORTEXING: It is critical to have a homogeneous mixture during the SELECTION Step, specifically after the addition of Reagent 3.
- F. TROUBLE-SHOOTING
 1. Elevated negative control values (*S. epidermidis*, ATCC #14990) greater than 20,000 RLU (Relative Light Units) in the LEADER or 600 PLU (Photometric Light Units) in the AccuLDR (formerly PAL) can be caused by insufficient mixing after adding Reagent 3 (Selection Reagent) or by testing mixed cultures. Because mixed cultures can occur, a portion of the growth may be streaked onto the appropriate agar medium and incubated to check for multiple colony types.
 2. Low positive control values (*S. aureus*, ATCC #12600) less than 50,000 RLU or 1,500 PLU in the AccuLDR (formerly PAL) can be caused by insufficient cell numbers or by testing mixed or aged cultures. Because mixed cultures can occur, a portion of the growth may be streaked onto the appropriate agar medium and incubated to check for multiple colony types.

RESULTS

A. INTERPRETATION OF RESULTS

The results of the AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST are based on the following cut-off values. Samples producing signals greater than or equal to these cut-off values are considered positive. Signals less than these cut-off values are considered negative. Results in repeat ranges should be repeated.

	AccuLDR (formerly PAL)	LEADER
Cut-off value	1,500 PLU	50,000 RLU
Repeat range	1,200-1,499 PLU	40,000-49,999 RLU

B. QUALITY CONTROL AND ACCEPTABILITY OF RESULTS

Negative control (e.g., *S. epidermidis*, ATCC #14990) and positive control (e.g., *S. aureus*, ATCC #12600) should satisfy the following values:

	AccuLDR (formerly PAL)	LEADER
Negative control	< 600 PLU	< 20,000 RLU
Positive control	> 1,500 PLU	> 50,000 RLU

LIMITATIONS

This method has been tested using fresh growth from solid media and from broth listed in the SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION Section. The efficacy of this test has not been demonstrated on direct clinical specimens.

Results from the AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data available to the clinician.

EXPECTED VALUES

The AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST was compared to standard culture biochemical identification methods at two sites using a total of 641 clinical isolates. Of these, 309 were *S. aureus* isolates, 40 of the 309 *S. aureus* isolates were known Methicillin-resistant strains, 156 were isolates representing 12 *Staphylococcus* species, 176 were other microbial isolates representing 25 genera.

Five strains of coagulase-positive *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus intermedius* were evaluated. None of these isolates produced a positive reaction with the AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST.

Standard identification methods included Gram stain morphology, colony morphology, slide coagulase, tube coagulase test and Staphaurex (Wellcome Diagnostics) at Site 2 only. The isolates were categorized as either positive ($\geq 50,000$ RLU) or negative ($\leq 50,000$ RLU). The range of observations for negative cultures was 243 to 32,022 RLU and 138,228 to 821,826 for positive cultures. A comparison of the AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST and standard culture identification methods is shown below.

AccuPROBE / CULTURE IDENTIFICATION

AccuPROBE CULTURE	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	SENSITIVITY/ SPECIFICITY	PERCENT AGREEMENT
SITE 1	202	0	0	221	100%/100%	100%

AccuPROBE / LATEX AGGLUTINATION IDENTIFICATION

AccuPROBE LAT. AGG.	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	SENSITIVITY/ SPECIFICITY	PERCENT AGREEMENT
SITE 2	107	0	1*	110	99%/100%	99.5%
SITE 2	107	0	0	111	100%/100%	100%

After
Discrepant
Analysis

*Site 2 used Staphaurex (Wellcome Diagnostics) for their original identification of *S. aureus*. One apparent false negative isolate was reidentified as "not" *S. aureus* using the tube coagulase test, which gave a negative result.

AccuPROBE / REFERENCE IDENTIFICATION

AccuPROBE Ref. I.D.	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivity/ Specificity	Percent Agreement
Total (of Site 1 & Site 2)	309	0	0	332	100%/100%	100%

This is the total sensitivity, specificity and percent agreement from Site 1 and Site 2 after reidentification of one culture isolate, using the tube coagulase test.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A. WITHIN-RUN PRECISION

The within-run precision of the AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST was calculated by assaying two concentrations of *S. aureus* ribosomal RNA using 10 replicates in a single assay.

Sample	A	B
Number of Replicates	10	10
Mean Response	103,813	71,408
Standard Deviation	4,562	2,703
Coefficient of Variation	4.4%	3.8%

B. BETWEEN-RUN PRECISION

The between-run precision was calculated by assaying the same two concentrations of *S. aureus* ribosomal RNA using single determinations in 12 consecutive runs.

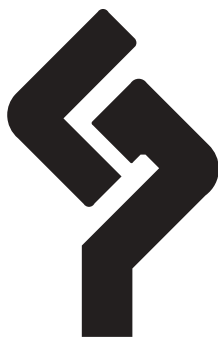
Sample	A	B
Number of Replicates	12	12
Mean Response	101,064	70,622
Standard Deviation	7,041	4,979
Coefficient of Variation	7.0%	7.1%

C. SPECIFICITY

A total of 88 ATCC culture isolates were evaluated using the AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST. These isolates represented a total of 72 species from 50 genera. Thirteen isolates of *S. aureus*, 12 isolates of 8 other *Staphylococcus* species and 63 isolates of 49 other genera representing a phylogenetic cross-section of organisms were evaluated using the AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST. All *S. aureus* isolates tested produced positive results using the AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST. Other *Staphylococcus* species and the representative phylogenetic cross-section of species did not react using this kit.

D. RECOVERY

Five serial dilutions of *S. aureus* cells ranging from 0 to 10 million cells per assay were tested in the presence of 30 million cells of the following non-target species: *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. The presence of these non-target species did not interfere with the positive signal of the *S. aureus* cell dilutions, nor did they generate a positive reaction with the AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CULTURE IDENTIFICATION TEST.





AccuProbe

STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTEST (bioMérieux Best.Nr. 39203 / Gen-Probe Kat. Nr. 102875/2875)

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

Der AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTEST ist ein DNA-Sonden-Schnelltest, der nach dem Prinzip der Nukleinsäurehybridisierung arbeitet und die Identifizierung von *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) aus Kulturisolaten ermöglicht.

ZUSAMMENFASSUNG UND TESTERKLÄRUNG

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist für eine Vielzahl von Infektionen beim Menschen verantwortlich, darunter Erkrankungen der Haut und des Bindegewebes. Hautpusteln, Impetigo aber auch schwerere Infektionen wie Bakteriämie, Osteomyelitis, Nierenabszess, Pneumonie, Endokarditis, Meningitis, Gastroenteritis und toxischer Schock gehören zu diesen Erkrankungen (3). Des Weiteren ist *S. aureus* ein wichtiger Erreger nosokomialer Infektionen. Das Auftreten Methicillin-resistenter Stämme (MRSA) ist in den Vereinigten Staaten in Krankenhäusern zu einem großen epidemio-logischen Problem geworden.

Durch seine Häufigkeit und die Schwere der hervorgerufenen Erkrankungen ist *S.aureus* innerhalb der Gattung *Staphylococcus* die klinisch bedeutsamste Spezies (6).

Die gängigen Methoden zur Identifizierung von *S. aureus* umfassen Gramfärbung, Zellmorphologie, Bildung von Katalase, Koagulase und Pigment, Empfindlichkeit gegenüber Lysostaphin und Lysozym sowie anaerobe Säurebildung aus Glukose (4). Darüber hinaus gibt es mehrere kommerziell erhältliche Systeme, mit denen Stämme biochemisch charakterisiert werden können.

Unter den humanpathogenen *Staphylococcus*-Stämmen ist nur *S. aureus* in der Lage Plasma zu koagulieren (Koagulase). Es sollte erwähnt werden, daß einige *Staphylococcus* Spezies wie *S. intermedius* und *S. hyicus*, die bei Tieren gefunden wurden, diese Eigenschaft ebenfalls besitzen können. Zur Identifizierung von *S. aureus* werden im allgemeinen zwei verschiedene Koagulase-Tests durchgeführt: ein Röhrchen-Test für freie Koagulase und ein Objektträger-test für gebundene Koagulase. Der Röhrchentest gilt als der genauere der beiden Tests, jedoch kann es mehrere Stunden dauern, bis ein Ergebnis vorliegt. Der Koagulase-Objektträger-test kann bei bis zu 10 bis 15% der *S. aureus* Stämme ein falsch-negatives Ergebnis liefern (2).

Wegen der Existenz klinischer Problemkeime, die mit herkömmlichen Methoden nicht identifizierbar sind und dem Vorkommen Koagulase-positiver Stämme bei Tieren ist eine alternative schnelle und sichere Identifizierungsmethode erforderlich.

In klinischen Studien hat der AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTEST alle bekannten und getesteten Methicillin-resistenten *S. aureus* Stämme erkannt.

Der AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTEST ist eine schnelle, objektive Methode zur sicheren Identifizierung von *S. aureus*. Die Identifizierung basiert auf dem Nachweis von rRNA Sequenzen, die für *S. aureus* spezifisch sind.

TESTPRINZIP

Nukleinsäure-Hybridisierungstests basieren auf der Fähigkeit komplementärer Nukleinsäuresequenzen spezifisch zu hybridisieren und stabile Doppelstrang-Komplexe zu bilden (5). Der AccuPROBE Test enthält eine einzelsträngige DNA-Sonde, an die ein Chemilumineszenzmarker gekoppelt ist. Diese Sonde ist der rRNA der Zielsequenz komplementär. Nachdem die rRNA des Zielorganismus freigesetzt ist, verbindet sich die Sonde mit dieser und bildet einen stabilen DNA-RNA Komplex. Ein Selektionsreagenz baut den Chemilumineszenzmarker der ungebundenen Sonde ab, während der Marker der gebundenen Sonde intakt bleibt. Das GEN-PROBE Luminometer mißt das von den DNA-RNA-Hybriden abgegebene Lichtsignal. Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn der vom Luminometer angezeigte Wert gleich oder größer ist als der Grenzwert (cut-off). Liegt der Wert unterhalb des Grenzwertes, ist das Ergebnis negativ.

REAGENZIEN

Die Reagenzien des AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden in drei separaten Kits geliefert:

AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS SONDEN-TESTKIT

Sondenreagenz (P) (4 x 5 Röhrchen)
Staphylococcus aureus

AccuPROBE KULTURBESTÄTIGUNGS-REAGENZIENKIT

Reagenz 1 (Lysereagenz) (1) 1 x 10 ml
Pufferlösung mit 0,04% Natriumazid

Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) (2) 1 x 10 ml
Pufferlösung

Reagenz 3 (Selektionsreagenz) (3) 1 x 60 ml
Pufferlösung

GEN-PROBE DETEKTIONSREAGENZIEN-KIT

Detektionsreagenz I (RI) 1 x 240 ml
0,1% Wasserstoffperoxid in
0,001 N Salpetersäure

Detektionsreagenz II (RII) 1 x 240 ml
1 N Natriumhydroxyd

VORSICHTSMASSNAHMEN

- A. Nur für die *in vitro* Diagnostik verwenden.
- B. Beachten Sie bei der Testdurchführung die üblichen Vorsichtsmaßnahmen (1).
- C. Verwenden Sie diesen Test nur zur Identifizierung von *S. aureus* aus Kulturisolaten.
- D. Verwenden Sie nur die mitgelieferten oder empfohlenen Einweg-Labormaterialien.
- E. Die Reagenzien dieses Kits enthalten Natriumazid, das mit Blei- oder Kupferrohren zu explosiven Metallaziden reagieren kann. Beim Ableiten in die Kanalisation sollten die Reagenzien immer mit reichlich Wasser verdünnt werden.
- F. Vermeiden Sie jeden Kontakt der Detektionsreagenzien I und II mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten. Bei eventuellem Kontakt sofort mit Wasser spülen. Beim Verschütten einer dieser Reagenzien, die Flüssigkeit vor dem Aufwischen mit Wasser verdünnen.

LAGERUNG

Die Sondenreagenzröhrchen bei 2° - 8°C in den Aluminiumbeuteln lagern. Die original verpackten Sondenreagenzröhrchen sind bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach dem Öffnen des Beutels sind die Röhrchen 2 Monate, längstens jedoch bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Beutel müssen nach jedem Gebrauch wieder fest verschlossen werden.

Die übrigen Reagenzien des ACCU_{PROBE} STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS sind bei 2° - 25°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

DIE REAGENZIEN NICHT EINFRIEREN.

PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG

Der ACCU_{PROBE} STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTEST dient zur Identifizierung von *S. aureus* aus Kulturisolaten.

- A. **Feste Kulturmedien.** Verwenden Sie Kulturen von geeigneten Festmedien mit Staphylokokken-verdächtiger Morphologie. Die Kulturen können getestet werden, sobald Wachstum sichtbar ist. Sie sollten nicht älter als 48 Stunden sein.
 - 1. Teile des Zellrasens mit einer 1 µl Einweg-Plastiköse, einer Metallöse oder einer Einweg-Plastiknadel abnehmen. Verwenden Sie wegen des geringen Flüssigkeitsvolumens, in dem die Zellen anschließend gelöst werden, keinen Wattetupfer.
 - 2. Wird eine einzelne Kolonie getestet, sollte diese einen Durchmesser von mindestens 1 mm haben.
1 µl Zellen (Öse) oder mehrere (3-4) kleinere Kolonien können getestet werden.
 - 3. Achten Sie darauf, daß beim Abnehmen der Zellen kein Nährboden mit abgenommen wird.
 - 4. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Möglichkeit, eine weitere Platte zu beimpfen, um die Reinheit der entnommenen Probe zu überprüfen.

