

cobas® MRSA/SA Test

do użytku z systemem cobas® 4800

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*



cobas® 4800 System Sample Preparation Kit	240 Tests	P/N 05235782190
	960 Tests	P/N 05235804190
cobas® 4800 System Lysis Kit 1	240 Tests	P/N 06768253190
	960 Tests	P/N 06768270190
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit	240 Tests	P/N 05235863190
	960 Tests	P/N 05235871190
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1	20 Runs	P/N 06768318190
cobas® 4800 MRSA/SA Amplification/Detection Kit	80 Tests	P/N 06768113190
	240 Tests	P/N 06768172190
cobas® 4800 MRSA/SA Controls and Cofactor Kit	10 Runs	P/N 06768288190

SPIS TREŚCI

Zastosowanie

Podsumowanie i objaśnienie testu/zasady procedury

Informacje podstawowe: badanie przesiewowe pod kątem obecności szczepów MRSA i SA	4
Objaśnienie testu	5
Zasady procedury	5
Przygotowanie próbek	5
Amplifikacja w reakcji PCR i detekcja metodą TaqMan®	6
Amplifikacja wybiórcza	6

Materiały, odczynniki i próbki

Dostarczane materiały i odczynniki	7
Przechowywanie i użytkowanie odczynników	9
Wymagane materiały dodatkowe	15
Materiały opcjonalne	15
Urządzenia i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane	15

Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania

Ostrzeżenia i środki ostrożności	16
Dobra praktyka laboratoryjna	16
Zanieczyszczenie	17
Integralność	17
Utylizacja	17
Rozlanie płynów i czyszczenie	18
Pobieranie, transport i przechowywanie próbek	18
Pobieranie próbek	18
Przechowywanie i trwałość próbek podczas transportu	18

Instrukcja użytkowania

Wykonywanie oznaczenia	19
Przebieg pracy	19
Procedura testowa	19

Wyniki

Kontrola jakości i ważność wyników	24
Kontrola dodatnia	24
Kontrola ujemna	24
Kontrola wewnętrzna	24
Interpretacja wyników	24
Lista flag wyników	26

Posiew próbek klinicznych	27
Ograniczenia metody	27
Ocena skuteczności w badaniach nieklinicznych	
Czułość analityczna	29
Wykrywanie genotypów MRSA i SA	29
Reprezentatywność geograficzna	31
Precyzja	32
Inhibicja kompetycyjna	33
Swoistość analityczna	34
Substancje wpływające na wynik testu	37
Skuteczność w badaniach klinicznych z wykorzystaniem próbek klinicznych	38
Wyniki odtwarzalności MRSA	40
Wyniki odtwarzalności SA	42
Skuteczność kliniczna	44
Wyniki	44
Oczekiwane wartości	47
Dodatkowe informacje	
Najważniejsze cechy oznaczenia	49
Oznaczenia	50
Pomoc techniczna	51
Wytwórca i importer	51
Znaki towarowe i patenty	51
Prawo autorskie	51
Piśmiennictwo	52
Wersja dokumentu	53

Zastosowanie

Test **cobas**® MRSA/SA do stosowania z systemem **cobas**® 4800 to zautomatyzowany test PCR do szybkiej detekcji jakościowej w warunkach *in vitro* DNA metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA) oraz *Staphylococcus aureus* (SA) w wymazach z jamy nosowej w celu zapobiegania i zwalczania zakażeń MRSA i SA w ośrodkach służby zdrowia. Test **cobas**® MRSA/SA nie jest przeznaczony do diagnozowania, określania sposobu leczenia, monitorowania leczenia zakażeń MRSA i SA ani do dostarczania wyników dotyczących wrażliwości na metycylinę. Wynik ujemny nie wyklucza kolonizacji jamy nosowej przez szczepy MRSA/SA. Dodatkowe zakładanie hodowli jest konieczne, aby uzyskać mikroorganizmy do typowania epidemiologicznego lub dalszego badania wrażliwości.

Podsumowanie i objaśnienie testu/zasady procedury

Informacje podstawowe: badanie przesiewowe pod kątem obecności szczepów MRSA i SA

SA jest oportunistycznym patogenem przenoszonym jako mikroorganizm komensalny na skórze i w nozdrzach u około 30% zdrowych osób. Posiada zdolność wywoływania szerokiego spektrum chorób¹. SA potrafi szybko przystosowywać się do selektywnej antybiotykoterapii, co doprowadziło do powstania i rozprzestrzenienia szczepów opornych na metycylinę (MRSA). Oporność na metycylinę, poza innymi antybiotykami β -laktamowymi, jest warunkowana przez produkt genu *mecA*, który jest zlokalizowany na ruchomym elemencie genetycznym zwanym gronkowcową kasetą chromosomową *mec* (SCC*mec*). Gen *mecA* koduje zmienione białko wiążące penicylinę (PBP) 2a. Zapobiega to prawidłowemu wiązaniu antybiotyków β -laktamowych do białka PBP w ścianie komórkowej, co prowadziłoby do zakłócenia syntezy warstwy peptydoglikanu prowadzącego do śmierci komórki bakteryjnej. Zidentyfikowano wiele rodzajów kasety SCC*mec*². Pojawiło się wiele szczepów MRSA, które rozprzestrzeniły się na całym świecie, a kasetę SCC*mec* została pozyskana przez szczepy SA pochodzące z różnych rejonów².

Szczepy SA oraz MRSA stanowią główne źródło zakażeń szpitalnych i odpowiadają od wielu lat za wybuchy epidemii bakteryjnych w ośrodkach służby zdrowia na całym świecie^{3,4}. Zakażenia wywoływane przez szczepy SA i MRSA są olbrzymim obciążeniem dla systemów opieki zdrowotnej oraz pojedynczych szpitali i są związane z istotnymi kosztami funkcjonowania służby zdrowia⁵. W wytycznych i zaleceniach⁶, podobnie jak w standardowych procedurach szpitalnych, zaleca się aktywne badania przesiewowe oraz izolację i/lub dekolonizację pacjentów w celu kontroli rozprzestrzeniania się szczepów MRSA i SA⁷.

W sytuacjach wybuchu epidemii mogą zostać wdrożone dodatkowe środki, takie jak badania przesiewowe pacjentów ambulatoryjnych i pracowników ochrony zdrowia, a także zamknięcie oddziałów. Poza opublikowanymi wytycznymi standardowe procedury robocze dotyczące kontroli zakażeń mogą istotnie różnić się zarówno pomiędzy różnymi krajami, jak i szpitalami.

Czułość wykorzystywanych metod oraz czas do uzyskania wyniku wydają się być kluczowymi czynnikami odpowiedzialnymi za powodzenie strategii badań przesiewowych i leczenia⁸. Konwencjonalne metody oparte na hodowli wymagają kilku dni do uzyskania widocznego wyniku i nie pozwalają na szybkie wdrożenie swoistych metod kontroli zakażeń, natomiast wiążą się ze stosowaniem w przypadku wszystkich pacjentów bardziej ogólnych metod kontroli zakażeń. Tylko szybkie metody, takie jak techniki molekularne, umożliwiają wczesne wykrycie szczepów MRSA oraz SA u skolonizowanych pacjentów i wdrożenie odpowiednich barierowych środków ostrożności⁹. W wielu raportach wykazano wartość szybkich testów molekularnych we wczesnym wykrywaniu kolonizacji szczepami MRSA oraz SA¹⁰⁻¹³.

W teście **cobas**® MRSA/SA stosowane są próbki wymazów z jamy nosowej pobrane z użyciem zestawu do pobierania, transportowania i konserwowania próbek COPAN MSwab Collection, Transport and Preservation System. Probówki zawierające próbki pierwotne są umieszczane w systemie **cobas**® 4800 w celu przeprowadzenia zautomatyzowanego procesu obejmującego izolację kwasu nukleinowego oraz przygotowanie reakcji PCR. W przeprowadzanej w kolejnym etapie reakcji PCR w czasie rzeczywistym wykrywana jest w próbce obecność swoistej dla szczepów MRSA i SA docelowej sekwencji DNA. Test można przeprowadzić łącznie z testami **cobas**® Cdiff oraz **cobas**® HSV 1 i 2 w ramach połączenia różnych partii w tym samym przebiegu. W przypadku tych trzech testów wykorzystywany jest ten sam zautomatyzowany proces ekstrakcji próbki oraz profil reakcji PCR do amplifikacji i detekcji.

Objaśnienie testu

Test **cobas**® MRSA/SA obejmuje dwa główne procesy: (1) zautomatyzowane przygotowanie próbek w celu izolacji kwasów nukleinowych z próbek z jamy nosowej; (2) amplifikację docelowych sekwencji DNA w reakcji PCR z wykorzystaniem swoistych dla szczepów MRSA oraz SA primerów, a także detekcję w czasie rzeczywistym wyznakowanych fluorescencyjnie, rozszczepionych detekcyjnych sond oligonukleotydowych swoistych dla MRSA oraz SA. Przed rozpoczęciem zautomatyzowanego procesu przygotowania do wszystkich próbek dodawana jest kontrola wewnętrzna, zawierająca niepowiązaną, losową sekwencję DNA, poddawana amplifikacji i detekcji jednocześnie z każdą próbką w celu umożliwienia kontroli całego procesu.

Zasady procedury

Przygotowanie próbek

Przygotowanie próbek do testu **cobas**® MRSA/SA jest zautomatyzowane za pomocą aparatu **cobas**® x 480. Mikroorganizmy są poddawane lizie z użyciem czynnika chaotropowego, proteiny K oraz odczynnika SDS. Uwolnione kwasy nukleinowe, wraz z dodanym DNA stanowiącym kontrolę wewnętrzną, są wiązane z cząsteczkami magnetycznymi. Są one przepłukiwane, a następnie poddawane elucji w małej objętości buforu. Następnie aparat pobiera porcję materiału poddanego elucji i przygotowuje reakcję PCR z użyciem aktywowanego odczynnika Master Mix.

Amplifikacja w reakcji PCR i detekcja metodą TaqMan®


Etapy cykli reakcji PCR oraz detekcja docelowego sygnału zachodzą w analizatorze **cobas®** z 480. Odczynnik Master Mix zawiera pary primerów oraz sondy swoiste dla trzech elementów docelowych: prawego krańca połączenia kasety SCCmec swoistego dla szczepów MRSA, docelowej sekwencji genomowej dla wszystkich szczepów SA (w tym MRSA) oraz kontroli wewnętrznej. Jeśli docelowe sekwencje kwasu nukleinowego są obecne, dojdzie do amplifikacji z użyciem odpowiednich primerów oraz termostabilnej polimerazy DNA, co będzie skutkowało utworzeniem produktów reakcji PCR (amplikonu). Te produkty są wykrywane przez swoiste sondy TaqMan zawierające barwnik fluorescencyjny oraz wygaszacz. W stanie wyjściowym wygaszacz tłumi fluorescencję barwnika. Jednak w przypadku obecności produktu PCR sonda z nim hybrydyzuje i ulega rozszczepieniu na skutek działania polimerazy, która wykazuje aktywność nukleazy w kierunku od końca 5' do końca 3'. Ta reakcja umożliwi emisję fluorescencji z barwnika, a sygnał jest rejestrowany w czasie rzeczywistym w trakcie każdego cyklu reakcji PCR przez analizator **cobas®** z 480. Sygnał jest interpretowany przez oprogramowanie systemu **cobas®** 4800 i przedstawiany w postaci końcowych wyników.


Amplifikacja wybiórcza


Amplifikację wybiórczą badanego kwasu nukleinowego z próbki klinicznej przy użyciu testu **cobas®** MRSA/SA uzyskuje się dzięki zastosowaniu enzymu AmpErase (uracylo-N-glikozylaza) i trójfosforanu dezoksyurydyny (dUTP). Enzym AmpErase rozpoznaje i katalizuje niszczenie nici DNA zawierających dezoksyurydynę¹¹, lecz nie DNA zawierającego dezoksytymidynę. Dezoksyurydyny nie stwierdza się w występującym naturalnie DNA, natomiast jest ona zawsze obecna w amplikonie z uwagi na stosowanie trójfosforanu dezoksyurydyny zamiast trójfosforanu tymidyny jako jednego spośród dNTPs w odczynniku Master Mix; dlatego też jedynie amplikon zawiera dezoksyurydynę. Dezoksyurydyna powoduje wrażliwość zanieczyszczającego amplikonu na rozkład przez enzym AmpErase przed amplifikacją docelowego DNA. Zawarty w odczynniku Master Mix enzym AmpErase katalizuje rozszczepienie DNA zawierającego dezoksyurydynę w miejscu reszt dezoksyurydynowych przez otwarcie pierścienia dezoksyrybozy w pozycji C1. Podczas ogrzewania w pierwszym cyklu termicznym w pH zasadowym odczynnika Master Mix łańcuch amplikonu DNA pęka w pozycji dezoksyurydyny, w ten sposób wykluczając dalszą amplifikację DNA. Enzym AmpErase jest nieczynny w temperaturach powyżej 55°C, tj. w czasie trwania całego cyklu termicznego, dlatego też nie niszczy on amplikonu docelowego. Wykazano, że test **cobas®** MRSA/SA dezaktywuje na każdą reakcję PCR co najmniej 10³ kopie zawierającego dezoksyurydynę amplikonu MRSA/SA.