- B. Flüssige Kulturmedien.** Der Test kann mit geeigneten Flüssigkulturen wie Trypcase-Soja- oder Hirn-Herz-Bouillon, deren Trübung größer oder gleich McFarland Standard 1 ist, durchgeführt werden. Es können Bouillonkulturen, die bis zu 72 Stunden bei 37°C inkubiert wurden, verwendet werden. Pipettieren Sie 50 µl Probe aus der gut gemischten Bouillonsuspension in die Sondenreagenzröhrchen, wie im Abschnitt Testdurchführung Punkt C PROBENVORBEREITUNG beschrieben.

MITGELIEFERTE MATERIALIEN

ACCUPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTEST
bioMérieux Best.Nr. 39203 / Gen-Probe Kat. Nr. 102875/2875

20 Tests

Sondenreagenz (P) 4 x 5 Röhrchen

ERORDERLICHE MATERIALIEN (nicht im Kit enthalten)

Sterile 1 µl Plastikösen, Metallösen oder Plastiknadeln
zum Abimpfen der Kolonien.

Kontroll-Kulturstämme

Brutschrank oder Wasserbad (35° bis 37°C)

Wasserbad oder Heizblock* (60° ± 1°C)

Mikropipetten (50 µl, 300 µl)

Repetierpipetten (50 µl, 300 µl)

Vortex

* Die Heizblöcke müssen für 12 x 75 mm Röhrchen geeignet sein. Es wird daher empfohlen, die Heizblocksysteme von GEN-PROBE zu verwenden.

ZUSÄTZLICHE VERFÜGBARE MATERIALIEN

GEN-PROBE LEADER 50i Luminometer

(bioMérieux Best.Nr. 39400 / Gen-Probe Kat. Nr. 103100i/3100i)

ACCUPROBE REAGENZIENKIT KULTURBESTÄTIGUNG

(bioMérieux Best.Nr. 39305 / Gen-Probe Kat. Nr. 102800/2800)

GEN-PROBE DETEKTIONS-REAGENZIENKIT

(bioMérieux Best.Nr. 39300 / Gen-Probe Kat. Nr. 201791/1791)

Heizblock (60° ± 1°C)

(bioMérieux Best.Nr. 39406 / Gen-Probe Kat. Nr. 3397)

TESTDURCHFÜHRUNG

A. VORBEREITUNG DER GERÄTE UND MATERIALIEN

1. Stellen Sie den Brutschrank oder das Wasserbad auf 35° bis 37°C ein.
2. Stellen Sie das Wasserbad oder den Heizblock auf 60° ± 1°C ein.
3. Bereiten Sie das GEN-PROBE Luminometer für die Messung vor. Vergewissern Sie sich, daß für die Durchführung des Tests ausreichend Detektionsreagenz I und II vorhanden ist.

B. KONTROLLEN

In jedem Labor sollten gemäß den örtlichen Bestimmungen routinemäßig positive und negative Kontrollstämme mitgeführt werden. Als Positivkontrolle kann eine *S. aureus* Kultur (z.B. American Type Culture Collection, ATCC 12600) dienen, während eine *Staphylococcus epidermidis* Kultur (z.B. ATCC 14990) als Negativkontrolle verwendet werden kann.

C. PROBENVORBEREITUNG

1. Die Folienbeutel am oberen Ende aufschneiden. Entnehmen Sie die für die Kulturisolate und/oder Kontrollen ausreichende Anzahl an Sondenreagenzröhrchen. Den Beutel an der geöffneten Seite mehrfach umschlagen und mit Klebeband oder einer Klammer wieder dicht verschließen. **Den Trockenbeutel nicht herausnehmen.**
2. Beschriften Sie eine ausreichende Anzahl Sondenreagenzröhrchen für die Kulturisolate und/oder die Kontrollen. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf.
3. Pipettieren Sie 50 µl Reagenz 1 (Lysereagenz) in alle Sondenreagenzröhrchen. Geben Sie kein Reagenz 1 in die Sondenreagenzröhrchen, wenn Flüssigkulturen getestet werden.
4. Überführen Sie die Probe vom festen Medium oder 50 µl einer gut gemischten Flüssigkultur in die beschrifteten Sondenreagenzröhrchen, wie im Abschnitt PROBENGWINNUNG UND -VORBEREITUNG beschrieben. Bei Proben von festen Kulturmedien wirbeln Sie die Öse oder Nadel in Reagenz 1 (Lysereagenz), so daß möglichst viele Zellen in das Röhrchen übertragen werden und mischen Sie gründlich.
5. Die Sondenreagenzröhrchen verschließen und für 5 min bei 35° - 37°C in einem Wasserbad oder 10 min bei 35°- 37°C im Brutschrank inkubieren.

D. HYBRIDISIERUNG

1. Nehmen Sie die Sondenreagenzröhrchen aus dem Wasserbad oder Brutschrank. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf. Pipettieren Sie 50 µl Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) in jedes Sondenreagenzröhrchen.
2. Verschließen Sie die Sondenreagenzröhrchen und inkubieren Sie sie für 15 min bei 60° ± 1°C in einem Wasserbad oder Heizblock.

E. SELEKTION

1. Nehmen Sie die Sondenreagenzröhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf. Pipettieren Sie 300 µl Reagenz 3 (Selektionsreagenz) in jedes Röhrchen. Verschließen Sie die Röhrchen und vortexen Sie diese, um den Inhaltgleichmäßig durchzumischen.
2. Inkubieren Sie die Sondenreagenzröhrchen für 5 min bei 60° ± 1°C im Wasserbad oder Heizblock.
3. Nehmen Sie die Sondenreagenzröhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock und lassen Sie sie für mindestens 5 min bei Raumtemperatur stehen. Entfernen Sie die Stopfen und werfen Sie diese. **Die Röhrchen sollten innerhalb 1 Stunde nachdem Sie aus dem Wasserbad oder Heizblock entfernt wurden, gemessen werden.**

F. DETEKTION

1. Wählen Sie auf dem Luminometer das geeignete Programm.
2. Zur Säuberung der Röhrchenwand sowie zur Vermeidung von elektrostatischen Einflüssen während der Messung durch das Röhrchenmaterial selbst, sollte jedes Röhrchen vor der Messung mit einem feuchten Tuch bzw. Papier abgewischt werden. Stellen Sie die Röhrchen gemäß den Anweisungen im Handbuch in das Luminometer.
3. Nehmen Sie die Röhrchen nach der Messung aus dem Luminometer.

HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

- A. REAGENZIEN: Das Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) kann präzipitieren. Zur Auflösung des Niederschlags das Reagenz auf 35° - 60°C erhitzen und mischen.
- B. TEMPERATUR: Die Probenvorbereitung, Hybridisierung und Selektion sind temperaturabhängig. Es muß deshalb unbedingt darauf geachtet werden, daß der Brutschrank, das Wasserbad oder der Heizblock im angegebenen Temperaturbereich gehalten werden.
- C. ZEIT:
 1. Die Hybridisierungsreaktion sollte innerhalb 1 h nach Zugabe der Zellen und Reagenz 1 in die Sondenreagenzröhrchen gestartet werden.
 2. Hybridisierung und Selektion sind zeitabhängige Reaktionen. Die Hybridisierungsdauer sollte nicht unter 15 min liegen, jedoch 20 min nicht überschreiten. Die Sondenreagenzröhrchen während des Selektionsschrittes mindestens 5 min, jedoch nicht länger als 6 min inkubieren.
- D. WASSERBAD: Achten Sie darauf, daß der Wasserstand ausreichend hoch bleibt, so daß sich die gesamte Reaktionslösung der Sondenreagenzröhrchen im Wasser befindet.
- E. VORTEXEN: Während des Arbeitsschrittes SELEKTION muß besonders darauf geachtet werden, daß die Probenmischung absolut homogen ist, insbesondere nach Zugabe von Reagenz 3.
- F. FEHLERMÖGLICHKEITEN
 1. Bei Messungen mit dem LEADER können erhöhte negative Kontrollwerte (*S. epidermidis*, ATCC 14990) über 20.000 RLU (Relative Light Units) durch ungenügendes Mischen nach Zugabe von Reagenz 3 (Selektionsreagenz) entstehen. Entsprechendes gilt bei Messungen mit dem AccuLDR (vormals PAL), wenn dort erhöhte negative Kontrollwerte über 600 PLU (Photometric Light Units) gemessen werden. Ein ähnlicher Effekt kann beim Testen von Mischkulturen auftreten. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Agarmedium überimpfen und inkubieren.
 2. Schwach positive Kontrollwerte (*S. aureus* ATCC 12600) unter 50.000 RLU auf dem LEADER oder 1500 PLU auf dem AccuLDR (vormals PAL) erhält man bei zu geringen Keimzahlen oder durch Testen von Mischkulturen bzw. zu alter Kulturen. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Agarmedium überimpfen und inkubieren.

ERGEBNISSE

A. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse des AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden auf der Basis folgender Grenzwerte (cut-off) interpretiert. Ergebnisse, deren Lichtsignale diesen Grenzwerten entsprechen oder darüber liegen, werden als positiv bewertet. Signale unterhalb dieser Grenzwerte werden als negativ bewertet. Liegt das Ergebnis im Graubereich, sollte der Test wiederholt werden.

	AccuLDR (vormals PAL)	LEADER
Grenzwert	1.500 PLU	50.000 RLU
Graubereich	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. QUALITÄTSKONTROLLE UND VALIDIERUNG DER ERGEBNISSE

Die Negativkontrolle (z.B. *S. epidermidis*, ATCC 14990) und die Positivkontrolle (z.B. *S. aureus*, ATCC #12600) müssen folgenden Sollwerten entsprechen:

	AccuLDR (vormals PAL)	LEADER
Negativkontrolle	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Positivkontrolle	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

LIMITIERUNGEN

Diese Methode wurde mit frischen Kulturen getestet, die auf den im Abschnitt PROBENGewinnung und -Vorbereitung angegebenen Festmedien und Flüssigkulturen angezüchtet wurden. Die Performance dieses Tests bei direkter Testung von klinischen Proben wurde nicht evaluiert.

Die Ergebnisse des AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS müssen in Zusammenhang mit anderen Testergebnissen und klinischen Daten interpretiert werden.

NORMALWERTE

Der AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurde in 2 Laboratorien mit klassischen Kulturverfahren mit biochemischer Identifizierung verglichen. Insgesamt wurden 641 klinische Isolate getestet. Darunter waren 309 *S. aureus* Isolate, 40 der 309 *S. aureus* Isolate waren als Methicillin-resistente Stämme bekannt, bei 156 Isolaten handelte es sich um 12 *Staphylococcus*-Spezies, 176 Isolate waren andere Bakterienstämme aus 25 Gattungen.

5 Stämme Koagulase-positiver *Staphylococcus hyicus* und *Staphylococcus intermedius* wurden

evaluiert. Keiner dieser Isolate reagierte mit dem AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTEST positiv.

Die klassischen Identifizierungsmethoden umfaßten Gramfärbung, Kolonimorphologie, Objektträger-Koagulase, Röhrenkoagulase und den Staphaurex-Test von Wellcome Diagnostics (nur in Labor 2). Die Stämme wurden entweder als positiv (≥ 50.000 RLU) oder negativ (≤ 50.000 RLU) bewertet. Für die negativen Kulturen wurde ein Bereich von 243 bis 32.022 RLU und für die positiven Kulturen ein Bereich von 138.228 bis 821.826 RLU ermittelt. Ein Vergleich des AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS mit den klassischen Identifizierungsmethoden ist im folgenden angegeben.

AccuPROBE / KULTUR

AccuPROBE KULTUR	Pos Pos	Pos NEG	NEG Pos	NEG NEG	SENSITIVITÄT/ SPEZIFITÄT	PROZENT. KORRELATION
LABOR 1	202	0	0	221	100%/100%	100%

AccuPROBE / LATEX AGGLUTINATION

AccuPROBE LAT.AGG.	Pos Pos	Pos NEG	NEG Pos	NEG NEG	SENSITIVITÄT/ SPEZIFITÄT	PROZENT. KORRELATION
LABOR 2	107	0	1*	110	99%/100%	99,5%
LABOR 2	107	0	0	111	100%/100%	100%

Nach Analyse
der diskrepanten
Ergebnisse

*Labor 2 verwendete den Staphaurex-Test (Wellcome Diagnostics) zur ersten Identifizierung von *S. aureus*. Ein offensichtlich falsch negativer Stamm wurde erneut mit dem Röhren-Koagulase-Test, der negativ reagierte, als „non *S. aureus*“ identifiziert.

AccuPROBE / REFERENZMETHODE

AccuPROBE Ref.methode	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivität/ Spezifität	Proz. Korr.
Gesamt (Labor 1 + Labor 2)	309	0	0	332	100%/100%	100%

Dies ist die Gesamtsensitivität, Spezifität und prozentuale Korrelation in Labor 1 und 2 nach wiederholter Identifizierung eines Kulturisolates mit dem Röhren-Koagulasetest.

PERFORMANCE

A. INTRA-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Intra-Assay Präzision des AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTUR-BESTÄTIGUNGSTESTS wurden zwei Konzentrationen der rRNA von *S. aureus* 10 Mal in einer Testserie bestimmt.

Probe	A	B
Anzahl Tests	10	10
Mittelwert (RLU)	103.813	71.408
Standardabweichung	4.562	2.703
Variationskoeffizient	4,4%	3,8%

B. INTER-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Inter-Assay Präzision wurden die beiden gleichen Konzentrationen *S. aureus* rRNA in Einzelbestimmungen in 12 aufeinanderfolgenden Testserien bestimmt.