Materiały, odczynniki i próbki


Dostarczane materiały i odczynniki

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Zestaw do przygotowywania próbek w systemie cobas® 4800) 240 testów (P/N: 05235782190)	MGP (Szkłane cząstki o właściwościach magnetycznych systemu cobas® 4800) Szkłane cząstki o właściwościach magnetycznych Izopropanol 93%**	10 × 4,5 ml	 <p>NIEBEZPIECZEŃSTWO H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary. H319 Działa drażniąco na oczy. H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy. P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić. P233 Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty. P261 Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. P303 + P361 + P353 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą skażoną odzież. Splukać skórę pod strumieniem wody. P370 + P378 W przypadku pożaru: Użyć suchego piasku, proszku chemicznego lub środka pianotwórczego odpornego na działanie alkoholi do gaszenia. 67-63-0 Propan-2-ol</p>
	EB (Bufor do elucji systemu cobas® 4800) Bufor Tris 0,09% azydku sodu	10 × 18 ml	Nie dotyczy

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Zestaw do przygotowywania próbek w systemie cobas® 4800) 960 testów (P/N: 05235804190)	MGP (Szkłane cząstki o właściwościach magnetycznych systemu cobas® 4800) Szklane cząstki o właściwościach magnetycznych Izopropanol 93%**	10 × 13,5 ml	 <p>NIEBEZPIECZEŃSTWO H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary. H319 Działa drażniąco na oczy. H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy. P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić. P233 Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty. P261 Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. P303 + P361 + P353 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Natychmiast zdjęć całą skażoną odzież. Splukać skórę pod strumieniem wody. P370 + P378 W przypadku pożaru: Użyć suchego piasku, proszku chemicznego lub środka pianotwórczego odpornego na działanie alkoholi do gaszenia. 67-63-0 Propan-2-ol</p>
	EB (Bufor do elucji systemu cobas® 4800) Bufor Tris 0,09% azydku sodu	10 × 18 ml	Nie dotyczy

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 240 testów (P/N: 06768253190)	LYS-1 (Bufor do lizy 1 systemu cobas® 4800) Cytrynian sodu 5% polidokanol** 42,6% tiocyjanian guanidyny** Ditiotreitol**	10 × 10 ml	 <p>NIEBEZPIECZEŃSTWO</p> <p>H302: Działa szkodliwie po połknięciu. H314: Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu. H411: Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. EUH032: W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. EUH071: Działa żrąco na drogi oddechowe. P273: Unikać uwolnienia do środowiska. P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy/ochronę słuchu. P303 + P361 + P353: W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): natychmiast zdjąć całą skażoną odzież. Splukać skórę pod strumieniem wody. P304 + P340 + P310: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. P305 + P351 + P338 + P310: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. P391: Zebrać wyciek. 593-84-0 Tiocyjanian guanidyny 9002-92-0 Polidokanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimerkaptobutano-2,3-diol</p>

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 240 testów (P/N: 06768253190)	PK (Proteinaza K systemu cobas® 4800) Bufor Tris EDTA Chlorek wapnia Octan wapnia < 2,0% proteinazy K* Gliceryna	10 × 0,9 ml	 <p>NIEBEZPIECZEŃSTWO H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. H334: Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. P261: Unikać wdychania mgły lub par. P280: Stosować rękawice ochronne. P284: Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych. P304 + P340: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść uszkodzonego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P342 + P311: W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. 39450-01-6 Proteinaza serynowa, <i>Tritirachium album</i></p>
	SDS (Odczynnik SDS systemu cobas® 4800) Bufor Tris Dodecylosiarczanu sodu 0,09% azydku sodu	10 × 3 ml	Nie dotyczy

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
<p>cobas® 4800 System Lysis Kit 1 960 testów (P/N: 06768270190)</p>	<p>LYS-1 (Bufor do lizy 1 systemu cobas® 4800) Cytrynian sodu 5% polidokanol** 42,6% tiocyjanian guanidyny** Ditiotreitol**</p>	<p>10 × 36 ml</p>	 <p>NIEBEZPIECZEŃSTWO H302: Działa szkodliwie po połknięciu. H314: Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu. H411: Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. EUH032: W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. EUH071: Działa żrąco na drogi oddechowe. P273: Unikać uwolnienia do środowiska. P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy/ochronę słuchu. P303 + P361 + P353: W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): natychmiast zdjąć całą skażoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody. P304 + P340 + P310: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. P305 + P351 + P338 + P310: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. P391: Zebrać wyciek. 593-84-0 Tiocyjanian guanidyny 9002-92-0 Polidokanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimerkaptobutano-2,3-diol</p>

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 960 testów (P/N: 06768270190)	PK (Proteinaza K systemu cobas® 4800) Bufor Tris EDTA Chlorek wapnia Octan wapnia < 2,0% proteinazy K** Gliceryna	20 × 1,2 ml	<p>NIEBEZPIECZEŃSTWO H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. H334: Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. P261: Unikać wdychania mgły lub par. P280: Stosować rękawice ochronne. P284: Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych. P304 + P340: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P342 + P311: W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. 39450-01-6 Proteinaza serynowa, <i>Tritirachium album</i></p>
	SDS (Odczynnik SDS systemu cobas® 4800) Bufor Tris Dodecylosiarczanu sodu 0,09% azydku sodu	10 × 9 ml	Nie dotyczy
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 240 testów (P/N: 05235863190)	WB (Bufor płuczący systemu cobas® 4800) Cytrynian sodu dwuwodny 0,05% N-metyloizotiazolon HCl	10 × 55 ml	Nie dotyczy
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 960 testów (P/N: 05235871190)	WB (Bufor płuczący systemu cobas® 4800) Cytrynian sodu dwuwodny 0,05% N-metyloizotiazolon HCl	10 × 200 ml	Nie dotyczy
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 20 przebiegów (P/N: 06768318190)	IC-1 (cobas® 4800 IC-1) Bufor Tris EDTA < 0,01% poli-rA RNA (syntetycznego) 0,05% azydku sodu < 0,01% niezakaźnego, syntetycznego DNA do kontroli wewnętrznej, opłaszczonego białkiem kapsydowym bakteriofaga Lambda	20 × 0,5 ml	Nie dotyczy

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
cobas® 4800 MRSA/SA Amplification/Detection Kit 80 testów (P/N: 06768113190)	MRSA/SA MMX (Odczynnik Master Mix cobas® MRSA/SA) Bufor trycynowy EDTA Octan potasu Wodorotlenek potasu Tween 20 Glicerol 0,09% azydki sodu < 0,19% dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0,01% roztworu starterów sensownych i antysensownych dla MRSA, SA oraz kontroli wewnętrznej < 0,01% roztworu znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym sond MRSA, SA oraz kontroli wewnętrznej < 0,01% aptameru oligonukleotydowego < 0,01% polimeraza DNA Z05 (bakteryjnej) < 0,02% enzym AmpErase (uracylo-N- glikozylaza) (bakteryjny)	10 × 0,3 ml	Nie dotyczy
cobas® 4800 MRSA/SA Amplification/Detection Kit 240 testów (P/N: 06768172190)	MRSA/SA MMX (Odczynnik Master Mix cobas® MRSA/SA) Bufor trycynowy EDTA Octan potasu Wodorotlenek potasu Tween 20 Glicerol 0,09% azydki sodu < 0,19% dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0,01% roztworu starterów sensownych i antysensownych dla MRSA, SA oraz kontroli wewnętrznej < 0,01% roztworu znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym sond MRSA, SA oraz kontroli wewnętrznej < 0,01% aptameru oligonukleotydowego < 0,01% polimeraza DNA Z05 (bakteryjnej) < 0,02% enzym AmpErase (uracylo-N- glikozylaza) (bakteryjny)	10 × 0,7 ml	Nie dotyczy

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
cobas® 4800 MRSA/SA Controls and Cofactor Kit 10 przebiegów (P/N: 06768288190)	MRSA/SA (+) C (Kontrola dodatnia cobas® MRSA/SA) Bufor Tris EDTA < 0,01% poli-rA RNA (syntetycznego) 0,05% azydku sodu < 0,01% niezakaźnego plazmidu DNA (bakteryjnego) zawierającego sekwencję MRSA < 0,01% niezakaźnego plazmidu DNA (bakteryjnego) zawierającego sekwencję SA	10 × 0,5 ml	Nie dotyczy
	(-) C (Kontrola ujemna systemu cobas® 4800) Bufor Tris EDTA < 0,01% poli-rA RNA (syntetycznego) 0,05% azydku sodu	10 × 0,5 ml	Nie dotyczy
	Cofactor-1 (Kofaktor 1 systemu cobas® 4800) Octan manganu Octan magnezu 0,09% azydku sodu	10 × 1,7 ml	Nie dotyczy

* Oznakowanie bezpieczeństwa produktu jest zgodne przede wszystkim z wytycznymi GHS UE.

** Substancja niebezpieczna.

Przechowywanie i użytkowanie odczynników

Odczynnik	Temperatura przechowywania	Czas przechowywania
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Zestaw do przygotowywania próbek w systemie cobas® 4800)	2–8°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Zestaw do lizy 1 w systemie cobas® 4800)	2–8°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 (Zestaw kontroli wewnętrznej 1 systemu cobas® 4800)	2–8°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.
cobas® 4800 MRSA/SA Amplification/Detection Kit (Zestaw do amplifikacji/detekcji MRSA/SA w systemie cobas® 4800)	2–8°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.
cobas® 4800 MRSA/SA Controls and Cofactor Kit (Zestaw kontroli i kofaktora MRSA/SA systemu cobas® 4800)	2–8°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Zestaw buforu płuczającego do systemu cobas® 4800)	15–25°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.

Nie należy zamrażać odczynników.

Datę ważności odczynników określono w oparciu o skoordynowany czas uniwersalny (UTC). Lokalny czas ważności odczynników można określić, dodając lub odejmując maksymalnie 12 godzin w zależności od czasu miejscowego w odniesieniu do czasu UTC.

Wymagane materiały dodatkowe

Materiały	P/N
Końcówki CORE, 1000 µl, statyw zawierający 96 sztuk	04639642001
Pojemnik na odczynnik 50 ml	05232732001
Pojemnik na odczynnik 200 ml	05232759001
Płytki (głębokodołkowa) do ekstrakcji w systemie cobas® 4800	05232716001
Płytki AD 0,3 ml (z mikrodołkami) i folia uszczelniająca systemu cobas® 4800	05232724001
Aplikator folii uszczelniającej	04900383001
Nośnik 32-pozycyjny	04639529001
Worek na odpady stałe	05530873001 (mały) lub 04691989001 (duży)
Plastikowa zsuwnia Hamilton STAR	Roche 04639669001
MSwab Collection, Transport and Preservation System	07007248190 lub COPAN P/N 404C.R lub 404C
Rękawice jednorazowe bezpudrowe	Akceptowalne są jakiegokolwiek bezpudrowe rękawice jednorazowe.
Mieszadło wibracyjne (do mieszania jednej próbki)	Akceptowalne jest dowolne mieszadło wibracyjne.

W celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących materiałów sprzedawanych oddzielnie prosimy o kontakt z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche.

Materiały opcjonalne

Materiały	P/N
Maty zamykające lub pokrywa płytki głębokodołkowej	Roche 04789288001 lub Hamilton 6474-01
Korki, kolor biały (do ponownego zamykania przetworzonych próbek pierwotnych)	07033893001 lub COPAN 2U008N100.R lub 2U008N100

W celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących materiałów opcjonalnych prosimy o kontakt z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche.

Urządzenia i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane

Wymagane urządzenia i oprogramowanie, lecz niedostarczane
System cobas® 4800 Aparat cobas® x 480 Analizator cobas® z 480 Jednostka sterująca
Oprogramowanie cobas® MRSA/SA AP systemu cobas® 4800 w wersji 1.0.0 lub nowsze
Oprogramowanie aplikacyjne (podstawowe) systemu cobas® 4800 w wersji 2.2.0 lub nowsze

W celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących materiałów sprzedawanych oddzielnie prosimy o kontakt z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche.

Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Podobnie jak w przypadku każdej procedury testowej, dla prawidłowego przeprowadzenia badania kluczowe znaczenie ma zachowanie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej. Z uwagi na wysoką czułość analityczną niniejszego testu należy przedsięwziąć wyjątkową ostrożność, używając odczynników, próbek oraz mieszanin do amplifikacji, aby zapobiec zanieczyszczeniu.

- Do stosowania wyłącznie w diagnostyce *in vitro*.
- Należy unikać mikrobiologicznego i przez DNA zanieczyszczenia odczynników i próbek. Bakterie SA są przenoszone przez około 30% populacji i mogą bytować w nozdrzach lub na skórze. Należy zachować szczególną ostrożność podczas użytkowania próbek i odczynników w celu uniknięcia ich potencjalnego zanieczyszczenia bakteriami SA przez operatora.
- Karty charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) są dostępne na żądanie w miejscowym przedstawicielstwie firmy Roche.
- Odczynnik LYS-1 zawiera tiocyjanian guanidyny. Nie dopuścić do bezpośredniego kontaktu między tiocyjanianem guanidyny i podchlorynem sodu (wybielacz) ani innymi wysoce reaktywnymi odczynnikami, takimi jak kwasy lub zasady. Takie mieszaniny mogą wydzielać trujące gazy.
- Odczynnik MGP zawiera izopropanol i jest wysoce łatwopalny. Należy przechowywać go z dala od otwartego ognia i potencjalnych źródeł iskier.
- Odczynniki EB, MRSA/SA MMX, SDS, Cofactor-1, (-)C, MRSA/SA (+)C oraz IC-1 zawierają azydek sodu.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności oraz procedury mające na celu zredukowanie ryzyka zakażenia, dotyczące aparatu **cobas**® x 480 lub analizatora **cobas**® z 480 można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu **cobas**® 4800 System. W przypadku podejrzenia wystąpienia zanieczyszczenia należy przeprowadzić czyszczenie oraz konserwację tygodniową zgodnie z opisem zamieszczonym w podręczniku użytkownika systemu **cobas**® 4800 System.
- Należy poinformować lokalny właściwy organ oraz producenta o wszelkich poważnych zdarzeniach, które mogą wystąpić podczas stosowania tego testu.

Uwaga: Szczegółowe instrukcje zamieszczono w części „Pobieranie, transport i przechowywanie próbek”.

Dobra praktyka laboratoryjna

- Nie należy pipetować za pomocą ust.
- Nie wolno jeść, pić ani palić w obszarach roboczych laboratorium.
- Po zakończeniu pracy z próbkami i odczynnikami testowymi należy dokładnie umyć ręce.
- Podczas pracy z jakimikolwiek odczynnikami należy używać osłon na oczy oraz fartuchów laboratoryjnych i rękawic jednorazowych. Należy unikać kontaktu wymienionych materiałów ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, miejsce jego wystąpienia należy natychmiast spłukać dużą ilością wody. Jeżeli nie zostaną podjęte odpowiednie działania lecznicze, może dojść do oparzeń. W razie rozlania przed wytarciem należy rozcieńczyć wodą.

- Dokładnie oczyścić i odkazić wszystkie laboratoryjne powierzchnie robocze świeżo przygotowanym roztworem 0,5% podchlorynu sodu w wodzie destylowanej lub dejonizowanej (rozcieńczyć domowy wybielacz w stosunku 1:10). Następnie należy przetrzeć powierzchnię 70% etanolem.

Zanieczyszczenie

- W celu zapobieżenia zanieczyszczeniu konieczne jest noszenie rękawic i ich zmiana pomiędzy pracą z próbkami oraz odczynnikami testu **cobas**® MRSA/SA. Podczas pracy z próbkami i kontrolami należy unikać zanieczyszczenia rękawic. Podczas obchodzenia się z próbkami i zestawem odczynników należy nosić jednorazowe rękawice, fartuchy laboratoryjne oraz osłonę oczu.
- Należy unikać mikrobiologicznego i przez rybonukleazy zanieczyszczenia odczynników.
- Jeżeli w trakcie obchodzenia się z próbkami i ich przetwarzania nie jest możliwa odpowiednia kontrola przeniesienia między próbkami, może dojść do wystąpienia wyników fałszywie dodatnich.
- Z próbkami należy obchodzić się tak jak z materiałem zakaźnym, stosując laboratoryjne procedury bezpieczeństwa, takie jak określone w dokumentach: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ oraz CLSI Document M29-A4¹⁵.

Integralność

- Nie wolno używać zestawów po upływie daty ważności.
- Nie należy poddawać odczynników pulowaniu.
- Nie wolno używać przedmiotów jednorazowego użytku po upływie daty ważności.
- Nie należy używać odczynników ani pojemników, które są widocznie uszkodzone lub wykazują oznaki wycieku.
- Wszystkie przedmioty jednorazowego użytku są przeznaczone do jedнокrotnego użycia. Nie wykorzystywać ponownie.
- Całe wyposażenie powinno być odpowiednio konserwowane, zgodnie z instrukcjami producenta.