Probe	A	B
Anzahl Tests	12	12
Mittelwert (RLU)	101.064	70.622
Standardabweichung	7.041	4.979
Variationskoeffizient	7,0%	7,1%

C. SPEZIFITÄT

Insgesamt wurden 88 ATCC Kulturisolate mit dem AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTEST getestet. Bei diesen Stämmen handelte es sich um insgesamt 72 Spezies aus 50 Gattungen. 13 *S. aureus* Stämme, 12 Stämme von 8 anderen *Staphylococcus* Spezies und 63 Stämme von 49 anderen Gattungen, die einen phylogenetischen Querschnitt von Organismen darstellten, wurden mit dem AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTEST evaluiert. Alle *S. aureus* Stämme reagierten mit dem AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTEST positiv. Andere *Staphylococcus* Spezies und die Spezies aus dem repräsentativen phylogenetischen Querschnitt reagierten mit diesem Test nicht.

D. WIEDERFINDUNG

Fünf *S. aureus* Verdünnungsreihen (von 0 bis 10 Millionen Zellen pro Test) wurden in Gegenwart von 30 Millionen Zellen getestet, die zu *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus saprophyticus* (keine Zielspezies) gehörten. Die Anwesenheit dieser Spezies interferierte nicht mit dem positiv-

en Lichtsignal von *S. aureus* Zellverdünnungen und ergaben keine positive Reaktion mit dem ACCUProbe STAPHYLOCOCCUS AUREUS KULTURBESTÄTIGUNGSTEST.



TEST D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLE D'UNE CULTURE

(bioMérieux réf. 39203 / Gen-Probe Cat.No. 102875/2875)

UTILISATION

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLE D'UNE CULTURE est un test d'identification rapide par sonde ADN de *Staphylococcus aureus* isolé à partir d'une culture. Ce test utilise la technique d'hybridation des acides nucléiques.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est responsable d'une grande variété d'infections chez l'homme, avec des manifestations cutanées (furonculose, impétigo), muqueuses, systémiques ou digestives. Il peut être à l'origine de pathologies sévères : bactériémie, ostéomyélite, abcès rénal, pneumonie, endocardite, méningite, gastroentérite, ou choc toxique (3). *S. aureus* est actuellement l'un des principaux agents des infections nosocomiales. De plus, l'émergence de souches résistantes à la méthicilline (MRSA) constitue un problème épidémiologique majeur.

S. aureus est cliniquement l'espèce la plus importante du genre *Staphylococcus*, étant données la fréquence et la gravité des maladies dont il est à l'origine (6).

Les méthodes classiques d'identification de *Staphylococcus aureus* comprennent l'examen après coloration de Gram, l'étude morphologique des colonies, la recherche de catalase et de coagulase, la production de pigment, l'étude de la sensibilité à la lysostaphine et au lysozyme, et enfin la fermentation du glucose en anaérobiose (4). Par ailleurs, il existe sur le marché plusieurs méthodes d'identification biochimique.

Parmi les espèces de staphylocoques pathogènes pour l'homme, *S. aureus* est la seule capable de coaguler le plasma (coagulase). D'autres espèces, isolées chez l'animal, comme *S. intermedius* et *S. hyicus*, possèdent également cette propriété. Deux tests de recherche de la coagulase sont utilisés : un test en tube de mise en évidence de la coagulase libre et un test sur lame pour la coagulase liée. Le test en tube est considéré comme le plus fiable, mais il faut plusieurs heures, voire 24h, pour obtenir un résultat. Quant au test sur lame, il donne entre 10 et 15% de faux-négatifs (2).

L'existence de souches qui ne peuvent être identifiées par les méthodes classiques, et de souches productrices de coagulase chez l'animal, fait apparaître le besoin d'une autre méthode d'identification rapide et précise. Au cours des études cliniques, le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLE D'UNE CULTURE a identifié toutes les souches résistantes à la méthicilline.

Le TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLE D'UNE CULTURE est une méthode rapide et objective qui permet d'identifier de façon formelle *S. aureus*, par la détection de séquences d'ARN ribosomal spécifiques.

PRINCIPE

Les tests par hybridation d'acides nucléiques sont basés sur la capacité de brins complémentaires d'acides nucléiques à s'apparier de manière spécifique pour former des complexes bicaténaux stables (5). La méthode AccuPROBE utilise une sonde ADN monocaténaire conjuguée à un marqueur chimiluminescent complémentaire de l'ARN ribosomal (ARNr) de l'organisme cible. Lorsque l'ARNr de l'organisme cible est libéré, la sonde s'hybride avec celui-ci pour former un complexe ADN-ARN stable. Le Réactif de Sélection permet de différencier les sondes hybridées des sondes non hybridées. Le luminomètre GEN-PROBE permet de mesurer le signal lumineux émis par les hybrides ADN-ARN. Le résultat est positif si le luminomètre indique une valeur supérieure ou égale à la valeur seuil; le résultat est négatif s'il indique une valeur inférieure.

RÉACTIFS

Les réactifs utilisés pour le TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLE D'UNE CULTURE sont fournis dans trois coffrets distincts:

COFFRET SONDE POUR STAPHYLOCOCCUS AUREUS

AccuPROBE

<u>Réactif Sonde (P)</u> <i>Staphylococcus aureus</i>	(4 x 5 tubes)
--	---------------

COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURES AccuPROBE

<u>Réactif 1</u> (Réactif de Lyse) (1) Solution tamponnée contenant 0,04% d'azide de sodium	1 x 10 ml
--	-----------

<u>Réactif 2</u> (Tampon d'Hybridation) (2) Solution tamponnée	1 x 10 ml
---	-----------

<u>Réactif 3</u> (Réactif de Sélection) (3) Solution tamponnée	1 x 60 ml
---	-----------

COFFRET DE RÉACTIFS DE DÉTECTION GEN-PROBE

<u>Réactif de Détection I</u> (RI) 0,1% d'eau oxygénée dans de l'acide nitrique 0,001 N	1 x 240 ml
--	------------

<u>Réactif de Détection II</u> (RII) Hydroxide de sodium 1 N	1 x 240 ml
---	------------

PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

A. Pour diagnostic *in vitro* uniquement.

- B. Observer les précautions habituelles lors de la réalisation de ce test (1).
- C. A utiliser uniquement pour l'identification de *Staphylococcus aureus* isolé à partir d'une culture.
- D. Utiliser uniquement le matériel fourni ou du matériel à usage unique.
- E. Les réactifs de ce coffret contiennent de l'azide de sodium susceptible de former, par réaction avec le plomb ou le cuivre des canalisations, des azides métalliques explosifs. Lors de l'évacuation de ces réactifs, prendre soin de toujours rincer abondamment à l'eau pour prévenir la formation d'azide dans la plomberie.
- F. Eviter le contact des Réactifs de Détection I et II avec la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer à l'eau. Si ces réactifs sont renversés, les diluer avec de l'eau avant d'essuyer.

CONSERVATION

Les tubes de Réactif Sonde doivent être conservés dans leur sachet en aluminium à 2° - 8°C. Avant ouverture, ils sont stables jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, le sachet doit être refermé hermétiquement et les tubes restants utilisés dans un délai de deux mois, dans la limite de la date de péremption.

Les autres réactifs du TEST ACCUProbe D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLE D'UNE CULTURE peuvent être conservés entre 2° et 25°C et restent stables jusqu'à la date de péremption.

NE PAS CONGELER LES REACTIFS

PRELEVEMENT ET PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Le TEST ACCUProbe D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS est conçu pour identifier *S. aureus* isolé à partir d'une culture.

- A. **Identification à partir de culture sur milieu solide.** Le test peut être pratiqué sur des colonies isolées sur un milieu solide approprié. Les échantillons peuvent être testés dès que les colonies sont visibles et dans les 48h suivantes.
 - 1. L'échantillon de culture peut être prélevé avec une öse en plastique jetable de 1µl, une öse métallique ou une aiguille en plastique jetable. Ne pas utiliser d'écouvillon en raison du faible volume de liquide dans lequel les cellules vont être remises en suspension.
 - 2. Il est possible de tester soit le contenu d'une öse de 1 µl, soit plusieurs petites colonies (3 ou 4), soit une seule colonie d'un diamètre d'au moins 1 mm.
 - 3. Eviter de prélever du milieu de culture avec les bactéries.
 - 4. L'opérateur peut décider de ré-ensemencer une boîte de Pétri pour confirmer la pureté de l'échantillon isolé.
- B. **Identification à partir de bouillon de culture.** Le test peut être pratiqué à partir d'un bouillon de culture approprié, comme le bouillon tryc-case-soja ou le bouillon coeur-cerveille, dont la tur-

bidité doit être équivalente à 1 McFarland. L'incubation doit être réalisée à 37°C pendant 72h au maximum. Prélever 50 µl du bouillon de culture bien homogénéisé et le distribuer dans le tube de Réactif de Lyse suivant les instructions du paragraphe C/ PREPARATION DE L' ECHANTILLON.

MATÉRIEL FOURNI

TEST ACCU_{PROBE} D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLE D'UNE CULTURE
bioMérieux réf. 39203 / Gen-Probe Cat. No. 102875/2875

20 Tests

Réactif Sonde (P) 4 X 5 tubes

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Öses à inoculation de 1 µl en plastique stérile, öses métalliques, ou aiguilles en plastique pour prélever les colonies.

Souches de contrôle

Incubateur ou bain-marie (36° ± 1°C)

Bain-marie ou bloc chauffant (60° ± 1°C)*

Micropipettes (50 µl, 300 µl)

Pipettes répétitives (50 µl, 300 µl)

Vortex

* Les emplacements à l'intérieur du bloc chauffant doivent être adaptés à des tubes de 12 x 75 mm. L'utilisation des blocs chauffants GEN-PROBE est recommandée.

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE DISPONIBLE CHEZ VOTRE DISTRIBUTEUR GEN-PROBE :

Luminomètre GEN-PROBE LEADER 50i

(bioMérieux réf. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)

Bloc chauffant (60° ± 1°C)

(bioMérieux réf. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)

COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURES

ACCU_{PROBE}

(bioMérieux réf. 39305 / Gen-Probe Cat.No. 102800/2800)

COFFRET DE REACTIFS DE DETECTION GEN-PROBE

(bioMérieux réf. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791/1791)

MODE OPERATOIRE

A. PREPARATION DU MATERIEL

1. Régler l'incubateur ou le bain-marie à 36° ± 1°C.

2. Régler le bain marie ou le bloc chauffant à $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
3. Préparer le luminomètre GEN-PROBE. S'assurer que la quantité de Réactifs de Détection I et II est suffisante pour pratiquer les tests.

B. CONTROLES

Des souches de contrôle positif et négatif doivent être testées en routine dans chaque laboratoire, selon la réglementation en vigueur. Une culture de *S. aureus* (ATCC 12600) peut être utilisée comme contrôle positif et une culture de *S. epidermidis* (ATCC 14990) peut être utilisée comme contrôle négatif.

C. PREPARATION DES ECHANTILLONS

1. Découper horizontalement la partie supérieure des sachets en aluminium. Retirer le nombre nécessaire de tubes de Réactif Sonde pour tester les échantillons et/ou les souches de contrôle. Refermer le sachet hermétiquement en rabattant plusieurs fois son extrémité et en la fixant par un ruban adhésif ou une pince. **Ne pas retirer le sachet dessicant.**
2. Identifier un nombre suffisant de tubes de Réactif Sonde pour tester les échantillons et les souches de contrôle. Oter et conserver les bouchons.
3. Distribuer 50 μl du Réactif 1 (Réactif de Lyse) dans chaque tube de Réactif Sonde. Si le test est pratiqué sur des souches isolées à partir de bouillon de culture, ne pas ajouter de Réactif 1 dans les tubes de Réactif Sonde.
4. Transférer l'échantillon provenant du milieu solide ou 50 μl du bouillon de culture correctement homogénéisé dans les tubes de Réactif Sonde suivant les instructions du paragraphe PRELEVEMENT ET PREPARATION DE L'ECHANTILLON. Si le test est réalisé à partir d'un milieu solide, agiter l'öse ou l'aiguille dans la solution pour remettre les microorganismes en suspension.
5. Refermer les tubes de Réactif Sonde et les incuber à $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 5 minutes dans le bain-marie ou 10 minutes dans l'incubateur.

D. HYBRIDATION

1. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou de l'incubateur. Oter et conserver les bouchons. Distribuer 50 μl de Réactif 2 (tampon d'hybridation) dans chaque tube.
2. Refermer les tubes de Réactif Sonde et incuber 15 minutes dans le bain-marie ou le bloc chauffant à $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

E. SELECTION

1. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou de l'incubateur. Retirer et conserver les bouchons. Distribuer 300 μl de Réactif 3 (Réactif de Sélection) dans chaque tube. Refermer les tubes et les agiter à l'aide d'un vortex jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.
2. Incuber les tubes de Réactif Sonde pendant 5 min dans le bain-marie ou le bloc chauffant à $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3. Retirer les tubes du bain-marie ou du bloc chauffant et les laisser à température ambiante pendant au moins 5 minutes. Retirer et jeter les bouchons. **Lire les résultats à l'aide du luminomètre dans l'heure qui suit.**

F. DETECTION

1. Sélectionner le protocole approprié sur le luminomètre.
2. Afin de retirer tout résidu de la surface des tubes, les essuyer à l'aide de papier absorbant humide. Placer ensuite les tubes dans le luminomètre et suivre les instructions.
3. Lorsque l'analyse est terminée, retirer les tubes du luminomètre.