Utylizacja

- Odczynniki systemu **cobas**® 4800 oraz odczynniki swoiste dla testu **cobas**® MRSA/SA zawierają azydek sodu (patrz rozdział „**Ostrzeżenia i środki ostrożności**”). Azydek sodu może reagować z instalacjami wodno-kanalizacyjnymi wykonanymi z ołowiu lub miedzi, tworząc silnie wybuchowe azydki metali. Usuwając roztwory zawierające azydek sodu do zlewów laboratoryjnych, należy przepłukać rury dużą ilością zimnej wody, aby zapobiec nagromadzeniu azydków.
- Należy wyrzucić wszystkie nieużyte odczynniki, postępując zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi.

Uwaga: Informacje dotyczące usuwania odpadów płynnych zamieszczono w podręczniku użytkownika systemu cobas® 4800 System.

Rozlanie płynów i czyszczenie

- Odczynnik LYS-1 zawiera tiocyjanian guanidyny. Jeśli płyn zawierający tiocyjanian guanidyny ulegnie rozlaniu, do czyszczenia należy używać odpowiedniego detergentu laboratoryjnego i wody. Jeśli rozlany płyn zawiera potencjalne czynniki zakaźne, do czyszczenia należy **NAJPIERW** używać detergentu laboratoryjnego i wody, a następnie 0,5% roztworu podchlorynu sodu.
- Jeśli do rozlania płynu dojdzie na powierzchni aparatu **cobas**® 4800, należy postępować zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w Podręczniku użytkownika systemu **cobas**® 4800.
- Do czyszczenia aparatu **cobas**® x 480 lub analizatora **cobas**® z 480 nie wolno używać roztworu podchlorynu sodu (wybielacza). Czyszczenia aparatu **cobas**® x 480 lub analizatora **cobas**® z 480 należy dokonywać zgodnie z procedurami opisanymi w podręczniku użytkownika systemu **cobas**® 4800 System.

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

Uwaga: Ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się jak z materiałem potencjalnie zakaźnym.

Pobieranie próbek

Do wykorzystania w teście **cobas**® MRSA/SA zatwierdzono próbki wymazów z jamy nosowej pobrane za pomocą systemu MSwab Collection, Transport and Preservation System. Probki należy pobierać zgodnie z procedurą opisaną szczegółowo w rozdziale „Procedura pobierania próbek” oraz zgodnie ze standardowymi procedurami roboczymi danej placówki.

Przechowywanie i trwałość próbek podczas transportu

Probki wymazów z jamy nosowej pobrane z użyciem systemu MSwab Collection, Transport and Preservation System zachowują trwałość podczas transportu i przechowywania w temperaturze 2–30°C przez 4 dni lub w temperaturze 2–8°C przez 9 dni bądź zamrożone w temperaturze –20°C przez 30 dni przed przeprowadzeniem oznaczenia w systemie **cobas**® 4800 (wykazano to przez oznaczanie próbek po przechowywaniu kolejno w temp. 15 ±1°C i 31 ±1°C przez 4 dni, a następnie w temp. 2–8°C przez 5 dni i w temp. –20 ±5°C przez 30 dni).

Probki MRSA/SA muszą być transportowane zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi, dotyczącymi transportu czynników etiologicznych.

Instrukcja użytkowania

Wykonywanie oznaczenia

Przebieg pracy

Rysunek 1: Przebieg pracy z użyciem testu cobas® MRSA/SA

1	Uruchomienie systemu.
2	Wykonanie czynności konserwacyjnych w odniesieniu do aparatu.
3	Wyjęcie próbek i odczynników z miejsca przechowywania.
4	Rozpoczęcie przebiegu: <ul style="list-style-type: none"> Umieszczenie nośników z próbkami.
5	W przypadku korzystania z systemu LIS: potwierdzenie zlecenia pracy. W przypadku braku systemu LIS: utworzenie zlecenia pracy.
6	Umieszczenie materiałów eksploatacyjnych (płytki głębokodołkowej, płytki mikrodołkowej, statywów na końcówki) i odczynników.
7	Rozpoczęcie przebiegu przygotowania próbek.
8	Wyjęcie i uszczelnienie płytki mikrodołkowej.
9	Wyjęcie próbek, zużytych odczynników i płytki głębokodołkowej.
10	Umieszczenie płytki mikrodołkowej w analizatorze.
11	Przeanalizowanie wyników.
12	W przypadku korzystania z systemu LIS: przesłanie wyników do systemu LIS.
13	Wyjęcie płytki z analizatora.

Procedura testowa

Procedura pobierania próbek

- Należy korzystać z flokowanej wymazówki dostarczonej w zestawie do pobierania MSwab. Użyj suchej wymazówki lub wstępnie zwilżonej dwiema kroplami jałowego roztworu soli fizjologicznej.
- Ostrożnie umieść wymazówkę w nozdrzu pacjenta (końcówka wymazówki powinna zostać włożona na głębokość maksymalnie 2,5 cm od krawędzi nozdrza).
- Obróć 3-krotnie wymazówkę po błonie śluzowej wewnątrz nozdrza.
- Z użyciem tej samej wymazówki powtórz czynności z punktów 2 i 3 w drugim nozdrzu.
- Umieść wymazówkę w probówce transportowej. Dociśnij trzonek wymazówki do krawędzi próbki w celu jego złamania w wyznaczonym punkcie.
- Zamknij szczelnie korek, upewniając się, że górna końcówka trzonka wymazówki znajduje się w środku korka.
- Oznakuj próbkę i przetransportuj do laboratorium wykonującego oznaczenie zgodnie ze standardowymi procedurami roboczymi danej placówki (patrz rozdział „Przechowywanie i trwałość próbek podczas transportu”). W części „Przebieg pracy” zamieszczono uwagi dotyczące próbek.

Wszystkie odczynniki poza odczynnikiem MRSA/SA MMX i Cofactor-1 przed załadowaniem do aparatu **cobas**® x 480 muszą znajdować się w temperaturze pokojowej. Odczynniki MRSA/SA MMX i Cofactor-1 można umieszczać w aparacie bezpośrednio z temperatury przechowywania 2–8°C, ponieważ ich temperatura zostanie wyrównana do temperatury otoczenia wewnątrz aparatu **cobas**® x 480 podczas procesu przetwarzania.

Uwaga: Szczegółowe instrukcje obsługi można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu **cobas® 4800 System.**

Wielkość przebiegu

W systemie **cobas**® 4800 można prowadzić jednocześnie testy **cobas**® MRSA/SA, **cobas**® Cdiff oraz **cobas**® HSV 1 i 2 w ramach połączenia różnych partii w tym samym przebiegu. Ogólny zestaw do przygotowywania próbek w systemie **cobas**® 4800, ogólny zestaw do lizy 1 w systemie **cobas**® 4800 oraz ogólny zestaw buforu płuczającego do systemu **cobas**® 4800 są dostępne w dwóch wielkościach, z których każda wystarcza na 10 przebiegów zawierających do 24 lub 96 próbek włączając kontrole i próbki dla wszystkich oznaczeń do przeprowadzenia. Zestaw do amplifikacji/detekcji MRSA/SA w systemie **cobas**® 4800 jest dostępny w dwóch wielkościach, z których każda wystarcza do przeprowadzenia analizy maksymalnie 80 lub 240 próbek obejmujących kontrole MRSA/SA oraz próbki do oznaczenia. Zależnie od potrzeb w jednym przebiegu można wykorzystać kilka fiolek odczynnika **cobas**® 4800 MRSA/SA Master Mix pod warunkiem, że pochodzą one z zestawów o tym samym rozmiarze. Ogólny zestaw kontroli wewnętrznej 1 systemu **cobas**® 4800 oraz zestaw kontroli i kofaktora MRSA/SA systemu **cobas**® 4800 są dostępne w jednym rozmiarze zestawu, który wystarcza do wykonania odpowiednio 20 oraz 10 przebiegów i może zostać wykorzystany we wszystkich konfiguracjach przebiegu. Na każdy przebieg zawierający próbki MRSA/SA należy użyć jedną dodatnią kontrolę MRSA/SA systemu **cobas**® 4800 i jedną kontrolę ujemną systemu **cobas**® 4800 (patrz rozdział „Kontrola jakości”). W przypadku przebiegu z jednym testem maksymalna dopuszczalna liczba próbek to 94 próbki pacjentów i dwie kontrole.

Uwaga: Chociaż nie stanowi to optymalnego użycia odczynników, w przebiegu zawierającym 1–22 próbek można użyć odczynnika ogólnego zestawu 96 testów. Jednak nie można łączyć ze sobą różnych wielkości zestawu buforu płuczającego (WB) systemu **cobas® 4800, zestawu do przygotowywania próbek w systemie **cobas**® 4800 oraz zestawu do lizy 1 w systemie **cobas**® 4800. Przykładowo, jeśli na początku przebiegu skanowana jest butelka z odczynnikiem WB z zestawu 96 testów, należy użyć odczynników z pozostałych dwóch zestawów również o rozmiarze 96 testów.**

Uwaga: Chociaż nie stanowi to optymalnego użycia odczynników, w przebiegu zawierającym 1–6 próbek MRSA/SA można użyć odczynnika MMX zestawu 24 testów MRSA/SA w systemie **cobas® 4800. Szczegółowe informacje dotyczące sposobu zmiany wielkości zestawu, patrz podręcznik użytkownika systemu **cobas**® 4800 System.**

Przebieg pracy

Test **cobas**® MRSA/SA to oznaczenie prowadzone z wykorzystaniem przebiegu pracy Full Workflow w ramach oprogramowania **cobas**® 4800. Obejmuje on przygotowanie próbek w aparacie **cobas**® x 480 oraz amplifikację/detekcję w analizatorze **cobas**® z 480. Przebieg może obejmować tylko oznaczenie MRSA/SA lub dodatkowo testy **cobas**® Cdiff i/lub **cobas**® HSV 1 oraz 2 w ramach połączenia różnych partii. Szczegóły można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu **cobas**® 4800 System.

Próbki

- Uwaga:** Test cobas® MRSA/SA został zatwierdzony do stosowania wraz z systemem MSwab Collection, Transport and Preservation System. Nie należy korzystać z innych rodzajów wymazówek i podłoży.
- Uwaga:** Właściwie pobrana próbka wymazu z jamy nosowej powinna zawierać jedną wymazówkę FLOQ z trzonkiem unieruchomionym w korku. Przychodzące próbki niezawierające wymazówek lub z więcej niż jedną wymazówką nie zostały pobrane zgodnie z instrukcjami i nie powinny być badane.
- Uwaga:** Nie należy przetwarzać próbek wymazów z jamy nosowej, które zawierają widoczną krew lub mają ciemnobrązowy kolor.
- Uwaga:** Probki muszą znajdować się w pojemnikach na próbki pierwotne z odpowiednim kodem kreskowym umożliwiającym przetwarzanie w aparacie cobas® x 480. W celu uzyskania informacji na temat procedur właściwego kodowania kreskowego należy zapoznać się z podręcznikiem użytkownika systemu cobas® 4800 oraz listą kodów kreskowych dopuszczalnych dla systemu cobas® 4800.
- Uwaga:** W celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego zaleca się, aby próbki pierwotne były przetwarzane w systemie cobas® 4800 przed rozpoczęciem innych procedur obróbki i oznaczania.
- Uwaga:** Aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu przetworzonych próbek, do ponownego zamykania probówek po przetworzeniu należy używać dodatkowych korków do pojemników na próbki MSwab w innym kolorze (białym; patrz rozdział „Materiały opcjonalne”).
- Uwaga:** Probki wymazów z jamy nosowej pobrane do podłoża MSwab mają objętość wystarczającą do dwukrotnego przeprowadzenia oznaczenia w systemie cobas® 4800, a także mogą zostać wykorzystane do przeprowadzenia jakiegokolwiek koniecznej hodowli (patrz rozdział „Posiew próbek klinicznych”) pod warunkiem, że podczas obchodzenia się z próbką przed oznaczeniem nie doszło do jej rozlania. Instrukcje dotyczące inokulacji hodowli zamieszczono w ulotce dołączonej do opakowania systemu MSwab Collection, Transport and Preservation System. Minimalna objętość próbki do przeprowadzenia przebiegu cobas® MRSA/SA to 700 µl w pierwotnym pojemniku na próbkę MSwab.

Wykonywanie testu cobas® MRSA/SA

Uwaga: Możliwe jest przeprowadzenie testów cobas® MRSA/SA oraz cobas® Cdiff i/lub cobas® HSV 1 oraz 2 w ramach połączenia różnych partii w tym samym przebiegu. Dodatkowe informacje, patrz podręcznik użytkownika systemu cobas® 4800 System.

1. Uruchom system i wykonaj procedury konserwacyjne, postępując zgodnie z instrukcjami opisanymi w podręczniku użytkownika systemu cobas® 4800 System.
2. Zgromadź wszystkie wymagane odczynniki i materiały eksploatacyjne. W momencie rozpoczęcia przebiegu odczynniki, z wyjątkiem odczynników cobas® MRSA/SA MMX oraz Cofactor-1, muszą mieć temperaturę pokojową.

Uwaga: Wszystkie odczynniki i pojemniki na odczynniki są opatrzone kodem kreskowym i są przeznaczone do jednokrotnego użycia. Oprogramowanie cobas® 4800 śledzi użycie odczynników oraz pojemników na odczynniki i odrzuca wcześniej używane odczynniki lub pojemniki na odczynniki.

3. Sprawdź wygląd próbek wymazów z jamy nosowej pobranych do podłoża MSwab, aby upewnić się, że spełniają wymagania zamieszczone w części „**Próbki**”. Sprawdź, czy wszystkie korki są dokręcone. Wymieszaj próbki na mieszadle wibracyjnym przez co najmniej 10 sekund. Zdejmij korek z próbówki (górną część wymazówki powinna znajdować się w korku) i przetocz wymazówkę dookoła wewnętrznej ściany próbówki w celu odsączenia nadmiaru płynu. Wyrzuć korek z wymazówką tuż przed umieszczeniem próbówki w systemie **cobas**® 4800. Upewnij się, że wymazówka została wyjęta razem z korkiem. Pozostawienie wymazówki w fiolce z próbką spowoduje zakłócenie przebiegu testu **cobas**® MRSA/SA.
4. Rozpocznij nowy przebieg i zdefiniuj dla niego zlecenie pracy. Zlecenie pracy można utworzyć na trzy sposoby:
 - Korzystając z edytora próbki przed umieszczeniem statywu z próbkami w aparacie **cobas**® x 480 (przycisk „Editor” po prawej stronie menu głównego). Zlecenia pracy można zapisać, edytować i wczytać ponownie w razie potrzeby.
 - Przez skorzystanie z kreatora oprogramowania dla nowego przebiegu i umieszczenie próbek w aparacie **cobas**® x 480 po wyświetleniu takiego polecenia. Kody kreskowe próbek zostaną automatycznie zeskanowane i konieczne będzie zdefiniowane żądanych wyników dla każdej próbki.
 - Przez skorzystanie z systemu LIS placówki.

Dodatkowe szczegóły można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu **cobas**® 4800 System. Podczas dokonywania wyboru żądanego wyniku należy zaznaczyć tylko opcję „MRSA”, zarówno opcję „MRSA”, jak i „SA” lub tylko opcję „SA” w zależności od koniecznych do przeprowadzenia testów. Przykładowo po wybraniu wyłącznie opcji „SA” wyniki MRSA nie będą dostępne.