REMARQUES

- A. REACTIFS : le Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) peut précipiter. Le chauffer et l'agiter à 35° - 60°C pour dissoudre le précipité.
- B. TEMPERATURE : l'hybridation et la sélection sont des réactions thermo-dépendantes. Par conséquent, il est impératif de maintenir le bain-marie, l'incubateur ou le bloc chauffant à la température préconisée.
- C. DUREE DES OPERATIONS:
 1. L'étape d'hybridation doit être initiée dans l'heure qui suit l'introduction de l'échantillon et du Réactif 1 dans les tubes de Réactif Sonde.
 2. Les réactions d'hybridation et de sélection sont dépendantes du temps. La durée de l'étape d'hybridation doit être au minimum de 15 minutes et au maximum de 20 minutes. Pendant l'étape de sélection, incubé les tubes de Réactif Sonde pendant au moins 5 minutes mais pas plus de 6 minutes.
- D. BAIN-MARIE : le niveau d'eau doit être maintenu de manière à ce que la totalité du liquide réactionnel dans les tubes de Réactif de Sonde soit immergée.
- E. UTILISATION DU VORTEX: Il est important d'avoir un mélange homogène lors de l'étape de sélection, en particulier après l'addition du Réactif 3.
- F. RESOLUTION D'INCIDENTS
 1. Des valeurs élevées de contrôle négatif (*S. epidermidis* ATCC 14990), supérieures à 20.000 RLU (Relative Light Units) sur le LEADER ou 600 PLU (Photometric Light Units) sur l'AccuLDR (anciennement PAL), peuvent être dues soit à une homogénéisation insuffisante après l'addition du Réactif 3 (Réactif de Sélection), soit à la présence de différents types de colonies. Pour vérifier si l'on est en présence d'une culture mixte, repiquer une partie de l'échantillon sur un milieu de culture gélosé approprié et le mettre à incuber.
 2. Des valeurs faibles de contrôle positif (*S. aureus* ATCC 12600), inférieures à 50.000 RLU sur le LEADER ou 1.500 PLU sur l'AccuLDR, peuvent être dues à un nombre insuffisant de cellules ou à des cultures mixtes ou âgées. Pour vérifier si l'on est en présence d'une culture mixte, repiquer une partie de l'échantillon sur un milieu de culture gélosé approprié et le mettre à incuber.

RÉSULTATS

A. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats du TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLE D'UNE CULTURE sont interprétés en fonction d'une valeur seuil. Les échantillons produisant un signal lumineux de valeur supérieure ou égale à ce seuil sont considérés comme positifs. Les signaux lumineux inférieurs à ce seuil sont considérés comme négatifs. Lorsque le résultat est situé dans la zone d'incertitude, le test doit être répété. Si la seconde analyse donne toujours des résultats équivoques, il faut repiquer la souche afin de vérifier sa pureté.

	AccuLDR (anciennement PAL)	LEADER
Valeur seuil	1.500 PLU	50.000 RLU
Zone d'incertitude	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. CONTRÔLE DE QUALITÉ ET ACCEPTABILITÉ DES RESULTATS

Les contrôles négatifs (par ex. *S. epidermidis*, ATCC 14990) et positifs (par ex. *S. aureus*, ATCC 12600) doivent satisfaire aux valeurs suivantes:

	AccuLDR (anciennement PAL)	LEADER
Contrôle négatif	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Contrôle positif	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

Si les contrôles se trouvent en-dehors de ces zones, les résultats du test ne doivent pas être pris en considération.

LIMITES DU TEST

Cette méthode a été testée sur des cultures fraîches réalisées sur milieux solides et sur les types de bouillons de culture cités dans le paragraphe PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON. Les performances de ce test pratiqué directement sur des échantillons cliniques n'ont pas été évaluées.

Les résultats du TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLE D'UNE CULTURE doivent être interprétés en fonction des autres données du laboratoire et corrélés avec les données cliniques.

VALEURS ATTENDUES

Le TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLE D'UNE CULTURE a été comparé à des méthodes standard de culture avec identification biochimique. Ces méthodes ont été effectuées sur deux sites différents sur un total de 641 souches, dont 309 souches de *S. aureus*, 156 souches de 12 autres espèces de *Staphylococcus*, et 175 souches de

microorganismes représentant 25 genres. 40 des 309 souches de *S. aureus* étaient résistantes à la méthicilline.

5 souches de *Staphylococcus hyicus* et de *Staphylococcus intermedius*, coagulase-positifs, ont également été testées et ont toutes donné un résultat négatif.

L'identification sur culture standard a été pratiquée (examen après coloration de Gram, étude morphologique des colonies, test de la coagulase sur lame ou en tube). Seul le site 2 a utilisé le Staphaurex (Wellcome Diagnostics). Les échantillons ont été déterminés soit positifs (\geq à 50 000 RLU), soit négatifs (\leq à 50.000 RLU). Les observations ont montré que les cultures négatives avaient une valeur comprise entre 243 et 32.022 RLU et les cultures positives entre 138.228 et 821.826 RLU. La comparaison de ces résultats avec les méthodes d'identification standard figure dans les tableaux ci-dessous :

AccuPROBE / CULTURE

AccuPROBE Culture	Pos Pos	Pos Nég	Nég Pos	Nég Nég	Sensibilité/ Spécificité	Taux de Concordance
Site 1	202	0	0	221	100%/100%	100%

AccuPROBE / AGGLUTINATION DE LATEX

AccuPROBE Latex	Pos Pos	Pos Nég	Nég Pos	Nég Nég	Sensibilité/ Spécificité	Taux de Concordance
Site 2	107	0	1*	110	99,0%/100%	99,5%
Site 2	107	0	0	111	100%/100%	100%

après analyse des discordants

* Le site 2 a utilisé le Staphaurex (Wellcome diagnostics) lors de la première identification. Le faux-négatif présumé a été « ré-identifié » au moyen du test de la coagulase en tube, et a donné un résultat négatif.

AccuPROBE / IDENTIFICATION DE REFERENCE

AccuPROBE Réf.I.D.	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilité/ Spécificité	Taux de Concordance
Total (site 1 et site 2)	309	0	0	332	100%/100%	100%

Ce tableau donne la spécificité, la sensibilité, et le pourcentage de concordance absolus pour les sites 1 et 2 après « ré-identification » d'une souche par le test de la coagulase en tube.

PERFORMANCE DU TEST

A. PRÉCISION INTRA-ESSAI

La précision intra-essai du TEST ACCU_{PROBE} D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLE D'UNE CULTURE a été calculée en testant deux concentrations différentes d'ARN ribosomal de *Staphylococcus aureus*. Le même échantillon a été testé 10 fois dans une même série.

Échantillon	A	B
Nombre d'essais	10	10
Réponse moyenne (RLU)	103.813	71.408
Ecart-type	4.562	2.703
Coefficient de variation	4,4%	3,8%

B. PRÉCISION INTER-ESSAI

La précision inter-essai a été calculée en analysant en simple deux concentrations différentes d'ARN ribosomal au cours de 12 séries distinctes.

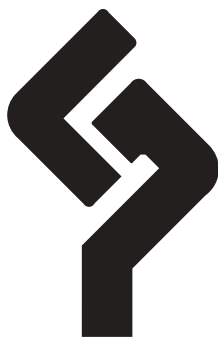
Échantillon	A	B
Nombre d'essais	12	12
Réponse moyenne (RLU)	101.064	70.622
Ecart-type	7.041	4.979
Coefficient de variation	7,0%	7,1%

C. SPECIFICITE

Un total de 88 souches ATCC a été testé avec le TEST ACCU_{PROBE} D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS. Ces souches représentaient au total 72 espèces issues de 50 genres différents. Un panel phylogénétique de 13 souches de *S. aureus*, 12 souches de 8 autres espèces de *Staphylococcus* et 63 souches de 49 autres genres a été testé. Toutes les souches de *Staphylococcus aureus* et uniquement celles-ci, testées avec le TEST ACCU_{PROBE} D'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLE D'UNE CULTURE, ont donné des résultats positifs.

D. TEST DE SURCHARGE

5 séries de dilutions de *S. aureus* (de 0 à 10 millions de microorganismes) ont été testées en présence de 30 millions de microorganismes d'espèces autres que *S. aureus* (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*). Aucune interférence ni réaction croisée n'a été observée.





TEST DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS (bioMérieux ref. 39203 / Gen-Probe Cat. No. 102875/2875)

UTILIZACION

El TEST ACCU_{PROBE} DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS es un test rápido de identificación por sonda de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) aisladas de un cultivo. Este test utiliza la técnica de hibridación de ácidos nucleicos.

RESUMEN Y EXPLICACION DEL TEST

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es un agente que causa una gran variedad de infecciones en el hombre, incluidas enfermedades de la piel y de los tejidos blandos. Entre otras, pústulas de la piel, impétigo e infecciones más serias, tales como bacteremia, osteomielitis, absceso renal, neumonía, endocarditis, meningitis, gastroenteritis y shock tóxico (3). *S. aureus* sigue siendo un agente importante de infecciones nosocomiales. Las cepas resistentes a la meticilina (MRSA) se han convertido en un problema epidemiológico importante en hospitales .

Dentro del género *Staphylococcus*, *S. aureus* es la especie clínicamente más significativa dada la incidencia y gravedad de las infecciones que puede provocar (6).

Los métodos actuales para identificar *S. aureus* incluyen morfología con tinción de Gram, morfología celular, producción de catalasa, producción de coagulasa, producción de pigmento, susceptibilidad a la lisostafina y a la lisozima y la fermentación de la glucosa en anaerobiosis (4). Existen además varios sistemas comercialmente disponibles que permiten caracterizar bioquímicamente las cepas.

En las especies de *Staphylococcus* asociadas con infecciones humanas, *S. aureus* se distingue por su capacidad para coagular plasma (coagulasa). Debe destacarse que algunas especies de *Staphylococcus* encontradas en animales, tales como *S. intermedius* y *S. hyicus*, también pueden presentar esta característica. Dos tests diferentes de coagulasa se utilizan habitualmente para identificar *S. aureus*. Uno es un test en tubo para detectar la coagulasa libre y el otro es un test en portaobjeto para detectar la coagulasa fijada. El test de la coagulasa en tubo se supone el más fiable de ambos, pero puede requerir varias horas, incluso toda una noche, para obtener resultados. El test de la coagulasa en portaobjeto puede dar resultados negativos en hasta 10 a 15% de las cepas de *S. aureus* (2).

Dada la existencia de cepas clínicas problemáticas que no pueden ser identificadas utilizando los métodos clásicos y considerando las cepas coagulasa positivas asociadas con animales, se ha hecho necesario un método de identificación alternativo rápido y preciso. En los estudios clínicos, el TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACIÓN DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS detectó todas las cepas de *S. aureus* conocidas como resistentes a meticilina que fueron analizadas.

El TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ofrece un método rápido y objetivo para la identificación definitiva de *S. aureus* basado en la detección de las secuencias específicas de ARN ribosómico, exclusivas de *S. aureus*.

PRINCIPIOS DE LA TECNICA

Los tests de hibridación de ácidos nucleicos se basan en la capacidad de las cadenas complementarias de los ácidos nucleicos para alinearse y asociarse de manera específica, constituyendo complejos bicatenarios estables (5). El SISTEMA AccuPROBE utiliza una sonda de ADN monocatenario conjugado con un marcador quimioluminiscente complementario del ARN ribosómico del organismo diana. Después que el ARN ribosómico es liberado del organismo, la sonda de ADN marcado se combina con el ARN ribosómico del organismo diana para formar un híbrido estable ADN:ARN. El Reactivo de Selección permite diferenciar las sondas no hibridadas de las sondas hibridadas. Los híbridos ADN:ARN marcados son medidos mediante el luminómetro GEN-PROBE. Un resultado positivo es una lectura del luminómetro igual o superior al umbral. Un valor por debajo del umbral es un resultado negativo.

REACTIVOS

Los reactivos del TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACIÓN DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS son suministrados en tres kits de reactivos diferentes:

KIT CON SONDA AccuPROBE PARA STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Reactivo Sonda (P) (4 x 5 tubos)
Staphylococcus aureus

KIT DE REACTIVOS AccuPROBE PARA IDENTIFICACION DE CULTIVOS

Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) (1) 1 x 10 ml
Solución tampón que contiene 0,04% de azida sódica

Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) (2) 1 x 10 ml
Solución tampón

Reactivo 3 (Reactivo de Selección) (3) 1 x 60 ml
Solución tampón

KIT DE REACTIVOS DE DETECCION GEN-PROBE

Reactivo de Detección I (RI) 1 x 240 ml
peróxido de hidrógeno al 0,1% en ácido nítrico 0,001 N

Reactivo de Detección II (RII)
hidróxido de sodio 1 N

1 x 240 ml

PRECAUCIONES DE EMPLEO

- A. Sólo para diagnóstico *in vitro*.
- B. Utilizar las precauciones habituales cuando se realiza este test (1).
- C. Utilizar sólo para la identificación de *S. aureus* aislado en cultivo.
- D. Utilizar sólo el material de laboratorio suministrado o el material desechable especificado .
- E. Los reactivos de este kit contienen azida sódica que pueden reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Al desechar estos reactivos, diluir siempre el material en abundante agua con el fin de prevenir la acumulación de azidas en las tuberías .
- F. Evitar el contacto de los Reactivos de Detección I y II con la piel, los ojos y las membranas mucosas. Lavar con agua si cualquiera de estos reactivos entran en contacto con la piel. Si se vuelcan estos reactivos, diluir con agua antes de secar.

CONSERVACION

Los tubos de Reactivo Sonda deben ser conservados en las bolsas de aluminio a 2° - 8°C. Los tubos de Reactivo Sonda son estables en sus bolsas cerradas hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez abierta, cada bolsa debe ser cerrada y sellada y los tubos deben utilizarse en los dos meses siguientes y antes de la fecha de caducidad.

Otros reactivos utilizados en el TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS pueden ser conservados entre 2° y 25°C y se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada.

NO CONGELAR LOS REACTIVOS.

TOMA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

El TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS está diseñado para determinar la identidad de muestras de *S. aureus* aisladas en cultivo.

- A. Identificación a partir de cultivo en medio sólido . Puede estudiarse el crecimiento en un medio sólido adecuado, cuando la morfología sugiera la presencia de estafilococos. El cultivo debe tener menos de 48 horas. Puede ser estudiado apenas el crecimiento celular sea visible.
 - 1. El crecimiento celular puede ser tomado con un asa de plástico desechable de 1 µl, un asa metálica, una aguja de plástico desechable o un bastoncillo . No deben utilizarse torundas dado el escaso volumen de líquido en el que serán puestas en suspensión las células.

TECNICA

A. PREPARACION DEL EQUIPO

1. Ajustar el incubador o el baño maría entre 35° y 37°C.
2. Ajustar el baño maría o el bloque calefactor a 60° ± 1°C.
3. Preparar el luminómetro GEN-PROBE para su utilización. Verificar que hay un volumen suficiente de Reactivos de Detección I y II para completar los tests.

B. CONTROLES

Las cepas de control positivo y negativo deben ser analizadas rutinariamente en cada laboratorio, conforme con la reglamentación en vigor. Un cultivo de *S. aureus* (p. ej., American Type Culture Collection, ATCC #12600) puede ser utilizado como control positivo mientras que un cultivo de *Staphylococcus epidermidis* (p. ej., ATCC, #14990) puede ser utilizado como control negativo.

C. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

1. Abrir la bolsa de aluminio cortando la parte superior. Retirar una cantidad suficiente de tubos de Reactivo Sonda para analizar las muestras cultivadas y/o los controles. Volver a cerrar herméticamente la bolsa plegando la extremidad abierta varias veces y fijándola con cinta adhesiva o con una pinza. **Dejar la bolsa desecante dentro de la bolsa.**
2. Colocar etiquetas en un número suficiente de tubos de Reactivo Sonda para analizar las muestras cultivadas y/o los controles. Retirar y conservar los tapones.
3. Pipetear 50 µl de Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) en todos los tubos de Reactivo Sonda. Si se analizan cultivos en caldo, no añadir Reactivo 1 a los tubos de Reactivo Sonda.
4. Transferir la muestra desde el medio sólido o bien 50 µl de un caldo de cultivo bien homogeneizado a los tubos de Reactivo Sonda con etiqueta, como se describe en la sección TOMA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS. Agitar el asa, aguja o bastoncillo en el Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) para suspender las células, si se está analizando un crecimiento procedente de un medio sólido, y homogeneizar bien.
5. Volver a tapar los tubos de Reactivo Sonda e incubar a 35° - 37°C durante 5 minutos en un baño maría o 10 minutos a 35° - 37°C en una incubadora.

D. HIBRIDACION

1. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o incubado. Retirar y conservar los tapones. Pipetear 50 µl del Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) en todos los tubos de Reactivo Sonda.
2. Volver a tapar los tubos de Reactivo Sonda e incubar durante 15 minutos a 60° ± 1°C en un baño maría o bloque calefactor.

E. SELECCION

1. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o del bloque calefactor. Retirar y conservar los tapones. Pipetear 300 µl de Reactivo 3 (Reactivo de Selección) en cada tubo. Volver a tapar los tubos y mezclarlos bien en un VORTEX.

2. Incubar los tubos de Reactivo Sonda durante 5 minutos a $60^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ en un baño maría o bloque calefactor.
3. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o del bloque calefactor y dejarlos a temperatura ambiente durante por lo menos 5 minutos. Retirar y desechar los tapones.
Leer los resultados en el luminómetro en la hora que sigue a la extracción del baño maría o del bloque calefactor.

F. DETECCION

1. Seleccionar el protocolo apropiado del menú del software del luminómetro.
2. Utilizando un trapo húmedo o una toalla de papel, limpiar cada tubo para verificar que no se encuentran residuos en el exterior del tubo e insertar el tubo en el luminómetro siguiendo las instrucciones del instrumento.
3. Una vez que el análisis ha terminado, retirar el o los tubos del luminómetro.

OBSERVACIONES SOBRE LA TECNICA

- A. REACTIVOS: El Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) puede precipitar. Para disolver el precipitado, calentar y mezclar la solución a $35^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$.
- B. TEMPERATURA: Las reacciones de preparación de la muestra, hibridación y selección son termodependientes. Por lo tanto, es imperativo que la incubadora, el baño maría o el bloque calefactor se mantengan dentro de los límites de temperatura especificados.
- C. TIEMPO:
 1. La reacción de hibridación debe ser iniciada en la hora que sigue a la incorporación de las células y del Reactivo 1 a los tubos de Reactivo Sonda.
 2. Las reacciones de hibridación y selección son cronodependientes. Dejar por lo menos 15 minutos en hibridación, pero no más de 20 minutos. Incubar los tubos de Reactivo Sonda durante la etapa de SELECCIÓN por lo menos 5 minutos, pero no más de 6 minutos.
- D. BAÑO MARIA: El nivel de agua en el baño maría debe mantenerse para asegurar que todo el volumen del líquido de reacción de los tubos de Reactivo Sonda se encuentra sumergido.
- E. MEZCLA EN VORTEX: Es indispensable contar con una mezcla homogénea durante la etapa de SELECCIÓN, específicamente después de incorporar el Reactivo 3.
- F. RESOLUCION DE INCIDENTES
 1. Valores elevados del control negativo (*S. epidermidis*, ATCC #14990), superiores a 20.000 RLU (Relative Light Units - Unidades Relativas de Luz) en el LEADER, o superiores a 600 PLU (Photometric Light Units - Unidades Fotométricas de Luz) en el AccuLDR (antes PAL) pueden ser causadas por una homogeneización insuficiente después de incorporar el Reactivo 3 (Reactivo de Selección) o por analizar cultivos mixtos. Para verificar si estamos en presencia de cultivos mixtos, repicar una parte de la muestra sobre un medio de cultivo sólido apropiado y poner a incubar.

2. Valores bajos del control positivo (*S. aureus*, ATCC #12600), inferiores a 50.000 RLU o 1.500 PLU en el AccuLDR (antes PAL) pueden ser causados por una cantidad insuficiente de células o por analizar cultivos mixtos o envejecidos . Para verificar si estamos en presencia de un cultivo mixto , repicar una parte de la muestra sobre un medio de cultivo sólido apropiado e incubar .

RESULTADOS

A. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Los resultados del TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS se interpretan en función de un valor umbral . Las muestras que producen señales superiores o iguales a este valor umbral son consideradas positivas. Las señales inferiores a este valor umbral son consideradas negativas. Las muestras con resultados en la zona de incertidumbre deben ser repetidas. Si el segundo análisis da resultados dudosos , repicar la cepa con el fin de verificar su pureza .

	AccuLDR (antes PAL)	LEADER
Valor umbral	1.500 PLU	50.000 RLU
Zona de incertidumbre	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. CONTROL DE CALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

El control negativo (p. ej., *S. epidermidis*, ATCC #14990) y el control positivo (p. ej., *S. aureus*, ATCC #12600) deben satisfacer los siguientes valores:

	AccuLDR (antes PAL)	LEADER
Control negativo	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Control positivo	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

Si los controles se encuentran fuera de estas zonas, los resultados del test no deben tenerse en cuenta

LIMITES

Este método ha sido probado utilizando cultivos frescos en medio sólido y en caldos de cultivo mencionados en la sección TOMA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS. La eficacia de este test no ha sido demostrada en muestras clínicas directas.

Los resultados del TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS deben ser interpretados contrastándolos con otros datos de laboratorio y clínicos .

VALORES ESPERADOS

El TEST ACCUProbe DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS fue comparado con métodos standard de identificación bioquímica de cultivos en dos sitios, utilizando un total de 641 muestras clínicas. De éstas, 309 eran muestras de *S. aureus*, 40 de las 309 muestras de *S. aureus* eran cepas resistentes a la meticilina, 156 eran muestras que representaban a 12 especies de *Staphylococcus* y 176 eran muestras microbianas representantes de otros 25 géneros.

Fueron evaluadas cinco cepas de *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus intermedius* coagulasa positivas. Ninguna de estas muestras produjo una reacción positiva con el TEST ACCUProbe DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

Los métodos de identificación standard incluyeron tests de tinción Gram, morfología de las colonias, coagulasa en portaobjeto, o coagulasa en tubo y Staphaurex (Wellcome Diagnostics) sólo en el Sitio 2. Las muestras fueron clasificadas como positivas (≥ 50.000 RLU) o negativas (≤ 50.000 RLU). Las observaciones demostraron que los cultivos negativos tenían un valor comprendido entre 243 a 32.022 RLU, y 138.228 a 821.826 para los cultivos positivos. Una comparación entre el TEST ACCUProbe DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS y los métodos standard de identificación de cultivos se presenta a continuación.

ACCUProbe / IDENTIFICACION DE CULTIVOS

ACCUProbe CULTIVO	Pos Pos	Pos NEG	NEG Pos	NEG NEG	SENSIBILIDAD/ ESPECIFICIDAD	PORCENT. CONCORDANCIA
SITIO 1	202	0	0	221	100%/100%	100%

ACCUProbe / IDENTIFICACION POR AGLUTINACION DE LATEX

ACCUProbe AG. LAT.	Pos POS	Pos NEG	NEG POS	NEG NEG	SENSIBILIDAD/ ESPECIFICIDAD	PORCENT. CONCORDANCIA
SITIO 2	107	0	1*	110	99%/100%	99.5%
SITIO 2	107	0	0	111	100%/100%	100%

Después del
análisis de
discrepancia

*El Sitio 2 utilizó Staphaurex (Wellcome Diagnostics) para su identificación original de *S. aureus*. Una muestra falso negativo aparente fue nuevamente identificada como "no" *S. aureus* utilizando el test de coagulasa en tubo, que dio un resultado negativo.

AccuPROBE / IDENTIFICACION DE REFERENCIA

AccuPROBE I.D. Ref.	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidad/ Especificidad	Porcent. Concordancia
Total (de Sitio 1 & Sitio 2)	309	0	0	332	100%/100%	100%

Esta es la sensibilidad total, la especificidad y el porcentaje de concordancia entre el Sitio 1 y el Sitio 2 después de la nueva identificación de una muestra de cultivo utilizando el test de la coagulasa en tubo.

RENDIMIENTOS

A. PRECISION INTRA-ENSAYO

La precisión intra-ensayo del TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS fue calculada analizando dos concentraciones de ARN ribosómico de *S. aureus*, utilizando 10 repeticiones de un mismo ensayo.

Muestra	A	B
Número de repeticiones	10	10
Respuesta media	103.813	71.408
Desviación típica	4.562	2.703
Coefficiente de variación	4,4%	3,8%

B. PRECISION INTER-ENSAYOS

La precisión inter-ensayos fue calculada analizando las mismas dos concentraciones de ARN ribosómico de *S. aureus* utilizando determinaciones únicas en 12 series consecutivas.

Muestra	A	B
Número de repeticiones	12	12
Respuesta media	101.064	70.622
Desviación típica	7.041	4.979
Coefficiente de variación	7,0%	7,1%

C. ESPECIFICIDAD

Fueron evaluadas un total de 88 muestras de cultivo ATCC utilizando el TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS. Estas muestras representaron un total de 72 especies de 50 géneros. Trece muestras de *S. aureus*, 12 muestras de otras 8 especies de *Staphylococcus* y 63 muestras de otros 49 géneros que representaban un corte filo-

genético de organismos fueron evaluadas utilizando el TEST ACCU_{PROBE} DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS. Todas las muestras de *S. aureus* estudiadas dieron resultados positivos utilizando el TEST ACCU_{PROBE} DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS. Otras especies de *Staphylococcus* y el corte filogenético de especies no reaccionaron al utilizar este kit.

D. TEST DE SOBRECARGA

Cinco diluciones seriadas de células de *S. aureus*, de 0 a 10 millones de células por test, fueron analizadas en presencia de 30 millones de células de las siguientes especies no dianas: *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*. La presencia de estas especies no dianas no interfirió con la señal positiva de las diluciones de células de *S. aureus* ni generó una reacción positiva con el TEST ACCU_{PROBE} DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.



TEST D'IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA UNA COLTURA

(bioMérieux cod . 39203 / Gen-Probe Cat. No. 102875/2875)

IMPIEGO

IL TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA UNA COLTURA è un test per l'identificazione rapida - mediante sonda a DNA - dello *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) isolato a partire da una coltura. Questo test impiega la tecnica di ibridazione degli acidi nucleici.

INTRODUZIONE

Lo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) è l'agente responsabile di una notevole varietà di infezioni nell'uomo, con manifestazioni a carattere cutaneo (foruncolosi, impetigine), mucoso, sistemico o digestivo. Può dare inoltre origine a gravi patologie quali batteriemia, osteomielite, ascesso renale, polmonite, endocardite, meningite, gastroenterite o choc tossico (3). Lo *S. aureus* rappresenta attualmente uno dei principali agenti di infezioni in ambiente ospedaliero. Inoltre, la comparsa di ceppi resistenti alla meticillina (MRSA) costituisce un problema epidemiologico di notevole rilevanza.