5. Umieść próbki i zdefiniuj/wybierz zlecenie pracy lub skorzystaj z systemu LIS, zależnie od tego co będzie właściwe. Domyślnie zaznaczona jest opcja „Unload sample carriers after transferring to deep well plate”. Umożliwia to operatorowi pozyskanie pozostałych próbek tak szybko jak to możliwe po pobraniu z nich porcji na potrzeby przetwarzania w aparacie **cobas**® x 480. Jeśli konieczne jest przechowywanie, pojemniki z próbkami należy zamknąć nowym korkiem (patrz rozdział „**Materiały opcjonalne**”).
6. Postępuj zgodnie ze wskazówkami kreatora oprogramowania i załaduj materiały eksploatacyjne. Nie należy umieszczać pojedynczych końcówek ani ich wyjmować z częściowo wykorzystanego statywu, gdyż oprogramowanie śledzi liczbę pozostałych końcówek. Jeśli liczba końcówek będzie niewystarczająca do przeprowadzenia przebiegu, oprogramowanie poinformuje o tym fakcie użytkownika.
7. Załaduj odczynniki do przygotowywania próbek do pojemników na odczynniki opatrzonych kodem kreskowym. Pojemniki na odczynniki są dostępne w dwóch rozmiarach: 200 ml i 50 ml. Postępuj zgodnie ze wskazówkami kreatora oprogramowania w celu wybrania pojemnika na odczynniki odpowiednich rozmiarów. Kody kreskowe pojemnika na odczynniki muszą znajdować się po prawej stronie nośnika. Załaduj odczynniki do przygotowywania próbek, stosując metodę „zeskanuj, zeskanuj, włóż, umieść”:
 - Zeskanuj kod kreskowy butelki odczynnika.
 - Zeskanuj kod kreskowy pojemnika na odczynniki.
 - Włóż odczynnik do pojemnika.
 - Umieść wypełniony pojemnik na odczynniki w przypisanej mu pozycji w nośniku na odczynniki.

Uwaga: System cobas® 4800 ma wewnętrzny zegar, kontrolujący czas, przez jaki odczynniki znajdują się w systemie. Od momentu zeskanowania WB jest 1 godzina do zakończenia procesu ładowania i kliknięcia przycisku „Start”. Na zakładce „Workplace” wyświetlany jest zegar odliczający czas. System nie zezwoli na rozpoczęcie przebiegu, jeżeli czas wyświetlany przez zegar aparatu upływał.

Uwaga: Aby zapewnić właściwe przeniesienie odczynnika MGP, zworteksuj lub energicznie wstrząśnij fiolkę odczynnika MGP niezwłocznie przed umieszczeniem jej w pojemniku na odczynniki.

8. Umieść odczynniki do amplifikacji/detekcji (MRSA/SA MMX oraz Cofactor-1), proteinazę K (PK) i kontrole [MRSA/SA (+) C, IC oraz (–) C] bezpośrednio w nośnikach na odczynniki. W celu zapobieżenia zanieczyszczeniu konieczna jest zmiana rękawiczek po pracy z kontrolami dodatnimi.

Uwaga: Kreator oprogramowania obliczy optymalną ilość i wielkość zestawu odczynnika MMX cobas® MRSA/SA do użycia. Zostanie to odzwierciedlone w kolumnie „Kit size” na ekranie umieszczania odczynników MMX i Cofactor. Aby użyć odczynnika MMX cobas® MRSA/SA z zestawu o innym rozmiarze, kliknij przycisk „Change kit size”.

9. Rozpocznij przygotowanie próbek, klikając przycisk „Start run”.

10. Po pomyślnym przebiegu przygotowania próbek przyciski „Sample Preparation results” oraz „Unload” staną się dostępne. W razie potrzeby wybierz przycisk „Sample Preparation results” w celu przeanalizowania wyników, a następnie wybierz przycisk „Unload”, aby wyładować nośnik na płytce. Można również wybrać przycisk „Unload” w celu wyładowania nośnika na płytce bez przeglądania wyników. Patrz podręcznik użytkownika systemu cobas® 4800 System.

11. Aby uszczelnić płytkę z mikrodołkami, przenieść płytkę do analizatora cobas® z 480 i rozpocząć cykl pracy amplifikacji i detekcji, postępuj zgodnie z instrukcją opisaną w podręczniku użytkownika systemu cobas® 4800.

Uwaga: System cobas® 4800 ma wewnętrzny zegar, kontrolujący czas, jaki upływa od momentu dodania przygotowanych próbek do aktywowanego odczynnika Master Mix. Amplifikację i detekcję należy rozpocząć jak najszybciej, jednak nie później niż 90 minut od zakończenia przebiegu w aparacie cobas® x 480. Na zakładce „Workplace” wyświetlany jest zegar odliczający czas. System przerwie przebieg, jeżeli ten czas zostanie przekroczony.

12. Po zakończeniu procesu amplifikacji i detekcji wyładuj płytkę mikrodołkową z analizatora cobas® z 480.

13. Aby przeglądać i akceptować poszczególne wyniki, postępuj zgodnie z instrukcją opisaną w podręczniku użytkownika systemu cobas® 4800.

Wyniki

Kontrola jakości i ważność wyników

Każdy przebieg obejmuje jeden zestaw kontroli dodatniej i ujemnej testu **cobas**® MRSA/SA. W przypadku każdego przebiegu, aby przez oprogramowanie **cobas**® 4800 zostały wyświetlone możliwe do zaraportowania wyniki testu **cobas**® MRSA/SA, muszą zostać uzyskane ważne wyniki zarówno dla kontroli dodatniej, jak i ujemnej.

Kontrola dodatnia

Kontrola dodatnia MRSA (+) zawiera niezakaźny DNA plazmidowy szczepów MRSA i *Staphylococcus aureus*. Użycie kontroli MRSA/SA (+) umożliwia monitorowanie etapów izolacji kwasu nukleinowego, amplifikacji i detekcji w danym przebiegu. Wynik kontroli MRSA/SA (+) musi być oznaczony jako „Valid”. Jeżeli wyniki kontroli MRSA/SA (+) są stale nieważne, skontaktuj się z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche w celu uzyskania pomocy technicznej.

Kontrola ujemna

Wynik kontroli (–) musi być oznaczony jako „Valid”. Jeżeli wyniki kontroli (–) są stale nieważne, skontaktuj się z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche w celu uzyskania pomocy technicznej.

Kontrola wewnętrzna

Kontrola wewnętrzna to cząsteczka faga lambda zawierająca sekwencje losowe oraz docelowe dla swoistych dla kontroli wewnętrznej primerów i sondy. Kontrola wewnętrzna jest dodawana do wszystkich próbek oraz kontroli dodatniej i ujemnej podczas przygotowywania próbek w aparacie **cobas**® x 480. Użycie kontroli wewnętrznej umożliwia monitorowanie etapów izolacji kwasu nukleinowego, amplifikacji i detekcji dla danej próbki. Kontrola wewnętrzna jest również wymagana do określania ważności kontroli danego przebiegu.

Interpretacja wyników

Uwaga: Cały proces walidacji testu i przebiegu jest realizowany przez oprogramowanie cobas® 4800.

Uwaga: Ważny przebieg może obejmować zarówno ważne, jak i nieważne wyniki próbek.

W przypadku ważnego przebiegu wyniki badania próbek interpretuje się w sposób, który przedstawia Tabela 1.

Tabela 1 Interpretacja wyników testu cobas® MRSA/SA

Test cobas® MRSA/SA	Raport wyniku i jego interpretacja
Żądany wynik „MRSA/SA”	
POS MRSA, POS SA	Wynik dodatni dla MRSA, wynik dodatni dla SA Wynik testu próbki na obecność szczepów MRSA i SA jest dodatni.
NEG MRSA, NEG SA	Wynik ujemny dla MRSA*, wynik ujemny dla SA* Szczep MRSA ani SA, jeśli jest obecny, nie mógł zostać wykryty.
NEG MRSA, POS SA	Wynik ujemny dla MRSA*, wynik dodatni dla SA Szczep MRSA, jeśli jest obecny, nie mógł zostać wykryty. Wynik badania próbki na obecność szczepów SA jest dodatni.
Invalid MRSA, POS SA	Wynik nieważny dla MRSA, wynik dodatni dla SA Wynik dla MRSA jest nieważny. W celu otrzymania ważnego wyniku MRSA ponownie przeprowadź oznaczenie oryginalnej próbki. Wynik badania próbki na obecność szczepów SA jest dodatni.
Invalid MRSA, NEG SA	Wynik nieważny dla MRSA, wynik ujemny dla SA* Wynik dla MRSA jest nieważny. W celu otrzymania ważnych wyników MRSA ponownie przeprowadź oznaczenie oryginalnej próbki. Szczep SA, jeśli jest obecny, mógł nie zostać wykryty.
NEG MRSA, Invalid SA	Wynik ujemny dla MRSA*, wynik nieważny dla SA Szczep MRSA, jeśli jest obecny, nie mógł zostać wykryty. Wynik dla SA jest nieważny. W celu otrzymania ważnego wyniku SA ponownie przeprowadź oznaczenie oryginalnej próbki.
Invalid MRSA, Invalid SA	Wynik nieważny dla MRSA, wynik nieważny dla SA Wyniki zarówno dla szczepów MRSA, jak i SA są nieważne. W celu otrzymania ważnych wyników MRSA i SA ponownie przeprowadź oznaczenie oryginalnej próbki.
Failed	Brak wyników dla próbki Instrukcje dotyczące przeglądania znaczników cyklu pracy i zalecanych czynności można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu cobas® 4800. Jeśli zostanie wykryty skrzep, a ilość pozostałej próbki jest wystarczająca, oryginalną próbkę należy wymieszać na mieszadle wibracyjnym przez co najmniej 10 sekund i oznaczyć ponownie w celu uzyskania ważnych wyników dla szczepów MRSA i SA.
Żądany wynik „MRSA”	
POS MRSA	Wynik dodatni dla MRSA Wynik badania próbki na obecność szczepów MRSA jest dodatni.
NEG MRSA	Wynik ujemny dla MRSA* Szczep MRSA, jeśli jest obecny, nie mógł zostać wykryty.
Invalid MRSA	Wynik nieważny dla MRSA Wynik dla MRSA jest nieważny. W celu otrzymania ważnego wyniku MRSA ponownie przeprowadź oznaczenie oryginalnej próbki.
Failed	Brak wyników dla próbki Instrukcje dotyczące przeglądania znaczników cyklu pracy i zalecanych czynności można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu cobas® 4800. Jeśli zostanie wykryty skrzep, a ilość pozostałej próbki jest wystarczająca, oryginalną próbkę należy wymieszać na mieszadle wibracyjnym przez co najmniej 10 sekund i oznaczyć ponownie w celu uzyskania ważnych wyników dla szczepów MRSA.

Tabela 1 Interpretacja wyników testu cobas® MRSA/SA (ciąg dalszy)

Test cobas® MRSA/SA	Raport wyniku i jego interpretacja
Żądany wynik „SA”	
POS SA	Wynik dodatni dla SA Wynik badania próbki na obecność szczepów SA jest dodatni.
NEG SA	Wynik ujemny dla SA* Szczep SA, jeśli jest obecny, mógł nie zostać wykryty.
Invalid SA	Wynik nieważny dla SA Wynik dla SA jest nieważny. W celu otrzymania ważnego wyniku SA ponownie przeprowadź oznaczenie oryginalnej próbki.
Failed	Brak wyników dla próbek Instrukcje dotyczące przeglądania znaczników cyklu pracy i zalecanych czynności można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu cobas® 4800. Jeśli zostanie wykryty skrzep, a ilość pozostałej próbki jest wystarczająca, oryginalną próbkę należy wymieszać na mieszadle wibracyjnym przez co najmniej 10 sekund i oznaczyć ponownie w celu uzyskania ważnych wyników dla szczepów SA.

* Wynik ujemny nie wyklucza obecności szczepów MRSA i/lub SA, ponieważ wyniki są zależne od odpowiedniego pobrania próbki, braku inhibitorów oraz obecności DNA w ilości umożliwiającej wykrycie.

Nieważne wyniki mogą zostać uzyskane, jeśli próbka zawiera substancje hamujące, które uniemożliwiają izolację docelowego kwasu nukleinowego i/lub amplifikację oraz detekcję. Znane substancje wpływające na wynik testu zamieszczono w rozdziale „Ograniczenia metody”.

Wyniki oznakowane jako „Failed” mogą zostać uzyskane, jeśli próbka zawiera skrzepy, które mogą zakłócać procedurę przygotowania próbki w aparacie cobas® 4800.

Lista flag wyników

Tabela poniżej wymienia flagi dotyczące interpretacji wyniku.

Tabela 2 Lista flag dla testów cobas® MRSA/SA

Test cobas® MRSA/SA	Test cobas® MRSA/SA	Raport wyniku i jego interpretacja
R20	Wynik dla kontroli dodatniej jest błędny.	Kontrola zewnętrzna jest nieważna. 1. Powtórz cały przebieg ze świeżymi odczynnikami. 2. Jeżeli problem powtarza się, skontaktuj się z serwisem firmy Roche.
R21	Wynik dla kontroli ujemnej jest błędny.	Kontrola zewnętrzna jest nieważna. 1. Powtórz cały przebieg ze świeżymi odczynnikami. 2. Jeżeli problem powtarza się, skontaktuj się z serwisem firmy Roche.
X3	Błąd: Wykryto skrzep. Próbka nie została przetworzona.	Upewnij się, że próbki obsługiwano zgodnie z opisem przebiegu pracy. 1. Sprawdź próbkę pod kątem skrzepów. 2. Ponownie oznacz próbkę.
X4	Błąd: Wystąpił błąd pipetowania. Próbka nie została przetworzona.	Najbardziej prawdopodobną przyczyną jest niewystarczająca objętość próbki lub błąd mechaniczny podczas pipetowania. 1. Upewnij się, że jest dostępna wystarczająca objętość próbki. 2. Sprawdź, czy płytka zrzucająca końcówkę jest umieszczona prawidłowo. 3. Ponownie oznacz próbkę.

Posiew próbek klinicznych

W celu wykonania badań dotyczących wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki lub typowania epidemiologicznego może zostać wykonany posiew próbek klinicznych z podłoża do pobierania. Instrukcje dotyczące wykonywania posiewu zamieszczono w ulotce dołączonej do opakowania systemu COPAN MSwab Collection, Transport and Preservation System.

Uwaga: Minimalna objętość próbki do przeprowadzenia pojedynczego testu cobas® MRSA/SA to 700 µl w pierwotnym pojemniku na próbkę MSwab. W celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego zaleca się, aby próbki pierwotne były przetwarzane w systemie cobas® 4800 przed pobraniem porcji do hodowli bakteryjnej. Jeśli pobranie porcji próbki do wykonania posiewu jest konieczne przed przeprowadzeniem testu cobas® MRSA/SA, należy upewnić się, że pozostała objętość próbki to co najmniej 700 µl, a podczas obchodzenia się z próbką zachować najwyższą ostrożność. Prowadzenie oznaczeń próbek z użyciem objętości mniejszej od 700 µl może spowodować uzyskanie fałszywie ujemnych wyników.