Dal punto di vista clinico lo *S. aureus* è la specie più importante del genere *Staphylococcus*, considerate la frequenza e la gravità delle patologie di cui è all'origine (6).

I metodi classici d'identificazione dello *S. aureus* includono l'esame dopo la colorazione di Gram, lo studio morfologico delle colonie, la produzione di catalasi e coagulasi, la sensibilità alla lisostafina e al lisozima e da ultimo la fermentazione del glucosio in anaerobiosi (4). Inoltre, esistono in commercio numerosi metodi d'identificazione biochimica.

Tra le specie di *Staphylococcus* patogene per l'uomo, lo *S. aureus* è l'unico in grado di coagulare il sangue (coagulasi). Tale proprietà è condivisa anche da altre specie isolate negli animali, ad .es. lo *S. intermedius* e lo *S. hyicus*. Due diversi test di coagulasi vengono normalmente utilizzati per identificare lo *S. aureus*. Il primo è un test in provetta per la coagulasi libera, mentre il secondo è un test su vetrino per la coagulasi legata. Il test in provetta è considerato più affidabile, ma la produzione di un risultato richiede molte ore, anche 24. Il test su vetrino può dare una percentuale di falsi negativi compresa tra il 10% e il 15% (2).

L'esistenza di ceppi non facilmente identificabili con i metodi classici, pone l'esigenza di un metodo d'identificazione alternativo che sia nel contempo rapido e preciso. Nel corso degli studi clinici il

TEST ACCU_{PROBE} DI IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA UNA COLTURA ha individuato tutti i ceppi resistenti alla meticillina.

Il TEST ACCU_{PROBE} DI IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA UNA COLTURA rappresenta un metodo rapido, oggettivo e sicuro di identificazione dello *S. aureus* mediante l'individuazione di sequenze specifiche di RNA ribosomiale.

PRINCIPIO OPERATIVO

I test d'ibridazione degli acidi nucleici sfruttano la capacità dei filamenti complementari di acidi nucleici di accoppiarsi in maniera specifica per formare composti stabili a doppia catena (5). Il test ACCU_{PROBE} impiega una sonda DNA a catena singola – associata ad un marker chemiluminescente – complementare all'RNA ribosomiale (rRNA) dell'organismo bersaglio. Una volta liberato l'rRNA dell'organismo bersaglio, la sonda si combina con le sequenze omologhe formando un complesso DNA-RNA stabile. Il Reagente di Selezione permette di differenziare le sonde ibridate da quelle non ibridate. Il luminometro GEN-PROBE consente di misurare il segnale luminoso emesso dagli ibridi DNA-RNA. Il risultato sarà positivo se il luminometro raggiungerà un valore superiore o uguale al valore soglia, negativo se mostrerà un valore inferiore.

REAGENTI

I reagenti impiegati nel TEST ACCU_{PROBE} DI IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA UNA COLTURA sono forniti in tre diversi kit:

KIT SONDA PER ACCU_{PROBE} STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Reagente Sonda (P) (4 x 5 provette)
Staphylococcus aureus

KIT DI REAGENTI PER IDENTIFICAZIONE DI COLTURA ACCU_{PROBE}

Reagente 1 (Reagente di Lisi) (1) 1 x 10 ml
Soluzione tamponata contenente 0.04% di sodio azide

Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) (2) 1 x 10 ml
Soluzione tamponata

Reagente 3 (Reagente di selezione) (3) 1 x 60 ml
Soluzione tamponata

KIT REAGENTI DI RIVELAZIONE GEN-PROBE

Reagente di Rivelazione I (RI) 1 x 240 ml
0.1% di acqua ossigenata in acido nitrico 0.001 N

Reagente di Rivelazione II (RII) 1 x 240 ml
Idrossido di sodio 1 N

PRECAUZIONI D'USO

- A. Il test è riservato esclusivamente a un uso diagnostico *in vitro*.
- B. Durante la realizzazione di questo test adottare le normali precauzioni (1).
- C. Da usarsi esclusivamente per l'identificazione dello *S. aureus* isolato a partire da una coltura.
- D. Impiegare unicamente il materiale compreso nel kit o materiale monouso.
- E. I reagenti di questo kit contengono sodio azide, una sostanza che può reagire con il piombo o il rame delle condutture e formare composti metallici esplosivi. Durante l'eliminazione di questi reagenti ricordarsi di utilizzare sempre acqua in abbondanza per evitare la formazione di tali composti nelle tubature.
- F. Evitare qualsiasi contatto della cute, degli occhi o delle mucose con i Reagenti di Rivelazione I e II. In caso di contatto, lavare con acqua. Se si verificassero versamenti, diluirli con acqua prima di asciugare.

CONSERVAZIONE

Le provette di Reagente Sonda devono essere conservate nelle confezioni di alluminio a temperature comprese tra 2° e 8°C. Prima dell'apertura rimangono stabili fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura, la confezione deve essere chiusa ermeticamente e le provette devono essere usate nell'arco di due mesi, entro la data di scadenza.

Gli altri reagenti utilizzati nel TEST ACCUProbe DI IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA UNA COLTURA possono essere conservati a una temperatura compresa tra 2° e 25°C e rimangono stabili fino alla data di scadenza.

NON CONGELARE I REAGENTI.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

IL TEST ACCUProbe DI IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA UNA COLTURA è stato progettato e sviluppato per identificare lo *S. aureus* isolato a partire da una coltura.

- A. **Identificazione a partire da coltura solida.** Il test può essere condotto su colonie isolate in un terreno solido adeguato. Il campione può essere testato non appena risulta visibile la proliferazione e nelle 48 ore successive all'inizio della coltura.
 - 1. Il campione di coltura può essere prelevato mediante un'ansa di plastica monouso da 1 µl, un'ansa metallica, ovvero un ago in plastica monouso o una bacchetta per applicazione. Data la bassa quantità di liquido in cui i batteri verranno rimessi in sospensione, si consiglia di non usare tamponi.
 - 2. Esiste la possibilità di testare il contenuto di un'ansa da 1 µl, ovvero di numerose piccole colonie (3 o 4) oppure di un'unica colonia il cui diametro sia almeno di 1 mm.
 - 3. Non effettuare prelievi dal mezzo di coltura con i batteri.

4. A questo punto la persona addetta può decidere di inoculare un'altra piastra di Petri per confermare la purezza del campione isolato.

B. Identificazione su brodo di coltura. Il test può essere condotto su brodi di coltura adeguati quali infusione di tripticase-soia o cuore-cervello con torbidità equivalente o superiore a 1 McFarland L'incubazione deve aver luogo a una temperatura di 37°C per un periodo massimo di 72 ore. Prelevare con una pipetta un campione da 50 µl della parte torbida del brodo di coltura e dispensarlo nella provetta del Reagente di Lisi, attenendosi alle istruzioni riportate nel paragrafo PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.

MATERIALE COMPRESO NEL KIT

TEST ACCU_{PROBE} DI IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA UNA COLTURA TEST

bioMérieux cod. 39203 / Gen-Probe Cat. No. 102875/2875

20 test

Reagente Sonda (P) 4 x 5 provette

MATERIALE RICHIESTO NON FORNITO NEL KIT

Anse da 1 µL in plastica sterile, anse metalliche, aghi in plastica o bacchette di applicazione per il prelievo delle colonie.

Ceppi di controllo delle colture

Incubatore o bagnomaria (da 35° a 37°C)

Bagnomaria o incubatore * (60° ± 1°C)

Micropipette (50 µl, 300 µl)

Micropipette a volume fisso (50 µl, 300 µl)

Vortex

*Gli alloggiamenti all'interno dell'incubatore devono essere perfettamente dimensionati per provette da 12 x 75 mm. Si raccomanda l'impiego di un incubatore GEN-PROBE.

ULTERIORE MATERIALE DISPONIBILE PRESSO IL VOSTRO DISTRIBUTORE GEN-PROBE

Luminometro GEN-PROBE LEADER 50i

(bioMérieux cod. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)

KIT DI REAGENTI D'IDENTIFICAZIONE DI COLTURA ACCU_{PROBE}

(bioMérieux cod. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)

KIT DI REAGENTI DI RIVELAZIONE GEN-PROBE

(bioMérieux cod. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791/1791)

Incubatore (60° ± 1°C)

(bioMérieux cod. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)

PROCEDIMENTO

A. PREPARAZIONE DEL MATERIALE

1. Impostare l'incubatore o il sistema a bagnomaria a una temperatura compresa tra 35° e 37°C.
2. Impostare il sistema a bagnomaria o l'incubatore a 60° ± 1°C.
3. Preparare il luminometro GEN-PROBE. Assicurarsi che la quantità dei reagenti di Rivelazione I e II sia sufficiente per condurre i test.

B. CONTROLLI

In ogni laboratorio occorre testare sistematicamente ceppi di controllo positivo e negativo, secondo la normativa in vigore. È possibile utilizzare una coltura di *S. aureus* (ad es., American Type Culture Collection, ATCC #12600) come controllo positivo e una coltura di *Staphylococcus epidermidis* (ad es., ATCC, #14990) come controllo negativo.

C. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Tagliare orizzontalmente la parte superiore delle confezioni in alluminio. Prelevare il numero necessario di provette di Reagente Sonda per testare i campioni e/o le colture di controllo. Richiudere ermeticamente la confezione ripiegando più volte l'estremità e fermandola con nastro adesivo o con una clip. **Non asportare la confezione di agenti essiccanti.**
2. Predisporre un numero sufficiente di provette di Reagente Sonda per testare i campioni e/o le colture di controllo. Rimuovere e conservare i tappi.
Dispensare 50 µl di Reagente 1 (Reagente di Lisi) in tutte le provette di Reagente Sonda. Qualora il test venga condotto su ceppi isolati a partire da brodi di coltura, non aggiungere Reagente 1 nelle provette del Reagente Sonda.
4. Trasportare il campione proveniente dal terreno di coltura solido o 50 µl del brodo di coltura correttamente omogeneizzato nelle provette di Reagente Sonda, attenendosi alle istruzioni fornite nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Se il test viene eseguito su terreno solido, agitare con un Vortex l'ansa, l'ago o la bacchetta nel reagente 1 (Reagente di Lisi) e mescolare con cura per rimettere i microrganismi in sospensione.
5. Richiudere le provette di Reagente Sonda e mettere in incubazione a 35° - 37°C per 5 minuti nel sistema a bagnomaria o per 10 minuti nell'incubatore.

D. IBRIDAZIONE

1. Togliere le provette di Reagente Sonda dal sistema a bagnomaria o dall'incubatore. Rimuovere e conservare i tappi. Dispensare 50 µl di Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) in ogni provetta di Reagente Sonda.
2. Richiudere le provette di Reagente Sonda e mettere in incubazione per 15 minuti a 60° ± 1°C a bagnomaria o nell'incubatore.

E. SELEZIONE

1. Prelevare le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore. Rimuovere e conservare i tappi. Dispensare 300 µl di Reagente 3 (Reagente di Selezione) in ogni provetta. Richiudere le provette e agitarle con un Vortex per rendere omogenea la miscela.
2. Mettere in incubazione le provette di Reagente Sonda per 5 minuti a $60^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ a bagnomaria o nell'incubatore.
3. Rimuovere le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore e mantenerle a temperatura per almeno 5 minuti. Togliere e gettare i tappi. **Avvalendosi di un luminometro, leggere i risultati del test nell'ora successiva.**

F. LETTURA

1. Selezionare il protocollo giusto sul luminometro.
2. Per eliminare completamente i residui dalla superficie delle provette, asciugarle utilizzando un foglio assorbente inumidito. Inserire successivamente le provette nel luminometro e seguire con attenzione le istruzioni.
3. Una volta conclusa l'analisi, estrarre le provette dal luminometro.

OSSERVAZIONI

- A. REAGENTI: Il Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) può precipitare. Riscaldarlo a 35° - 60°C e agitarlo con un Vortex per sciogliere il precipitato.
- B. TEMPERATURA: l'ibridazione e la selezione sono reazioni temperatura-dipendenti. Di conseguenza è indispensabile mantenere il bagnomaria o l'incubatore alla temperatura raccomandata.
- C. DURATA DELLE OPERAZIONI:
 1. La fase Ibridazione dovrebbe avere inizio entro l'ora successiva all'introduzione del campione e del Reagente 1 nelle provette del Reagente Sonda.
 2. Le reazioni di ibridazione e di selezione dipendono dal tempo. L'ibridazione deve durare come minimo 15 minuti e come massimo 20 minuti. Durante la selezione, mettere in incubazione le provette di Reagente Sonda per almeno 5 minuti senza però superare il tempo limite di 6 minuti.
- D. BAGNOMARIA: Il livello dell'acqua deve essere sufficientemente alto per far sì che la totalità del liquido di reazione delle provette di Reagente Sonda sia completamente sommerso.
- E. USO DEL VORTEX: È fondamentale disporre di una miscela omogenea durante la SELEZIONE, in modo particolare dopo l'aggiunta del reagente 3.
- F. SOLUZIONE DI EVENTUALE PROBLEMI
 1. Alti valori di controllo negativo (*S. epidermidis*, ATCC #14990) superiori a 20,000 RLU (Relative Light Units) sul LEADER o a 600 PLU (Photometric Light Units) sull' AccuLDR

(precedentemente PAL) possono essere riscontrati quando l'omogeneizzazione è stata insufficiente dopo l'aggiunta del Reagente 3 (Reagente di Selezione) o quando si è in presenza di vari tipi di colonie. Per verificare se si tratta di una colonia mista, è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agar e metterla a incubare.