Ograniczenia metody

1. Test **cobas® MRSA/SA** został zatwierdzony wyłącznie do stosowania z wykorzystaniem próbek wymazu z jamy nosowej pobranych z użyciem systemu MSwab Collection, Transport and Preservation System.
2. Uzyskanie wiarygodnych wyników zależy od właściwego pobrania próbki, transportu, przechowywania oraz przetwarzania. Należy postępować zgodnie z procedurami opisanymi w niniejszej instrukcji (określanej również mianem ulotki dołączonej do opakowania), w ulotce dołączonej do opakowania systemu MSwab Collection, Transport and Preservation System oraz w podręczniku użytkownika systemu **cobas® 4800 System**.
3. Możliwość wykrycia szczepów MRSA i SA zależy od liczby mikroorganizmów znajdujących się w próbce i mogą na nią wpływać metody pobierania próbek, czynniki związane z pacjentem (tj. stadium kolonizacji, hospitalizacja w wywiadzie, schemat antybiotykoterapii, bliskość nosiciela MRSA) i/lub szczepy MRSA/SA.
4. Wyniki fałszywie ujemne lub nieważne mogą wynikać z wpływu różnych substancji. Do testu **cobas® MRSA/SA** dołączona jest kontrola wewnętrzna, aby pomóc w identyfikacji próbek zawierających substancje mogące zakłócać izolację kwasu nukleinowego i amplifikację w trakcie reakcji PCR. Niektóre czynniki wpływające na wyniki testu są następujące:
 - Próbki zawierające powyżej 75% (udział objętościowy) krwi w wymazie mogą dawać wyniki fałszywie ujemne. Nie należy oznaczać próbek o barwie ciemnoczerwonej lub brązowej.
 - Próbki zawierające powyżej 10% (udział wagowo-objętościowy) śluzu w wymazie mogą dawać wyniki fałszywie ujemne.
 - Próbki zawierające powyżej 15% (udział wagowo-objętościowy) żelu donosowego Rhinaris® w wymazie mogą dawać wyniki fałszywie ujemne.
 - Próbki zawierające powyżej 25% (udział objętościowy) produktu Releev w wymazie mogą dawać wyniki fałszywie ujemne.
5. Wynik dodatni wskazuje na obecność DNA szczepów MRSA, jednak niekoniecznie potwierdza występowanie żywych mikroorganizmów. Z tego powodu wynik dodatni niekoniecznie musi wskazywać na niepowodzenie leczenia zakażenia. Ujemny wynik po wcześniejszym wyniku dodatnim może wskazywać na skuteczność leczenia zakażenia lub może wynikać z okresowej kolonizacji.

6. Z użyciem testu **cobas**® MRSA/SA nie jest wykrywany bezpośrednio gen *mecA* ani kodowane przez ten gen białko wiążące penicylinę (PBP 2a). Wynik fałszywie dodatni testu na obecność szczepów MRSA może pojawić się w przypadku obecności „wariantu z pustą kasetą” bakterii *Staphylococcus aureus*.
7. Mutacje lub zmiany polimorficzne w obszarach wiązania primerów lub sond mogą wpływać na wykrywanie nowych lub nieznanymi wariantów, co może skutkować uzyskaniem fałszywie ujemnego wyniku testu **cobas**® MRSA/SA.
8. Wartość predykcyjna oznaczenia zależy do częstości występowania choroby w danej populacji.
9. Dodanie do odczynnika Master Mix **cobas**® 4800 MRSA/SA enzymu AmpErase umożliwia selektywną amplifikację docelowego DNA; jednak aby uniknąć zanieczyszczenia odczynników i mieszanin amplifikacyjnych, konieczne jest stosowanie dobrej praktyki laboratoryjnej i dokładne przestrzeganie procedur wyszczególnionych w niniejszej instrukcji.
10. Tego produktu mogą używać wyłącznie osoby przeszkolone w zakresie technik PCR i używania systemu **cobas**® 4800.
11. Zatwierdzono użycie tego produktu tylko z aparatem **cobas**® x 480 i analizatorem **cobas**® z 480. Z tym produktem nie można stosować żadnych innych urządzeń do przygotowania próbek ani systemów do PCR.
12. Z uwagi na różnice między technologiami zaleca się, aby przed zmianą stosowanych metod użytkownik przeprowadził w laboratorium badania korelacji stosowanych metod w celu określenia występujących między nimi różnic jakościowych. Ze względu na wspomniane wyżej różnice w technologiach, nie należy oczekiwać stuprocentowej zgodności między wynikami.
13. Zanieczyszczenie krzyżowe próbek może spowodować wyniki fałszywie dodatnie. Częstość zanieczyszczenia krzyżowego między próbkami testu **cobas**® MRSA/SA w systemie **cobas**® 4800 została określona w badaniach nieklinicznych na poziomie 0%. Nie zaobserwowano zanieczyszczenia krzyżowego pomiędzy przebiegami.

Ocena skuteczności w badaniach nieklinicznych

Czułość analityczna

Czułość analityczną (granice wykrywalności [ang. Limit of Detection, LoD]) dla testu **cobas**® MRSA/SA określono, prowadząc analizy ocenionych ilościowo izolatów hodowli szczepów MRSA i SA przy kilku poziomach z co najmniej 61 powtórzeniami na poziom. Próbkę testową zostały przygotowane przez dodanie hodowli na wymazówkę FLOQ, a następnie jej inkubację w matrycy symulującej środowisko wymazu z jamy nosowej. Składała się ona ze śluzu i komórek ludzkich imitujących oddziaływanie na test **cobas**® MRSA/SA tła w postaci klinicznej próbki z jamy nosowej. Wszystkie człony panelu przebadano z użyciem testu **cobas**® MRSA/SA, korzystając z trzech serii odczytników testu **cobas**® MRSA/SA. Granica wykrywalności (LoD) dla tego testu została określona jako docelowe stężenie, które może zostać wykryte jako dodatnie w $\geq 95\%$ testowanych powtórzeń na podstawie wyników uzyskanych z użyciem serii odczytników o najniższej wydajności.

Dwa izolaty szczepów MRSA i jeden izolat szczepów SA przebadano w badaniu czułości analitycznej. Wartości LoD dla testu **cobas**® MRSA/SA w przypadku tych izolatów zawiera Tabela 3.

Tabela 3 Granica wykrywalności (LoD) dla testu **cobas**® MRSA/SA

Organizm	Pochodzenie	Identyfikator pochodzenia	Typ RE	Typ SCCmec	Typ spa	PFGE	Wartość MIC	Badanych stężeń	LoD (CFU/wymaz)
MRSA	NARSA	NRS384	2	IVa	t008	USA300-0114	32	9	650
MRSA	ATCC	43300	2	II	t007	Sac-15	Nie dotyczy	8	700
SA	NARSA	NRS164	Nie dotyczy	Nie dotyczy	t084	Nie dotyczy	Nie dotyczy	8	700

Wykrywanie genotypów MRSA i SA

Granice wykrywalności testu **cobas**® MRSA/SA na 35 izolatach MRSA i pięciu izolatach SA odzwierciedlających często występujące genotypy (w tym typy RE 1, 2, 3, 4 i 6, MRSA SCCmec typy I, II, III, IV, V, VI oraz VIII i typy MRSA według elektroforezy żelowej w polu pulsacyjnym (ang. pulse-field gel electrophoresis, PFGE) typy USA 100 do 1000) zweryfikowano badając 40 powtórzeń na poziom przy kilku poziomach. Różnorodność genetyczna szczepów MRSA/SA tej kolekcji jest objęta przez różne typy SCCmec, typy MREJ oraz typy spa występujące w gatunkach *Staphylococcus aureus* na podstawie ich struktury filogenetycznej oraz reprezentatywne szczepy różnych typów PFGE. Rozcieńczenia i próbki testowe przygotowano w podobny sposób, jak w przypadku opisanego wcześniej badania granicy wykrywalności (LoD). Najniższy poziom, w przypadku którego odsetek trafień wynosił co najmniej 95%, zawiera Tabela 4 oraz Tabela 5. Wyniki pokazały, że test **cobas**® MRSA/SA prawidłowo wykrywa wszystkie 35 szczepów MRSA oraz pięć szczepów SA z granicą wykrywalności w zakresie od 175 do 750 CFU/wymaz. Wykrywane szczepy odzwierciedlające przynajmniej osiem typów SCCmec (I, II, III, IV, V, VI, VIII i nowe), 10 typów MREJ, 21 typów spa, dziewięć typów PFGE oraz wartości MIC cefoksyliny od 8 do ponad 32.

Tabela 4 Granica wykrywalności (LoD) dla testu cobas® MRSA/SA w przypadku genotypów MRSA

Nr izolatu MRSA	Typ RE	Typ SCCmec	Typ spa	Wartość MIC	Typ PFGE	LoD (CFU/wymaz)
1	11	nowy	t002	>32	Nieznany	485
2	6	II	t242	>32	Nieznany	720
3	9/11	nowy	t024	16	Nieznany	175
4	14	Nieznany	Nieznany	Nieznany	Nieznany	700
5	25	Nieznany	t003	>32	Nieznany	175
6	6	II	t216	>32	USA100	720
7	2	IV	t008	32	USA300	350
8	2	II	t037	32	USA200	700
9	2	IV	t1578	>32	USA300	700
10	2	II	t002	>32	USA100	720
11	2	IV	t008	16	USA800	750
12	2	IV	t008	32	USA300	266
13	2	IV	t064	32	USA500	260
14	2	IV	t148	32	USA700	700
15	2	IV	t688	32	USA800	271
16	2	IV	t688	>32	USA300	700
17	2	II	t042	32	USA100	463
18	2	II	t018	>32	USA200	350
19	2	IV	t008	32	USA300	410
20	2	IV	t008	32	USA300	175
21	2	IV	t5576	32	USA800	202
22	2	II	t004	32	USA600	350
23	2	IV	t216	32	USA1000	350
24	2	IV	t064	32	Iberyjski	175
25	2	II	t266	>32	USA600	700
26	2	IV	t008	32	USA300	700
27	2	IV	t008	32	USA300	350
28	2	IV	t002	>32	USA800	350
29	3	V	t242	32	USA1000	350
30	24	nowy	t476	8	Nieznany	350
31	1	I	t149	>32	Nieznany	175
32	3	VIII	Nieznany	16	Nieznany	700
33	4	IV	Nieznany	12	Nieznany	350
34	2	III	t030	>32	Nieznany	700
35	25	VI	Nieznany	Nieznany	Nieznany	175

Tabela 5 Granica wykrywalności (LoD) dla testu cobas® MRSA/SA w przypadku genotypów SA

Nr izolatu SA	Typ spa	LoD (CFU/wymaz)
1	t238	175
2	t018	175
3	t008	175
4	t002	175
5	t088	175

Reprezentatywność geograficzna

Oprócz 37 izolatów MRSA i sześciu izolatów SA uwzględnionych w przedstawionych powyżej badaniach czułości analitycznej oraz reprezentatywności genotypowej, przetestowano 281 izolatów MRSA oraz 85 izolatów SA pobranych z różnych lokalizacji geograficznych w stężeniach bliskich granicy wykrywalności testu cobas® MRSA/SA. Kolekcja 281 izolatów MRSA z 16 krajów zawierała izolaty MRSA o różnych typach SCCmec (I, II, III, IV, IVa, V, VI, VII i nowe), 71 typów spa oraz wartości MIC cefoksytyny od 6 do ponad 256. Kolekcja 85 izolatów SA z różnych geograficznie lokalizacji w obrębie USA zawierała izolaty SA o 75 różnych typach spa. Test cobas® MRSA/SA wykrywał wszystkie 85 izolatów SA. Spośród 281 izolatów MRSA wykryto 277. Cztery izolaty MRSA niewykryte przez test cobas® MRSA/SA zostały zsekwencjonowane i wyniki sugerowały, że regiony docelowe zawierały sekwencje nierozpoznawane przez primery i sondy testu cobas® MRSA/SA. Jednym z czterech izolatów był szczep mec ALGA251 (znany także jako mec C). Tabela 6 zawiera geograficzne źródła kolekcji izolatów szczepów MRSA.

Tabela 6 Reprezentatywność geograficzna testu cobas® MRSA/SA

Pochodzenie geograficzne	Całkowita liczba izolatów szczepów MRSA	Wykryte z użyciem testu cobas® MRSA/SA
Wielka Brytania	58	58
Niemcy	51	51
Dania	37	36
Francja	33	31
Stany Zjednoczone	20	20
Hiszpania	20	20
Szwajcaria	18	18
Japonia	15	15
Szwecja	7	7
Australia	6	5
Holandia	5	5
Włochy	4	4
Belgia	3	3
Szkocja	2	2
Irlandia	1	1
Norwegia	1	1
Razem	281	277

Precyzja

Wewnętrzne badanie precyzji zostało przeprowadzone z użyciem dwóch izolatów szczepów MRSA i jednego izolatu szczepu SA rozcieńczonych w matrycy symulującej warunki wymazu z jamy nosowej do stężeń poniżej granicy wykrywalności (LoD), w pobliżu wartości LoD oraz powyżej wartości LoD testu **cobas®** MRSA/SA. Przebadany został również poziom ujemny składający się wyłącznie z matrycy symulującej warunki wymazu z jamy nosowej. W badaniu wykorzystano trzy niepowtarzalne serie odczytników testu **cobas®** MRSA/SA oraz trzy aparaty, wykonując w sumie 36 przebiegów w ciągu 12 dni. Opis paneli precyzji oraz wydajność badania w postaci odsetka trafień zawiera Tabela 7. Analiza zmienności wartości Ct z testów wykonanych na członach panelu dodatniego powyżej wartości LoD (patrz Tabela 8 i Tabela 9) doprowadziła do uzyskania ogólnych zakresów wartości CV (%) wynoszących od 0,8% do 1,3% w przypadku wartości Ct dla szczepów MRSA oraz 1,2% w przypadku wartości Ct dla szczepów SA.

Tabela 7 Wewnętrzne badanie dokładności: analiza odsetka trafień

Człon panelu	Izolát	Docelowe stężenie	Liczba testowanych	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafień	95% CI	
						Dolny	Górny
1	NRS164 (SA)	< 1 x LoD	71	67	94,4%	86,2%	98,4%
2	NRS164 (SA)	~ 1 x LoD	72	72	100,0%	95,0%	100,0%
3	NRS164 (SA)	~ 3 x LoD	72	72	100,0%	95,0%	100,0%
4	NRS384 (MRSA)	< 1 x LoD	72	57	79,2%	68,0%	87,8%
5	NRS384 (MRSA)	~ 1 x LoD	72	72	100,0%	95,0%	100,0%
6	NRS384 (MRSA)	~ 3 x LoD	72	72	100,0%	95,0%	100,0%
7	ATCC43300 (MRSA)	< 1 x LoD	72	63	87,5%	77,6%	94,1%
8	ATCC43300 (MRSA)	~ 1 x LoD	72	72	100,0%	95,0%	100,0%
9	ATCC43300 (MRSA)	~ 3 x LoD	72	72	100,0%	95,0%	100,0%
10	Brak	Ujemne	72	0	0,0%	0,0%	5,0%

Tabela 8 Analiza elementów wariancji dla członów panelu precyzji powyżej poziomu LoD

Szczep	Średnia wartość Ct	Czynniki zmienności/procent udziału w wyniku całkowitym					Razem
		Seria	Wielkość zestawu	Aparat	Przebieg	Losowe	
NRS 164 (SA)	35,6	0,050	0,023	0,007	0,032	0,082	0,193
		25,9%	11,7%	3,6%	16,5%	42,3%	100,0%
NRS 384 (MRSA)	36,9	0,057	0,003	0,027	0,057	0,101	0,244
		23,2%	1,2%	11,1%	23,3%	41,2%	100,0%
ATCC 43300	38,0	0,003	0,024	0,007	0,010	0,037	0,082
		4,1%	29,6%	8,9%	12,5%	44,9%	100,0%

Tabela 9 Odchylenia standardowe oraz współczynniki zmienności (%) analizy dla członów panelu precyzji

Szczep	Średnia wartość Ct	Czynniki SD/CV (%)					Razem
		Seria	Wielkość zestawu	Aparat	Przebieg	Losowe	
NRS164 (SA)	35,6	0,224	0,150	0,084	0,178	0,286	0,440
		0,6%	0,4%	0,2%	0,5%	0,8%	1,2%
NRS 384 (MRSA)	36,9	0,238	0,054	0,165	0,239	0,317	0,494
		0,6%	0,1%	0,4%	0,6%	0,9%	1,3%
ATCC 43300	38,0	0,058	0,156	0,086	0,102	0,192	0,287
		0,2%	0,4%	0,2%	0,3%	0,5%	0,8%

Inhibicja kompetycyjna

Skonstruowano panele z użyciem dwóch izolatów szczepów MRSA jako docelowych typów przy 3-krotności granicy wykrywalności (LoD) testu **cobas®** MRSA/SA i kompetycyjnych izolatów bakterii *Staphylococcus aureus* oraz metycylinyopornych *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) w rosnących stężeniach. Rosnące stężenia szczepów SA i MRSE nie wpłynęły na detekcję docelowych typów MRSA/SA, co odzwierciedlają ich względnie stabilne wartości Ct (Tabela 10).

Tabela 10 Badania inhibicji kompetycyjnej szczepów MRSA przez szczepy SA (wartości Ct)

Mikroorganizm kompetycyjny (stężenie)	Docel. typ		
	MRSA 10364	MRSA 8065	SA 10851
<i>Staphylococcus aureus</i> 10851 (1 x docel. typ)	38,2	38,8	Nie dotyczy
<i>Staphylococcus aureus</i> 10851 (100 x docel. typ)	38,1	39,1	Nie dotyczy
<i>Staphylococcus aureus</i> 10851 (10000 x docel. typ)	38,4	38,8	Nie dotyczy
<i>Staphylococcus aureus</i> 10852 (1 x docel. typ)	38,1	39,0	Nie dotyczy
<i>Staphylococcus aureus</i> 10852 (100 x docel. typ)	38,5	39,3	Nie dotyczy
<i>Staphylococcus aureus</i> 10852 (10000 x docel. typ)	37,4	39,0	Nie dotyczy
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5649 (1 x docel. typ)	37,9	39,5	36,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5649 (100 x docel. typ)	38,6	38,6	36,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5649 (10000 x docel. typ)	38,1	39,7	37,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5657 (1 x docel. typ)	39,0	40,1	36,9
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5657 (100 x docel. typ)	38,4	39,1	36,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5657 (10000 x docel. typ)	38,3	39,7	36,7

Swoistość analityczna

W celu przeprowadzenia oceny swoistości analitycznej testu **cobas**® MRSA/SA wykonano testy z użyciem następujących paneli: 1) 92 bakterii, grzybów i wirusów, które mogą znajdować się w próbkach wymazów z jamy nosowej (Tabela 11); 2) komórki ludzkie (Tabela 11); 3) 43 gronkowców koagulazo-ujemnych *Staphylococcus* (CoNS) i koagulazo-ujemnych metycylinoopornych *Staphylococcus* (MR-CoNS) (Tabela 12); 4) 10 izolatów szczepów SA z graniczną opornością na metycylinę (BORSA) oraz dwa izolaty szczepów SA wyłącznie do badania swoistości szczepów MRSA (Tabela 13).

Wszystkie komórki bakteryjne i ludzkie dodano w ilości umożliwiającej uzyskanie stężenia co najmniej 1×10^6 j.*/ml z wyjątkiem bakterii *Chlamydia pneumoniae* i wszystkich wirusów, w przypadku których uzyskano wyższe stężenia dzięki odpowiednim kulturom podstawowym (1×10^5 jednostek*/ml z wyjątkiem adenowirusa 1 oraz wirusa grypy A/H1N1). Testy zostały przeprowadzone z użyciem samych mikroorganizmów lub przy obecności dwóch izolatów szczepów MRSA i jednego izolatu szczepów SA w stężeniu wynoszącym 3-krotność granicy wykrywalności (LoD) testu **cobas**® MRSA/SA. Wyniki wskazują, że żaden z tych mikroorganizmów nie zakłócał wykrywania docelowych typów MRSA i SA. W przypadku żadnego z nich nie uzyskano fałszywie pozytywnego wyniku przy braku docelowego typu MRSA/SA.

* Ilość wszystkich bakterii była określana jako liczba jednostek tworzących kolonię (ang. Colony Forming Units, CFU) z wyjątkiem bakterii *Chlamydia pneumoniae*, w przypadku której zastosowano określenie liczby kopii DNA. Ilość ludzkiego metapneumowirusa oznaczano ilościowo jako liczbę cząstek wirusowych. Adenowirus 1, 7 i 40, ludzki enterowirus, HSV1, wirus grypy A/H3N2A/Hong Kong/8/68, wirus odry, wirus świnki, wirus grypy rzekomej 1, wirus grypy rzekomej 2 oraz wirus grypy rzekomej 3, koronawirus 229E, koronawirus OC43, cytomegalowirus oraz rinowirus oznaczano ilościowo jako liczbę jednostek tworzących łyśinkę (PFU). Ilość wirusów RSV A oraz RSV B określono w jednostkach TCID₅₀. Ilość wirusa grypy A/H1N1 i B została określona w jednostkach EID₅₀. Ilość wirusa EBV została określona jako liczba kopii.

Tabela 11 Mikroorganizmy występujące powszechnie we florze jamy nosowej, przebadane pod kątem swoistości analitycznej

<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (wytwarzająca KPC), nr ATCC: 700603	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (wytwarzająca KPC), nr ATCC: BAA1900	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Streptococcus suis</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Leifsonia aquatica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Adenowirus 40</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Microbacterium testaceum</i>	<i>Koronawirus 229E</i>
<i>Chlamydia pneumoniae</i> *	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Koronawirus OC43</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Wirus cytomegalii</i>
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis avirulent</i>	<i>Wirus Epsteina-Barr</i>
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>HSV 1</i>
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>	<i>Ludzki adenowirus typu 1*</i>
<i>Corynebacterium flavescens</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Ludzki adenowirus typu 7A</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Ludzki enterowirus 71</i>
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>Pasteurella aerogenes</i>	<i>Ludzki metapneumowirus</i>
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>Planococcus maritimus</i>	<i>Wirus grypy typu A/H1N1</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Wirus grypy typu A/H3N2 A/ Hong Kong/8/68</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Wirus grypy, typ B</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Wirusy odry</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Wirus świnki</i>
<i>Enterococcus flavescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Wirus grypy rzekomej 1</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Wirus grypy rzekomej 2</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Rothia mucilaginosa</i>	<i>Wirus grypy rzekomej 3</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica subsp. Enterica</i>	<i>Rinowirus typu 1A</i>
<i>Fingoldia magna</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>RSV A</i>
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>RSV B</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Komórki HCT-15 (ludzki genomowy DNA)</i>

* *Chlamydia pneumoniae* badano przy $1,0 \times 10^5$ kopii/ml, a adenowirus typ 1 przy $1,0 \times 10^4$ PFU/ml.

Tabela 12 Blisko spokrewnione mikroorganizmy CoNS i MR-CoNS badane pod kątem swoistości

<i>Staphylococcus arlettae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC27676 (metycylinooporny)	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
<i>Staphylococcus auricularis</i> (metycylinooporny)	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>
<i>Staphylococcus caprae</i> (metycylinooporny)	<i>Staphylococcus felis</i>	<i>Staphylococcus pulvereri</i>
<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Staphylococcus carnosus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC29970	<i>Staphylococcus schleiferi</i>
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC29968 (metycylinooporny)	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC43252	<i>Staphylococcus simulans</i> ATCC27848 (metycylinooporny)
<i>Staphylococcus delphini</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> ATCC25615	<i>Staphylococcus simulans</i> ATCC11631
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC14990 (metycylinooporny)	<i>Staphylococcus hominis</i> ATCC35982	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC27836 (metycylinooporny)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC35547 (metycylinooporny)	<i>Staphylococcus hominis</i> ATCC27844	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC27839 (metycylinooporny)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC35983 (metycylinooporny)	<i>Staphylococcus hominis</i> ATCC27845	<i>Staphylococcus warneri</i> RMSCC1224
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC35984 (metycylinooporny)	<i>Staphylococcus intermedius</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC35663
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC51624 (metycylinooporny)	<i>Staphylococcus kloosii</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC29971
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC51625 (metycylinooporny)	<i>Staphylococcus lentus</i>	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC700583	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	-

Tabela 13 Izolaty SA oraz BORSA badane pod kątem swoistości MRSA

<i>Staphylococcus aureus</i> 10851	<i>Staphylococcus aureus</i> 10323 (BORSA)
<i>Staphylococcus aureus</i> 10852	<i>Staphylococcus aureus</i> 10324 (BORSA)
<i>Staphylococcus aureus</i> 10319 (BORSA)	<i>Staphylococcus aureus</i> 10325 (BORSA)
<i>Staphylococcus aureus</i> 10320 (BORSA)	<i>Staphylococcus aureus</i> 10326 (BORSA)
<i>Staphylococcus aureus</i> 10321 (BORSA)	<i>Staphylococcus aureus</i> 10327 (BORSA)
<i>Staphylococcus aureus</i> 10322 (BORSA)	<i>Staphylococcus aureus</i> 10328 (BORSA)

Substancje wpływające na wynik testu

Pod kątem potencjalnego wpływu na wyniki testu **cobas**® MRSA/SA przebadano 25 często stosowanych leków podawanych do jamy nosowej lub gardła, a także krew pełną i śluz. Wszystkie substancje przebadano przy stężeniach wyższych niż oczekiwane w przypadku ich pobierania na wymazówce wraz z próbką z jamy nosowej. Ilość substancji wpływającej na wynik testu jest wyrażana w postaci odsetka maksymalnej ilości, którą wymazówka może wchłonąć lub przenieść. Dwa izolaty szczepów MRSA i jeden izolat szczepów SA zostały dodane w ilości umożliwiającej uzyskanie 3-krotności granicy wykrywalności (LoD) testu **cobas**® MRSA/SA i wykorzystane jako typy docelowe w tych testach. W przypadku substancji egzogennych nie stwierdzono wpływu do 100% pojemności wymazu z wyjątkiem produktu Relenza® (brak wpływu do 6,25% pojemności wymazu), żelu donosowego Rhinaris® (brak wpływu do 15% pojemności wymazu) oraz produktu Releev (brak wpływu do 25% pojemności wymazu). Należy zauważyć, że produkt Relenza® został przebadany wyłącznie do 6,25% pojemności wymazu, gdyż odzwierciedla to już całkowitą ilość prawidłowej aplikacji leku zgodnie z informacjami dotyczącymi dawkowania. W przypadku krwi pełnej nie zaobserwowano wpływu do 75% pojemności wymazu, a w przypadku śluzu — do 10% pojemności wymazu. Podsumowanie tych wyników zawiera Tabela 14.

Tabela 14 Wyniki badania substancji wpływających na wynik testu

Substancja	Wyniki
Krew pełna	Brak wpływu do 75% pojemności wymazu
Śluz	Brak wpływu do 10% pojemności wymazu
Aerozol donosowy Afrin	Brak wpływu
Aerozol donosowy Beconase	Brak wpływu
Maść donosowa Bepanthen®	Brak wpływu
Pastyłki do ssania Chloraseptic Max Sore Throat	Brak wpływu
Aerozol donosowy zawierający propionian flutikazonu (50 mikrogramów)	Brak wpływu
FluMist® (Afluria, szczepionka przeciwko wirusowi grypy)	Brak wpływu
Roztwór donosowy flunizolidu USP; 0,025%	Brak wpływu
Maść zawierająca mupirocynę	Brak wpływu
Mgiełka donosowa Dristan™	Brak wpływu
Luffeel™	Brak wpływu
Aerozol donosowy zawierający acetonid triamcynolonu	Brak wpływu
Aerozol donosowy NasalCrom	Brak wpływu
Aerozol donosowy Nasonex	Brak wpływu
Neo-Synephrine	Brak wpływu
Aerozol donosowy Otrivine	Brak wpływu
Relenza®	Brak wpływu do 6,25% pojemności wymazu*
Zawiesina budesonidu do inhalacji 0,25 mg/2 ml	Brak wpływu
Roztwór donosowy chlorowodoru azelastyny	Brak wpływu
Roztwór donosowy soli fizjologicznej do nawilżania Equate	Brak wpływu
Żel donosowy Rhinaris®	Brak wpływu do 15% pojemności wymazu
Roztwór okulistyczny tobramycyny i deksametazonu	Brak wpływu
Releev (stosowany w przypadku opryszczki)	Brak wpływu do 25% pojemności wymazu
Żel donosowy Zicam	Brak wpływu
Aerozol do inhalacji QVAR (40 mikrogramów)	Brak wpływu
Nostrilla	Brak wpływu

* To stężenie odzwierciedla całkowitą ilość produktu Relenza® aplikowanego jednorazowo zgodnie z informacjami dotyczącymi dawkowania.

Skuteczność w badaniach klinicznych z wykorzystaniem próbek klinicznych

Skuteczność testu **cobas**® MRSA/SA porównano z zatwierdzonym przez FDA i posiadającym oznakowanie CE najnowocześniejszym testem referencyjnym NAT, z użyciem bezpośredniej/wzbogaconej hodowli bakteryjnej jako metody referencyjnej. Od każdego pacjenta zakwalifikowanego do udziału w badaniu pobrano dwie próbki wymazu z jamy nosowej. Próbki do testu **cobas**® MRSA/SA zostały pobrane z użyciem systemu MSwab Collection, Transport and Preservation System, natomiast próbki do testu referencyjnego pobrano z użyciem wymazówek Liquid Stuart. Próbki MSwab zostały wykorzystane do wykonania posiewu na jednej płytce dla każdego podłoża selektywnego i różnicującego podłoża chromogennego dla szczepów MRSA i SA (hodowla bezpośrednia), jak również przez noc w probówce zawierającej bulion sojowy Trypticase (TSB) wzbogacony 6,5% NaCl (hodowla wzbogacona). Następnie hodowla wzbogacona została przeniesiona na płytki z podłożem chromogennym. W przypadku płytek z koloniami zawierającymi przypuszczalnie szczepy SA przeprowadzono w celu potwierdzenia lateksowy test aglutynacji (Staphraurex®, Remel Microbiology Products, Thermo Scientific, Inc.). W przypadku kolonii zawierających przypuszczalnie szczepy MRSA przeprowadzono w celu potwierdzenia test dyfuzyjny z użyciem krążków nasyconych cefoksytiną.