2. Bassi valori di controllo positivo (*S. aureus*, ATCC #12600) inferiori a 50,000 RLU sul LEADER o a 1,500 PLU sull'AccuLDR (precedentemente PAL) possono essere rilevati quando il numero di germi è insufficiente o quando il test viene effettuato su colture miste o invecchiate. Per verificare se si tratta di una coltura mista, è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agar e metterla a incubare.

RISULTATI DEL TEST

A. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA UNA COLTURA vengono interpretati in base a un valore soglia. I campioni che originano un segnale luminoso di valore superiore o uguale a questa soglia vengono considerati positivi. I segnali luminosi inferiori a questa soglia sono considerati negativi. Quando il risultato si colloca nell'area d'incertezza, il test deve essere ripetuto.

	AccuLDR (precedentemente PAL)	LEADER
Valore limite	1.500 PLU	50.000 RLU
Area d'incertezza	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. CONTROLLO DI QUALITÀ E ACCETTABILITÀ DEI RISULTATI

I controlli negativi (ad. es., *S. epidermidis*, ATCC #14990) e positivi (ad es., *S. aureus*, ATCC #12600) devono soddisfare i seguenti valori:

	AccuLDR (precedentemente PAL)	LEADER
Controllo negativo	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Controllo positivo	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

LIMITI DEL TEST

Questo metodo è stato testato su colture fresche realizzate in terreni di coltura solidi e sui tipi di brodo di coltura menzionati nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.

L'efficacia di questo test eseguito direttamente sui campioni clinici non è stata valutata

I risultati del TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA UNA COLTURA devono essere interpretati in funzione degli altri dati di laboratorio e correlati ai dati clinici.

VALORI ATTESI

Il TEST ACCU_{PROBE} DI IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA UNA COLTURA è stato confrontato con le metodiche tradizionali di coltura con identificazione biochimica. Questo studio è stato eseguito su due centri clinici, utilizzando un totale di 641 ceppi, di cui 309 ceppi di *S. aureus*, 156 ceppi di altre 12 specie di *Staphylococcus* e 175 ceppi di microrganismi rappresentativi di 25 generi. Dei 309 ceppi di *S. aureus* analizzati, 40 erano resistenti alla meticillina.

Sono stati testati anche cinque ceppi di *Staphylococcus hyicus* e di *Staphylococcus intermedius* coagulasi-positivi, che hanno dato tutti esito negativo.

I metodi di identificazione impiegati comprendevano l'esame al microscopio dopo colorazione di Gram, l'osservazione della morfologia delle colonie, il test di coagulasi su vetrino o in provetta, mentre lo Staphaurex (Wellcome Diagnostics) è stato utilizzato solo al Centro 2. I campioni sono stati determinati o positivi ($\geq 50,000$ RLU) o negativi ($\leq 50,000$ RLU). Le colture negative hanno evidenziato risultati compresi tra 243 e 32,022 RLU mentre le colture positive hanno mostrato risultati compresi tra 138,228 e 821,826. Il raffronto di questi risultati con le metodiche tradizionali è riportato nella tabella che segue.

ACCU_{PROBE} / COLTURA

ACCU _{PROBE} COLTURA	Pos Pos	Pos NEG	NEG Pos	NEG NEG	Sensibilità/ Specificità	Tasso di Concordanza
CENTRO 1	202	0	0	221	100%/100%	100%

ACCU_{PROBE} / AGGLUTINAZIONE DEL LATTICE

ACCU _{PROBE} LAT. AGG.	Pos POS	Pos NEG	NEG POS	NEG NEG	Sensibilità/ Specificità	Tasso di Concordanza
CENTRO 2	107	0	1*	110	99%/100%	99.5%
CENTRO 2	107	0	0	111	100%/100%	100%

Dopo Analisi delle Discrepanze

*Il Centro 2 ha utilizzato lo Staphaurex (Wellcome Diagnostics) durante la prima identificazione dello *S. aureus*. Il presunto falso negativo è stato "reidentificato" mediante il test di coagulasi in provetta, che ha dato risultato negativo.

AccuPROBE / IDENTIFICAZIONE DI RIFERIMENTO

AccuPROBE Rif. I.D.	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilità/ Specificità	Tasso di Concordanza
Totale (del Centro 1 e del Centro 2)	309	0	0	332	100%/100%	100%

La tabella sopra riporta i valori di sensibilità, specificità e tasso di concordanza per Centro 1 e il Centro 2 dopo la "reidentificazione" di un ceppo mediante il test di coagulasi in provetta.

PERFORMANCE DEL TEST

A. PRECISIONE INTRA-TEST

La precisione intra-test del TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA UNA COLTURA è stata calcolata analizzando due diverse concentrazioni di RNA ribosomiale di *S. aureus*. Lo stesso campione è stato testato 10 volte in un'unica serie.

Campione	A	B
Numero di Prove	10	10
Risposta Media	103,813	71,408
Scarto Tipo	4,562	2,703
Coefficiente di Variazione	4.4%	3.8%

B. PRECISIONE TRA-TEST

La precisione tra-test è stata calcolata analizzando con la modalità della determinazione unica le due stesse concentrazioni di RNA ribosomiale di *S. aureus* in 12 serie diverse.

Campione	A	B
Numero di Prove	12	12
Risposta Media	101,064	70,622
Scarto Tipo	7,041	4,979
Coefficiente di Variazione	7.0%	7.1%

C. SPECIFICITÀ

Un totale di 88 colture ATCC è stato studiato mediante il TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA UNA COLTURA. Questi ceppi rappresentavano un totale di 72 specie provenienti da 50 generi. È stato testato un pannello filogenetico di 13 ceppi di *S. aureus*, 12 ceppi di altre 8 specie di *Staphylococcus* species e 63 ceppi di altri 49 generi. Unicamente i ceppi di *S. aureus* analizzati mediante il TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA UNA COLTURA hanno evidenziato un risultato positivo.

D. TEST DI SOVRACCARICO

Cinque serie di diluizioni di *S. aureus* (da 0 a 10 milioni di microrganismi) sono state testate in presenza di 30 milioni di microrganismi diversi dallo *S. aureus* (*Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*). Non è stata rilevata alcuna interferenza né reazione incrociata.



STAPHYLOCOCCUS AUREUS TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA (bioMérieux ref. 39203 / Gen-Probe Cat.No. 102875/2875)

UTILIZAÇÃO

O ACCUPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA é um teste de identificação rápida por sonda ADN de *Staphylococcus aureus* isolado de uma cultura. Este teste utiliza a técnica de hibridização dos ácidos nucleicos.

INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é responsável por uma grande variedade de infecções no homem, com manifestações cutâneas e nos tecidos moles. A furunculose e o impetigo bem como infecções mais graves, tais como a bacteriémia, a osteomielite, o abscesso renal, a pneumonia, a endocardite, a meningite, a gastroenterite, ou o choque tóxico (3) estão entre essas doenças. O *S. aureus* é actualmente um dos principais agentes das infecções nosocomiais. Além disso, o aparecimento de estirpes/cepas resistentes à meticilina (MRSA) constitui um grande problema epidemiológico.

O *S. aureus* é clinicamente a espécie mais importante do género *Staphylococcus*, tendo em conta a frequência e a gravidade das doenças pelas quais é responsável (6).

Os métodos clássicos de identificação de *Staphylococcus aureus* compreendem o exame após coloração de Gram, o estudo morfológico das colónias, a pesquisa de catalase e de coagulase, a produção de pigmento, o estudo da sensibilidade à lisostafina e à lisozima, e por fim a fermentação da glucose em anaerobiose (4). Para além destes, existem no mercado vários métodos de identificação bioquímica.

Das espécies de estafilococos patogénicos para o homem, o *S. aureus* é o único capaz de coagular o plasma (coagulase). Outras espécies, isoladas em animais, como o *S. intermedius* e o *S. hyicus*, também possuem esta propriedade. São utilizados dois testes de pesquisa da coagulase: um teste em tubo para evidenciar a coagulase livre e um teste em lâmina para a coagulase ligada. O teste em tubo é considerado o mais fiável, mas são necessárias várias horas, cerca de 24h, para obter um resultado. Quanto ao teste em lâmina, pode dar entre 10% e 15% de falsos-negativos (2).

A existência de estirpes/cepas que não podem ser identificadas pelos métodos clássicos, e de estirpes/cepas produtoras de coagulase no animal, faz com que seja necessário outro método de identificação rápido e preciso. Em estudos clínicos, o ACCUPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA identificou todas as estirpes/cepas resistentes à meticilina.

O AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA é um método rápido e objectivo permitindo a identificação definitiva do *S. aureus*, pela detecção de sequências de ARN ribossómico que lhe são específicas.

PRINCÍPIO

Os testes por hibridização de ácidos nucleicos baseiam-se na capacidade de cadeias complementares de ácidos nucleicos emparelharem de forma específica para formar complexos bicatenários estáveis (5). O método AccuPROBE utiliza uma sonda ADN monocatenária conjugada com um marcador quimiluminescente complementar de ARN ribossómico (ARNr) do organismo alvo. Quando o ARNr do organismo alvo é libertado, a sonda hibridiza com este para formar um complexo ADN-ARN estável. O reagente de Selecção permite diferenciar as sondas hibridizadas das não hibridizadas. O luminómetro GEN-PROBE mede o sinal luminoso emitido pelos híbridos ADN-ARN. O resultado é positivo se o luminómetro indicar um valor superior ou igual ao valor limiar; é negativo se indicar um valor inferior.

REAGENTES

Os reagentes utilizados para o AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA são fornecidos em três embalagens distintas:

AccuPROBE SONDA PARA STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Reagente Sonda (P) (4 x 5 tubos)
Staphylococcus aureus

AccuPROBE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURAS

Reagente 1 (Reagente de Lise) (1) 1 x 10 ml
Solução tampão contendo 0,04% de azida sódica

Reagente 2 (Tampão de Hibridização) (2) 1 x 10 ml
Solução tampão

Reagente 3 (Reagente de Selecção) (3) 1 x 60 ml
Solução tampão

REAGENTES DE DETECÇÃO GEN-PROBE

Reagente de Detecção I (RI) 1 x 240 ml
0,1% peróxido de hidrogéneo em 0,001 N ácido nítrico

Reagente de Detecção II (RII) 1 x 240 ml
1 N hidróxido de sódio

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

A. Unicamente para diagnóstico in vitro.

- B. Usar as precauções habituais quando efectuar este teste (1).
- C. Utilizar unicamente para a identificação de *Staphylococcus aureus* isolados de uma cultura.
- D. Utilizar unicamente o material fornecido ou material de utilização única.
- E. Os reagentes desta embalagem contêm azida sódica susceptível de reagir com as canalizações de chumbo ou de cobre formando azidas metálicas explosivas. Quando eliminar estes reagentes, é aconselhável diluir com bastante água para prevenir a formação de azidas nas canalizações.
- F. Evitar o contacto dos Reagentes de Detecção I e II com a pele, os olhos e com as mucosas. No caso de contacto, lavar com água. Se estes reagentes forem derramados, diluí-los com água antes de limpar.

CONSERVAÇÃO

Os tubos de Reagente Sonda devem ser conservados nas saquetas/sachets de alumínio a 2° - 8° C. Antes da abertura, permanecem estáveis até à data de validade indicada. Depois da abertura, a saqueta/sachet deve ser bem fechada e os tubos devem ser utilizados num prazo de dois meses, dentro do prazo de validade.

Os outros reagentes do ACCU_{PROBE} STAPHYLOCOCCUS AUREUS TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA podem ser conservados entre 2° e 25°C e permanecem estáveis até à data de validade.

NÃO CONGELAR OS REAGENTES

COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

O ACCU_{PROBE} STAPHYLOCOCCUS AUREUS TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi concebido para identificar *S. aureus* isolado de uma cultura.

- A. Identificação a partir de cultura em meio sólido. O teste pode ser efectuado com culturas realizadas em meio sólido apropriado. As amostras podem ser analisadas logo que as colónias sejam visíveis no prazo máximo de 48h.
 - 1. A amostra de cultura pode ser colhida/coletada com uma ansa de plástico descartável de 1µl, com uma ansa metálica ou uma agulha de plástico descartável. Não utilizar zaragatoa/swab uma vez que as colónias vão ser colocadas em suspensão numa quantidade mínima de líquido.
 - 2. É possível testar o conteúdo de uma ansa de 1 µl, ou várias colónias pequenas (3 ou 4), bem como uma única colónia de um diâmetro de pelo menos 1 mm.
 - 3. Evitar colher/coletar parte do meio sólido de cultura.
 - 4. O microbiologista pode decidir voltar a semear outro meio de cultura para confirmar a pureza da amostra isolada.
- B. Identificação a partir de caldo de cultura. O teste pode ser efectuado com caldos de cultura apropriados, como o caldo trypticase-soja ou o caldo coeur-cervelle, cuja turbidez deve ser equivalente a 1 McFarland. A incubação deve ser efectuada a 37°C durante o prazo máximo de 72 h.

Pipetar uma amostra de 50 µl de caldo de cultura correctamente homogeneizado para o tubo do Reagente de Lise seguindo as instruções do parágrafo C/ PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.

MATERIAL FORNECIDO

ACCU**PROBE** STAPHYLOCOCCUS AUREUS TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA
bioMérieux ref. 39203 / Gen-Probe Cat. No. 102875/2875

20 Testes

Reagente Sonda (P) 4 X 5 tubos

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

Ansas de 1 µl de plástico estéril, ansas metálicas ou agulhas de plástico para colheita/coleta das colónias.