Do udziału w badaniu zakwalifikowano 383 pacjentów z dwóch ośrodków w Unii Europejskiej. Czterech pacjentów wykluczono z powodu niepełnych wyników jednego z badań. W hodowli bezpośredniej/wzbogaconej stwierdzono 27 dodatnich próbek MRSA i 144 dodatnie próbki SA (częstość występowania: MRSA 7,1%, SA 38,0%). Dane dotyczące skuteczności testu **cobas**® MRSA/SA i referencyjnego testu NAT w przypadku hodowli bezpośredniej zawiera Tabela 15.

Tabela 15 Test **cobas**® MRSA/SA i test referencyjny Nucleic Acid Test (NAT) w przypadku hodowli bezpośredniej

MRSA		Hodowla bezpośrednia	
		Dodatni	Ujemny
cobas ® MRSA/SA	Dodatni	15	18
	Ujemny	1	345
	Wartość szacunkowa	95% CI LL	95% CI UL
Czułość	94%	70%	100%
Swoistość	95%	92%	97%

SA		Hodowla bezpośrednia	
		Dodatni	Ujemny
cobas ® MRSA/SA	Dodatni	121	29
	Ujemny	5	224
	Wartość szacunkowa	95% CI LL	95% CI UL
Czułość	96%	91%	99%
Swoistość	89%	84%	92%

MRSA		Hodowla bezpośrednia	
		Dodatni	Ujemny
Referencyjny test NAT	Dodatni	14	16
	Ujemny	2	347
	Wartość szacunkowa	95% CI LL	95% CI UL
Czułość	88%	62%	98%
Swoistość	96%	93%	97%

SA		Hodowla bezpośrednia	
		Dodatni	Ujemny
Referencyjny test NAT	Dodatni	122	31
	Ujemny	4	222
	Wartość szacunkowa	95% CI LL	95% CI UL
Czułość	97%	92%	99%
Swoistość	88%	83%	92%

Dane dotyczące skuteczności testu **cobas**® MRSA/SA i referencyjnego testu NAT w przypadku hodowli bezpośredniej/wzbogaconej zawiera Tabela 16. W tej analizie za wynik dodatni uznaje się wynik dodatni w hodowli bezpośredniej lub wzbogaconej. Wynik ujemny może być uzyskany jedynie w sytuacji stwierdzenia wyników ujemnych zarówno w hodowli bezpośredniej, jak i wzbogaconej.

Tabela 16 Test **cobas**® MRSA/SA i test referencyjny Nucleic Acid Test (NAT) w przypadku hodowli bezpośredniej/wzbogaconej

MRSA		Hodowla bezpośrednia/wzbogacona	
		Dodatni	Ujemny
cobas ® MRSA/SA	Dodatni	25	8
	Ujemny	2	344
	Wartość szacunkowa	95% CI LL	95% CI UL
Czułość	93%	76%	99%
Swoistość	98%	96%	99%

SA		Hodowla bezpośrednia/wzbogacona	
		Dodatni	Ujemny
cobas ® MRSA/SA	Dodatni	137	13
	Ujemny	7	222
	Wartość szacunkowa	95% CI LL	95% CI UL
Czułość	95%	90%	98%
Swoistość	94%	91%	97%

MRSA		Hodowla bezpośrednia/wzbogacona	
		Dodatni	Ujemny
Referencyjny test NAT	Dodatni	24	6
	Ujemny	3	346
	Wartość szacunkowa	95% CI LL	95% CI UL
Czułość	89%	71%	98%
Swoistość	98%	96%	99%
NPV	99%	98%	100%
PPV	80%	61%	92%

SA		Hodowla bezpośrednia/wzbogacona	
		Dodatni	Ujemny
Referencyjny test NAT	Dodatni	138	15
	Ujemny	6	220
	Wartość szacunkowa	95% CI LL	95% CI UL
Czułość	96%	91%	98%
Swoistość	94%	90%	96%
NPV	97%	94%	99%
PPV	90%	84%	94%

Natomiast dane dotyczące skuteczności testu **cobas**® MRSA/SA w porównaniu z zatwierdzonym przez FDA i posiadającym oznakowanie CE najnowocześniejszym testem referencyjnym NAT zawiera Tabela 17.

Tabela 17 Test cobas® MRSA/SA w porównaniu z testem referencyjnym Nucleic Acid Test (NAT)

MRSA		Referencyjny test NAT		SA		Referencyjny test NAT	
		Dodatni	Ujemny			Dodatni	Ujemny
cobas® MRSA/SA	Dodatni	28	5	cobas® MRSA/SA	Dodatni	144	6
	Ujemny	2	344		Ujemny	9	220
	Wartość szacunkowa	95% CI LL	95% CI UL		Wartość szacunkowa	95% CI LL	95% CI UL
Zgodność wyników dodatnich	93%	78%	99%	Zgodność wyników dodatnich	94%	89%	97%
Zgodność wyników ujemnych	99%	97%	100%	Zgodność wyników ujemnych	97%	94%	99%

Odtwarzalność

Odtwarzalność testu cobas® MRSA/SA w systemie cobas® 4800 ustalono w wieloośrodkowym badaniu z zastosowaniem spreparowanych próbek klinicznych ocenianych w odniesieniu do serii, ośrodka/aparata, operatora, dnia i przebiegu.

Panele testowe MRSA/SA do oceny odtwarzalności przygotowano poprzez posiew szczepów MRSA NRS384 (MRSA-384) oraz ATCC 43300 (MRSA-43300) lub szczepu SA RMSCC 10851 do matrycy spreparowanych próbek (symulowane kliniczne próbki MSwab pobierane z nosa, zawierające mucynę i ludzkie komórki nabłonka płaskiego) w jednym z trzech stężeń (Poniżej LoD, 1 × LoD oraz 3 × LoD). MRSA/SA-ujemny człon panelu został włączony do panelu jako kontrola. Podsumowując, w każdym panelu testowym było 10 członów, po 3 powtórzenia na każdy człon panelu w każdym przebiegu. Panele były testowane w 3 ośrodkach przez 2 operatorów na ośrodek, przy 1 przebiegu na operatora dziennie, przez 5 dni na serię, przy 2 seriach, co daje łącznie 1800 testów (180 testów na człon panelu lub 90 testów na człon panelu na serię). Łącznie wykonano 60 przebiegów i wszystkie z nich były ważne. Nie było testów zakończonych niepowodzeniem / nieważnych.

Wyniki odtwarzalności MRSA

Tabela 18 zawiera podsumowanie wyników odtwarzalności MRSA dla wartości Ct i zgodności procentowej (dwustronnego 95% dokładnego przedziału ufności) na ośrodek i człon panelu. Zgodność procentowa wyników dodatnich w przypadku MRSA-dodatnich członów panelu, „Poniżej LoD MRSA-384” i „Poniżej LoD MRSA-43300” wyniosła odpowiednio 85,6% (95% CI: od 79,6% do 90,3%) oraz 87,2% (95% CI: od 81,4% do 91,7%); zgodność procentowa wyników dodatnich w przypadku wszystkich pozostałych MRSA-dodatnich członów panelu wyniosła 100,0% (95% CI: od 98,0% do 100,0%). Całkowite OS oraz całkowity % CV wartości Ct wszystkich MRSA-dodatnich członów panelu wyniosły odpowiednio ≤ 0,51% i ≤ 1,4%.

Tabela 18 Podsumowanie wyników odtwarzalności MRSA — wartości Ct i zgodności procentowej według ośrodka i członów panelu

Człon panelu	Ważne wyniki testów (n)	Ct			Zgodność procentowa według ośrodka (n/N) ^a			Zgodność całkowita	
		Średnia	OS	CV (%)	1	2	3	Procent (n/N)	(95% CI) ^b
Ujemny	180	ND	ND	ND	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0% (180/180)	(98,0%, 100,0%)
Poniżej LoD MRSA-384	180	40,3	0,43	1,1	95,0 (57/60)	83,3 (50/60)	78,3 (47/60)	85,6% (154/180)	(79,6%, 90,3%)
1 × LoD MRSA-384	180	38,0	0,49	1,3	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0% (180/180)	(98,0%, 100,0%)
3 × LoD MRSA-384	180	36,3	0,44	1,2	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0% (180/180)	(98,0%, 100,0%)
Poniżej LoD MRSA-43300	180	40,4	0,40	1,0	91,7 (55/60)	81,7 (49/60)	88,3 (53/60)	87,2% (157/180)	(81,4%, 91,7%)
1 × LoD MRSA-43300	180	38,9	0,45	1,1	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0% (180/180)	(98,0%, 100,0%)
3 × LoD MRSA-43300	180	37,4	0,51	1,4	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0% (180/180)	(98,0%, 100,0%)

^a Dla ujemnych członów panelu, zgodność procentowa = (liczba wyników ujemnych ÷ całkowita liczba ważnych wyników) × 100;
dla dodatnich członów panelu, zgodność procentowa = (liczba wyników dodatnich ÷ całkowita liczba ważnych wyników) × 100.

^b 95% CI = dwustronny 95% przedział ufności na podstawie dokładnej metody dwumianowej.

CI = przedział ufności; Ct = wartość progowa cyklu; CV = współczynnik zmienności; LoD = granica wykrywalności; MRSA = gronkowiec złocisty oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus*; MRSA-384 = gronkowiec złocisty oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus*, szczep NRS384; MRSA-43300 = gronkowiec złocisty oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus*, szczep ATCC 43300; ND = nie dotyczy; SA = *Staphylococcus aureus*.

Tabela 19 przedstawia OS i CV (%) wartości Ct dla MRSA-dodatnich członów panelu ogółem i w odniesieniu do serii, ośrodka/aparata, operatora, dnia oraz w obrębie przebiegu.

Tabela 19 Łączne wartości średnie, odchylenia standardowe i współczynniki zmienności (%) dla wartości Ct na podstawie ważnych wyników w przypadku dodatnich członów panelu — MRSA

MRSA			Odchylenie standardowe i procentowy współczynnik zmienności											
			Seria		Ośrodek/Aparat		Operator		Dzień		W obrębie przebiegu		Ogółem	
Człon panelu	N	Średnia wartość Ct	OS	CV	OS	CV	OS	CV	OS	CV	OS	CV	OS	CV
Poniżej LoD MRSA-384	154	40,3	0,00	0,0%	0,06	0,2%	0,00	0,0%	0,23	0,6%	0,36	0,9%	0,43	1,1%
1 × LoD MRSA-384	180	38,0	0,07	0,2%	0,18	0,5%	0,00	0,0%	0,17	0,5%	0,41	1,1%	0,49	1,3%
3 × LoD MRSA-384	180	36,3	0,12	0,3%	0,20	0,6%	0,02	0,1%	0,15	0,4%	0,35	1,0%	0,44	1,2%
Poniżej LoD MRSA-43300	157	40,4	0,03	0,1%	0,07	0,2%	0,06	0,1%	0,02	0,0%	0,39	1,0%	0,40	1,0%
1 × LoD MRSA-43300	180	38,9	0,00	0,0%	0,11	0,3%	0,00	0,0%	0,19	0,5%	0,39	1,0%	0,45	1,1%
3 × LoD MRSA-43300	180	37,4	0,13	0,4%	0,24	0,6%	0,12	0,3%	0,10	0,3%	0,40	1,1%	0,51	1,4%

Ct = wartość progowa cyklu; CV = współczynnik zmienności; LoD = granica wykrywalności; MRSA = gronkowiec złocisty oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus*; MRSA-384 = gronkowiec złocisty oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus*, szczep NRS384; MRSA-43300 = gronkowiec złocisty oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus*, szczep ATCC 43300; OS = odchylenie standardowe.

Wyniki odtwarzalności SA

Tabela 20 przedstawia wyniki odtwarzalności SA dla wartości Ct i zgodności procentowej (dwustronnego 95% dokładnego przedziału ufności) na ośrodek i człon panelu. Zgodność procentowa wyników dodatnich dla SA-dodatnich członów panelu „Poniżej LoD SA”, „1 × LoD SA” i „3 × LoD SA” wyniosła odpowiednio 50,0% (95% CI: od 42,5% do 57,5%), 99,4% (95% CI: od 96,9% do 100,0%) oraz 100,0% (95% CI: od 98,0% do 100,0%). Całkowite OS oraz całkowity CV (%) wartości Ct wszystkich SA-dodatnich członów panelu wyniosły odpowiednio $\leq 0,49\%$ i $\leq 1,3\%$. Zgodność procentowa wyników ujemnych członów w przypadku MRSA/SA-ujemnych członów panelu wyniosła 100,0% (95% CI: od 98,0% do 100,0%).

Tabela 20 Podsumowanie wyników odtwarzalności SA — wartości Ct i zgodność procentowa według ośrodka i członu panelu

Człon panelu	Ważne wyniki testów (n)	Ct			Zgodność procentowa według ośrodka (n/N) ^a			Zgodność całkowita	
		Średnia	OS	CV (%)	1	2	3	Procent (n/N)	(95% CI) ^b
Ujemny	180	ND	ND	ND	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0% (180/180)	(98,0%, 100,0%)
Poniżej LoD SA	180	38,6	0,46	1,2	23,3 (14/60)	60,0 (36/60)	66,7 (40/60)	50,0% (90/180)	(42,5%, 57,5%)
1 × LoD SA	180	36,8	0,49	1,3	100,0 (60/60)	98,3 (59/60)	100,0 (60/60)	99,4% (179/180)	(96,9%, 100,0%)
3 × LoD SA	180	35,1	0,38	1,1	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0% (180/180)	(98,0%, 100,0%)

^a Dla ujemnych członów panelu, zgodność procentowa = (liczba wyników ujemnych ÷ całkowita liczba ważnych wyników) × 100;
dla dodatnich członów panelu, zgodność procentowa = (liczba wyników dodatnich ÷ całkowita liczba ważnych wyników) × 100.

^b 95% CI = dwustronny 95% przedział ufności na podstawie dokładnej metody dwumianowej.

CI = przedział ufności; Ct = wartość progowa cyklu; CV = współczynnik zmienności; LoD = granica wykrywalności; ND = nie dotyczy; SA = *Staphylococcus aureus*.

Tabela 21 przedstawia OS i CV (%) wartości Ct dla SA-dodatnich członów panelu ogółem i w odniesieniu do serii, ośrodka/aparata, operatora, dnia oraz w obrębie przebiegu.

Tabela 21 Łączne wartości średnie, odchylenia standardowe i współczynniki zmienności (%) dla wartości Ct na podstawie ważnych wyników w przypadku dodatnich członów panelu — SA

SA			Odchylenie standardowe i procentowy współczynnik zmienności											
			Seria		Ośrodek/Aparat		Operator		Dzień		W obrębie przebiegu		Ogółem	
Człon panelu	N	Średnia wartość Ct	OS	CV	OS	CV	OS	CV	OS	CV	OS	CV	OS	CV
Poniżej LoD SA	90	38,6	0,00	0,0%	0,00	0,0%	0,00	0,0%	0,00	0,0%	0,46	1,2%	0,46	1,2%
1 × LoD SA	179	36,8	0,14	0,4%	0,29	0,8%	0,13	0,3%	0,16	0,4%	0,31	0,8%	0,49	1,3%
3 × LoD SA	180	35,1	0,11	0,3%	0,14	0,4%	0,12	0,3%	0,02	0,1%	0,31	0,9%	0,38	1,1%

Ct = wartość progowa cyklu; CV = współczynnik zmienności; LoD = granica wykrywalności; SA = *Staphylococcus aureus*;
OS = odchylenie standardowe.