Estirpes/cepas de controlo

Incubador ou banho-maria (36° ± 1°C)

Banho-maria ou bloco de aquecimento (60° ± 1°C)*

Micropipetas (50 µl, 300 µl)

Pipetas de repetição (50 µl, 300 µl)

Vortex

* Os orifícios do bloco de aquecimento devem estar adaptados a tubos de 12 x 75 mm. Aconselha-se a utilização dos blocos de aquecimento GEN-PROBE.

MATERIAL SUPLEMENTAR DISPONÍVEL NO SEU
DISTRIBUIDOR GEN-PROBE :

Luminómetro GEN-PROBE LEADER 50i

(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)

Bloco de aquecimento (60° ± 1°C)

(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)

ACCU**PROBE** REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA

(bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat.No. 102800/2800)

REAGENTES DE DETECÇÃO GEN-PROBE

(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791/1791)

PROCEDIMENTO

A. PREPARAÇÃO DO MATERIAL

1. Regular a incubadora ou o banho-maria a 36° ± 1°C.
2. Regular o banho-maria ou o bloco de aquecimento a 60° ± 1°C.
3. Preparar o luminómetro GEN-PROBE. Assegurar-se de que a quantidade de Reagentes de Detecção I e II é suficiente para efectuar todos os testes.

B. CONTROLOS

As estirpes/cepas de controlo positivo e negativo devem ser testadas por rotina em cada laboratório, em conformidade com a regulamentação em vigor. Pode utilizar-se uma cultura de *S. aureus* (ATCC 12600) como controlo positivo e uma cultura de *S. epidermidis* (ATCC 14990) como controlo negativo.

C. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

1. Cortar horizontalmente a parte superior das saquetas/sachets de alumínio. Retirar o número necessário de tubos de Reagente Sonda para analisar as amostras e/ou as estirpes/cepas de controlo. Fechar bem a saqueta/sachet dobrando várias vezes a sua extremidade e fixando-a com fita-cola ou com um clip. **Não retirar a saqueta/sachet que contém o dissecante.**
2. Identificar um número suficiente de tubos de Reagente Sonda para testar as amostras e/ou as estirpes/cepas de controlo. Tirar e conservar as tampas.
3. Pipetar 50 µl de Reagente 1 (Reagente de Lise) para os tubos de Reagente Sonda. Se o teste for efectuado com estirpes/cepas isoladas a partir de caldo de cultura, não adicionar Reagente 1 aos tubos de Reagente Sonda.
4. Transferir a amostra proveniente do meio sólido ou 50 µl do caldo de cultura correctamente homogeneizado para os tubos de Reagente Sonda, segundo as instruções descritas no parágrafo COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. Se o teste for efectuado com uma cultura em meio sólido, agitar a ansa ou agulha na solução para colocar as células em suspensão.
5. Fechar os tubos de Reagente Sonda e colocá-los em incubação durante 5 minutos a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em banho-maria ou durante 10 minutos no bloco de aquecimento.

D. HIBRIDIZAÇÃO

1. Retirar os tubos do Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento. Tirar e conservar as tampas. Pipetar 50 µl de Reagente 2 (Tampão de Hibridização) para cada tubo.
2. Fechar os tubos de Reagente Sonda e colocá-los em incubação durante 15 minutos a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em banho-maria ou bloco de aquecimento.

E. SELECÇÃO

1. Retirar os tubos de Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento. Tirar e conservar as tampas. Distribuir 300 µl de Reagente 3 (Reagente de Selecção) em cada tubo. Voltar a tapar os tubos e agitá-los num Vortex para obter uma mistura homogénea.
2. Incubar os Tubos de Reagente Sonda durante 5 minutos a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em banho-maria ou num bloco de aquecimento.
3. Retirar os tubos do banho-maria ou do bloco de aquecimento e deixá-los à temperatura ambiente durante, pelo menos, 5 minutos. Retirar e eliminar as tampas. **Ler os resultados no luminómetro durante a hora seguinte.**

F. DETECÇÃO

1. Seleccionar o protocolo apropriado no luminómetro.
2. Para retirar resíduos da superfície dos tubos, limpá-los com papel absorvente húmido. Em seguida, colocá-los no luminómetro e seguir as instruções.
3. Quando a análise tiver terminado, retirar os tubos do luminómetro.

NOTAS

- A. REAGENTES: O Reagente 2 (Tampão de Hibridização) pode precipitar. Aquecê-lo a 35° - 60°C e agité-lo para dissolver o precipitado.
- B. TEMPERATURA: A hibridização e a selecção são reacções termodependentes. Consequentemente, é imperativo manter o banho-maria ou o bloco de aquecimento à temperatura preconizada.
- C. DURAÇÃO DAS OPERAÇÕES:
 1. A reacção de hibridização deve ser iniciada na hora a seguir à introdução da amostra e do Reagente 1 nos tubos de Reagente Sonda.
 2. As reacções de Hibridização e de Selecção dependem do tempo. A hibridização deve durar, pelo menos, 15 minutos, mas não mais de 20 minutos. Durante a etapa de SELECÇÃO, incubar os tubos de Reagente Sonda durante, pelo menos, 5 minutos, mas não mais de 6 minutos.
- D. BANHO-MARIA: a água deve estar ao nível do anel de fecho dos tubos de Lise, não acima. Certificar-se de que a totalidade do líquido reaccional dos tubos de Reagente Sonda está bem imersa.
- E. UTILIZAÇÃO DO VORTEX: é essencial dispor de uma mistura homogénea durante a etapa de SELECÇÃO, especialmente após a adição do Reagente 3.
- F. RESOLUÇÃO DE INCIDENTES:
 1. Podem observar-se valores de controlo negativo elevados (*S. epidermidis*, ATCC 14990) superiores a 20,000 RLU (Relative Light Units) no LEADER ou 600 PLU (Photometric Light Units) no AccuLDR (anteriormente PAL) se a homogeneização tiver sido insuficiente depois da adição do Reagente 3 (Reagente de Selecção), ou se estiverem presentes diversos tipos de colónias. Para verificar se se trata de uma cultura mista, repicar uma parte num meio gelosado apropriado e incubar.
 2. Podem observar-se valores fracos de controlo positivo (*Streptococcus agalactiae*, ATCC #13813) inferiores a 50,000 RLU no LEADER ou 1,500 PLU no AccuLDR (anteriormente PAL) se o número de microrganismos for insuficiente ou se o teste tiver sido efectuado com culturas mistas ou antigas. Para verificar se se trata de uma cultura mista, repicar uma parte num meio gelosado apropriado e incubar.

RESULTADOS

A. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados do AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA são interpretados em função de um valor limiar. As amostras que emitam um sinal luminoso de valor superior ou igual a este limiar são consideradas positivas. Os sinais luminosos inferiores a este limiar são considerados negativos. Quando o resultado se situar na zona duvidosa, o teste deve ser repetido. Se a segunda análise der também um resultado equívoco, é necessário repicar a estirpe/cepa para verificar a sua pureza.

	AccuLDR (anteriormente PAL)	LEADER
Valor limiar	1.500 PLU	50.000 RLU
Zona duvidosa	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. CONTROLO DE QUALIDADE E VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

Os controlos negativos (por exemplo, *S. epidermidis*, ATCC 14990) e positivos (por exemplo, *S. aureus*, ATCC 12600) devem estar dentro dos seguintes valores:

	AccuLDR (anteriormente PAL)	LEADER
Controlo negativo	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Controlo positivo	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

Se os controlos não estiverem situados nestas zonas, os resultados do teste não devem ser considerados.

LIMITES DO TESTE

Este método foi testado com culturas frescas efectuadas em meios sólidos e com os tipos de caldos de cultura citados no parágrafo COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. O comportamento funcional deste teste praticado directamente com amostras clínicas não foi avaliado.

Os resultados do AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA devem ser interpretados conjuntamente com outros dados do laboratório e correlacionados com os dados clínicos.

VALORES ESPERADOS

O AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi comparado com métodos bioquímicos clássicos de identificação de cultura. Estes métodos foram efectuados em dois locais diferentes com um total de 641 estirpes/cepas, utilizando 309 estirpes/cepas de *S. aureus*, 156 estirpes/cepas de 12 outras espécies de *Staphylococcus*, e 175 estirpes/cepas de

microrganismos representando 25 géneros. 40 das 309 estirpes/cepas de *S. aureus* eram resistentes à meticilina.

5 estirpes/cepas de *Staphylococcus hyicus* e de *Staphylococcus intermedius*, coagulase-positivas, foram igualmente testadas e todas deram um resultado negativo.

Foi efectuada a identificação com cultura padrão (exame após coloração de Gram, estudo morfológico das colónias, pesquisa da coagulase em lâmina ou em tubo). O Staphaurex (Wellcome Diagnostics) foi unicamente utilizado no local 2. As amostras foram consideradas quer positivas (\geq a 50 000 RLU), quer negativas (\leq a 50.000 RLU). As observações mostraram que as culturas negativas tinham um valor compreendido entre 243 e 32.022 RLU e as culturas positivas entre 138.228 e 821.826 RLU. A comparação destes resultados com os métodos clássicos de identificação figura de seguida:

AccuPROBE / CULTURA

AccuPROBE CULTURA	Pos Pos	Pos Neg	NEG Pos	NEG Neg	SENSIBILIDADE/ ESPECIFICIDADE	TAXA DE CONCORDÂNCIA
Local 1	202	0	0	221	100%/100%	100%

AccuPROBE / AGLUTINAÇÃO DE LÁTEX

AccuPROBE LÁTEX	Pos Pos	Pos Neg	NEG Pos	NEG Neg	SENSIBILIDADE/ ESPECIFICIDADE	TAXA DE CONCORDÂNCIA
Local 2	107	0	1*	110	99,0%/100%	99,5%
Local 2	107	0	0	111	100%/100%	100%

após análise das discordâncias

* O local 2 utilizou o Staphaurex (Wellcome diagnostics) durante a primeira identificação. O presumível falso-negativo foi novamente identificado com o teste de coagulase em tubo, e deu um resultado negativo.

AccuPROBE / IDENTIFICAÇÃO DE REFERÊNCIA

AccuPROBE Ref.I.D.	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidade/ Especificidade	Taxa de Concordância
Total	309	0	0	332	100%/100%	100%

(Local 1 e local 2)

Este quadro mostra a especificidade, a sensibilidade, e a percentagem de concordância absolutas para os locais 1 e 2 após nova identificação de uma estirpe/cepa pelo teste de coagulase em tubo.

COMPORTAMENTO FUNCIONAL DO TESTE

A. PRECISÃO INTRA-ENSAIO

A precisão intra-ensaio do AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi calculada analisando duas concentrações diferentes de ARN ribossómico de *Staphylococcus aureus*. A mesma amostra foi testada 10 vezes numa mesma série.

Amostra	A	B
Número de ensaios	10	10
Resposta média (RLU)	103.813	71.408
Desvio-padrão	4.562	2.703
Coefficiente de variação	4,4%	3,8%

B. PRECISÃO INTER-ENSAIO

A precisão inter-ensaio foi calculada analisando duas concentrações diferentes de ARN ribossómico, 12 vezes numa mesma série.

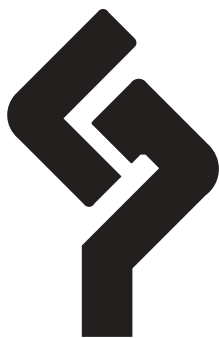
Amostra	A	B
Número de ensaios	12	12
Resposta média (RLU)	101.064	70.622
Desvio-padrão	7.041	4.979
Coefficiente de variação	7,0%	7,1%

C. ESPECIFICIDADE

Foram testadas 88 estirpes/cepas ATCC com o AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA. Estas estirpes/cepas compreendiam no total 72 espécies provenientes de 50 géneros diferentes. Foi testado um painel filogenético de 13 estirpes/cepas de *S. aureus*, 12 estirpes/cepas de 8 outras espécies de *Staphylococcus* e 63 estirpes/cepas de 49 outros géneros. Apenas as estirpes/cepas de *Staphylococcus aureus* deram um resultado positivo com o AccuPROBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA.

D. TESTE DE SOBRECARGA

Foram testadas 5 séries de diluições de *S. aureus* (de 0 a 10 milhões de microrganismos) na presença de 30 milhões de microrganismos de espécies diferentes de *S. aureus* (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*). Não foi observada nenhuma interferência nem reacção cruzada.



BIBLIOGRAPHY LITERATUR BIBLIOGRAPHIE BIBLIOGRAFIA

1. **Centers for Disease Control** 1988. U.S. Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **37**: 377-382; 387-388.
2. **Jorgenson, J. H., and W. E. Kloos** 1987. *Staphylococcal* infections In B. B. Wentworth (ed.) Diagnostic Procedures for Bacterial Infections; 7th ed. American Public Health Association. Washington D.C.
3. **Kloos, W. E., and K. H. Schleifer**: 1986. *Staphylococcus* p. 1013-1019 in Bergey's manual of systematic bacteriology.
4. **Kloos, W. E., and K. H. Schleifer**. 1975. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. J. Clin. Microbiology **1**: 82-88.
5. **Kohne, D. E., Steigerwalt, A. G. , and D. J. Brenner**, 1984. Nucleic acid probe specific for members of the genus *Legionella*, in *Legionella*: proceedings of the 2nd International Symposium, ed. C. Thornsberry, et al, American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp 107-108.
7. **Morse, S. I.** 1981. *Staphylococci* In A. Braude ed. Medical Microbiology and Infectious Diseases W.B. Saunders Company; Philadelphia, PA.



Gen-Probe Incorporated
San Diego, CA 92121 (USA)



Authorized Representative
EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH The Hague
The Netherlands

102944F-01 Rev. C 2011 - 03
©1990 - 2011 Gen-Probe Incorporated