Skuteczność kliniczna

Skuteczność kliniczną testu **cobas**® MRSA/SA określono w zatwierdzonym przez komisję bioetyczną, prospektywnym, wielośrodkowym badaniu mającym na celu porównanie wyników bezpośredniej hodowli chromogenicznej oraz bezpośredniej hodowli chromogenicznej połączonej z hodowlą wzbogaconą przy użyciu wymazów z nosa od kwalifikujących się do badania kobiet i mężczyzn.

Próbki pobrano w sześciu zróżnicowanych geograficznie ośrodkach na terenie całych Stanów Zjednoczonych. Od każdego uczestnika badania zostały pobrane jedna lub dwie próbki wymazów; jeden wymaz został pobrany do badań zgodnych ze standardem opieki (jeśli dotyczy), a kolejny — z użyciem systemu MSwab (Copan Flock Technologies Srl., Brescia, Włochy) został pobrany do testu **cobas**® MRSA/SA oraz do hodowli bezpośredniej i wzbogaconej.

Test **cobas**® MRSA/SA wykonano w trzech ośrodkach, a hodowlę bezpośrednią i wzbogaconą przeprowadzono w laboratorium referencyjnym, które specjalizuje się w hodowli i detekcji molekularnej MRSA opornego na metycylinę i SA. W skrócie, 100 µl alikwotu próbki pobranej za pomocą systemu MSwab od każdego uczestnika przeniesiono bezpośrednio na jedną płytkę każdego selektywnego i różnicującego podłoża chromogenego dla szczepów MRSA i SA (hodowla bezpośrednia) oraz do próbówki zawierającej bulion tryptonowo-sojowy (TSB) z 6,5% NaCl (hodowla wzbogacona). Podejrzewane izolaty i dodatnie hodowle w bulionie wzbogaconym pasażowano na agar z krwią owczą 5%, a następnie izolaty identyfikowano jako SA za pomocą barwienia metodą Grama i aglutynacji lateksowej. Domniemane szczepy MRSA potwierdzono, stosując metodę Kirby'ego-Bauera — dyfuzyjny test z użyciem krążków nasyconych cefoksytiną do stwierdzenia oporności na metycylinę.

Próbka z dodatnim wynikiem hodowli MRSA/SA została sklasyfikowana jako dodatnia pod kątem MRSA/SA za pomocą metody hodowli bezpośredniej lub wzbogaconej. Próbka z ujemnym wynikiem hodowli MRSA/SA została sklasyfikowana jako ujemna pod kątem MRSA/SA za pomocą obu metod: hodowli bezpośredniej i wzbogaconej.

Analizę rozbieżności przeprowadzano w przypadku wszystkich próbek o niezgodnych wynikach oraz losowo wybranym podzbiornym próbek o wynikach zgodnych dołączonych jako kontrole między testem **cobas**® MRSA/SA a łączoną metodą hodowli bezpośredniej i wzbogaconej za pomocą drugiego, zatwierdzonego przez FDA testu opartego na metodzie amplifikacji kwasu nukleinowego (NAAT) oraz metody nieselektywnej hodowli bezpośredniej i wzbogaconej. W skrócie, 100 µl alikwotu z pozostałości (resztki) próbki pobranej za pomocą systemu MSwab przeniesiono na płytkę z agarem czekoladowym (nieselektywna hodowla bezpośrednia), a kolejne 100 µL alikwotu przeniesiono do bulionu TSB bez NaCl (nieselektywna hodowla wzbogacona). Izolaty uzyskane w nieselektywnej hodowli bezpośredniej i wzbogaconej zostały scharakteryzowane jak opisano; dodatkowo potwierdzono identyfikację podejrzewanych atypowych izolatów z zastosowaniem opracowanego w laboratorium testu PCR do wykrywania genów *femA* oraz *mecA* zgodnie z przyjętą praktyką laboratorium referencyjnego.

Wyniki

Próbki pobrano od 2528 uczestników, uzyskując 2504 (99,1%) kwalifikujące się do oceny wyniki od 1372 mężczyzn (54,8%) i 1132 (45,2%) kobiet. Większość uczestników była w wieku > 50 lat (67,2%), a wiek tych osób mieścił się w przedziale od 18 do 101 (mediana wieku = 57). Całkowita liczba próbek MRSA-dodatnich wyniosła 160, a SA-dodatnich — 660.

Porównanie skuteczności testu cobas® MRSA/SA z łączoną metodą hodowli bezpośredniej i wzbogaconej (metoda referencyjna)

Skuteczność testu cobas® MRSA/SA w porównaniu z łączoną metodą hodowli bezpośredniej i wzbogaconej określono na podstawie 2500 kwalifikujących się do oceny wyników w przypadku MRSA oraz 2501 kwalifikujących się do oceny wyników w przypadku SA, co ukazuje Tabela 22.

Czułość i swoistość testu pod kątem MRSA w porównaniu z łączoną metodą hodowli bezpośredniej i wzbogaconej wyniosły odpowiednio 93,1% (149/160) i 97,5% (2281/2340), a częstość występowania, PPV i NPV wyniosły odpowiednio 6,4%, 71,6% i 99,5%.

Czułość i swoistość testu pod kątem SA w porównaniu z łączoną metodą hodowli bezpośredniej i wzbogaconej wyniosły odpowiednio 93,9% (620/660) i 94,2% (1734/1841), a częstość występowania, PPV i NPV wyniosły odpowiednio 26,4%, 85,3% i 97,7%.

Tabela 22 Porównanie wyników testu cobas® MRSA/SA z hodowlą bezpośrednią i wzbogaconą (metoda referencyjna)

Test cobas® MRSA/SA		Hodowla bezpośrednia i wzbogacona (metoda referencyjna)					
		MRSA			SA		
		Dodatni	Ujemny	Ogółem	Dodatni	Ujemny	Ogółem
Dodatni	149	59	208	620	107	727	
Ujemny	11	2281	2292	40	1734	1774	
Ogółem	160	2340	2500	660	1841	2501	
<p>MRSA</p> <p>Czułość: 93,1% (149/160) (95% CI: 88,1–96,1%)</p> <p>Swoistość: 97,5% (2281/2340) (95% CI: 96,8–98,0%)</p> <p>Częstość występowania: 6,4%</p> <p>PPV: 71,6%</p> <p>NPV: 99,5%</p> <p>SA</p> <p>Czułość: 93,9% (620/660) (95% CI: 91,9–95,5%)</p> <p>Swoistość: 94,2% (1734/1841) (95% CI: 93,0–95,2%)</p> <p>Częstość występowania: 26,4%</p> <p>PPV: 85,3%</p> <p>NPV: 97,7%</p>							

Uwaga: w tej tabeli uwzględniono próbki uczestników, które były poddane hodowli bezpośredniej i uzyskały ważny wynik w teście cobas® MRSA/SA, i zostały uznane za kwalifikujące się do oceny.

MRSA = gronkowiec złocisty oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus*; NPV = ujemna wartość predykcyjna; PPV = dodatnia wartość predykcyjna; SA = *Staphylococcus aureus*.

Porównanie wyników testu cobas® MRSA/SA z hodowlą bezpośrednią

Wyniki testu cobas® MRSA/SA porównano z hodowlą bezpośrednią obejmującą 2504 kwalifikujące się do oceny wyniki, co przedstawia Tabela 23.

Ogólna zgodność procentowa wyników dodatnich i ujemnych testu cobas® MRSA/SA pod kątem MRSA w porównaniu z hodowlą bezpośrednią wyniosła odpowiednio 96,9% (2427/2504), 97,1% (135/139) i 96,9% (2292/2365), a częstość występowania wyniosła 5,6%.

Ogólna zgodność procentowa wyników dodatnich i ujemnych testu cobas® MRSA/SA pod kątem SA w porównaniu z hodowlą bezpośrednią wyniosła odpowiednio 93,3% (2336/2504), 97,0% (577/595) i 92,1% (1759/1909), a częstość występowania wyniosła 23,8%.

Tabela 23 Porównanie wyników testu cobas® MRSA/SA z hodowlą bezpośrednią

		Hodowla bezpośrednia					
		MRSA			SA		
		Dodatni	Ujemny	Ogółem	Dodatni	Ujemny	Ogółem
Test cobas® MRSA/SA	Dodatni	135	73	208	577	150	727
	Ujemny	4	2292	2296	18	1759	1777
	Ogółem	139	2365	2504	595	1909	2504
MRSA							
Zgodność procentowa wyników dodatnich:		97,1% (135/139) (95% CI: 92,8–98,9%)					
Zgodność procentowa wyników ujemnych:		96,9% (2292/2365) (95% CI: 96,1–97,5%)					
Procentowa zgodność ogółem:		96,9% (2427/2504) (95% CI: 96,2–97,5%)					
Częstość występowania:		5,6%					
SA							
Zgodność procentowa wyników dodatnich:		97,0% (577/595) (95% CI: 95,3–98,1%)					
Zgodność procentowa wyników ujemnych:		92,1% (1759/1909) (95% CI: 90,8–93,3%)					
Procentowa zgodność ogółem:		93,3% (2336/2504) (95% CI: 92,2–94,2%)					
Częstość występowania:		23,8%					

Uwaga: w tej tabeli uwzględniono próbki uczestników, które były poddane hodowli bezpośredniej i uzyskały ważny wynik w teście cobas® MRSA/SA, i zostały uznane za kwalifikujące się do oceny.

MRSA = gronkowiec złocisty oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus*; SA = *Staphylococcus aureus*.

Analiza rozbieżności próbek o wynikach niezgodnych i zgodnych

Analizę rozbieżności przeprowadzono na wszystkich próbkach o wynikach niezgodnych (Tabela 22) oraz na losowo wybranym podzbiornym próbek o wynikach zgodnych dołączonych jako kontrole między testem cobas® MRSA/SA a łączoną metodą hodowli bezpośredniej i wzbogaconej (metoda referencyjna) za pomocą drugiego, zatwierdzonego przez FDA testu opartego na metodzie amplifikacji kwasu nukleinowego (NAAT) oraz metody nieselektywnej hodowli bezpośredniej i wzbogaconej.

Całkowita liczba próbek MRSA o wynikach niezgodnych wyniosła 70, z czego: 11 to wyniki fałszywie ujemne pod kątem MRSA, a 59 to wyniki fałszywie dodatnie pod kątem MRSA (Tabela 22). Spośród 11 próbek fałszywie ujemnych pod kątem MRSA 5 uzyskało wynik MRSA-ujemny w teście drugim wykonanym metodą NAAT oraz w nieselektywnej hodowli bezpośredniej i wzbogaconej. Spośród 59 próbek fałszywie dodatnich pod kątem MRSA 20 uzyskało wynik MRSA-dodatni w teście drugim wykonanym metodą NAAT lub w nieselektywnej hodowli bezpośredniej i/lub wzbogaconej.

Całkowita liczba próbek SA o wynikach niezgodnych wyniosła 147, z czego: 40 to wyniki fałszywie ujemne pod kątem SA, a 107 to wyniki fałszywie dodatnie pod kątem SA (Tabela 22). Spośród 40 próbek fałszywie ujemnych pod kątem SA 31 uzyskało wynik SA-ujemny w teście drugim wykonanym metodą NAAT oraz w nieselektywnej hodowli bezpośredniej i wzbogaconej. Spośród 107 próbek fałszywie dodatnich pod kątem SA 24 uzyskało wynik SA-dodatni w teście drugim wykonanym metodą NAAT albo w nieselektywnej hodowli bezpośredniej i/lub wzbogaconej.

74 próbki o wynikach zgodnych wybrano losowo i dołączono jako kontrole w analizie rozbieżności: 25 próbek MRSA-dodatnich, 25 próbek SA-ujemnych oraz 24 próbki dodatnie pod kątem SA / ujemne pod kątem MRSA o wynikach zgodnych. Spośród 74 kontroli wszystkie 25 próbek MRSA-dodatnich dało wynik MRSA-dodatni w drugim badaniu metodą NAAT lub przy zastosowaniu nieselektywnej hodowli bezpośredniej i/lub wzbogaconej; wszystkie 25 próbek SA-ujemnych dało wynik SA-ujemny w drugim badaniu metodą NAAT i w nieselektywnej hodowli bezpośredniej oraz wzbogaconej; spośród 24 próbek SA-dodatnich 21 dało wynik SA-dodatni w drugim badaniu metodą NAAT lub w nieselektywnej hodowli bezpośredniej i/lub wzbogaconej, 1 dała wynik MRSA-dodatni w nieselektywnej hodowli wzbogaconej, a 2 dały wynik SA-ujemny w drugim badaniu metodą NAAT i w nieselektywnej hodowli bezpośredniej oraz wzbogaconej.

Oczekiwane wartości

Częstość występowania

Częstość występowania nosicielstwa MRSA i SA w nosie zależy od wielu czynników, takich jak przebywanie w placówce opieki długoterminowej, wcześniejsze zakażenia lub kolonizacje MRSA, cukrzyca, bliski kontakt z nosicielem MRSA/SA oraz wcześniejsze przyjmowanie antybiotyków. Całkowita częstość występowania bakterii MRSA i SA zaobserwowana przy pomocy testu **cobas**® MRSA/SA w porównaniu z łączoną metodą hodowli bezpośredniej i wzbogaconej podczas wielośrodkowego badania klinicznego wyniosła odpowiednio 6,4% i 26,4%.

Hipotetyczne wartości predykcyjne wyniku dodatniego i ujemnego dla testu **cobas**® MRSA/SA pod kątem MRSA

Hipotetyczne wartości predykcyjne dodatnie i ujemne (PPV i NPV) uzyskane na podstawie wskaźnika nosicielstwa wynoszącego od 1 do 30% w przypadku testu **cobas**® MRSA/SA pod kątem MRSA przedstawia Tabela 24. Czułość i swoistość testu **cobas**® MRSA/SA w porównaniu z łączoną metodą hodowli bezpośredniej i wzbogaconej (metoda referencyjna) wyniosły dla MRSA odpowiednio 93,1% i 97,5%.

Tabela 24 Hipotetyczne wartości predykcyjne dodatnie i ujemne w przypadku MRSA uzyskane na podstawie częstości występowania nosicielstwa w nosie

Częstość występowania (%)	Czułość (%)	Swoistość (%)	PPV (%)	NPV (%)
1	93,1%	97,5%	27,2%	99,9%
5	93,1%	97,5%	66,0%	99,6%
10	93,1%	97,5%	80,4%	99,2%
15	93,1%	97,5%	86,7%	98,8%
20	93,1%	97,5%	90,2%	98,3%
25	93,1%	97,5%	92,5%	97,7%
30	93,1%	97,5%	94,1%	97,1%

Uwaga: czułość i swoistość określono, porównując wyniki testu **cobas**® MRSA/SA z łączoną metodą hodowli bezpośredniej i wzbogaconej. W obu przypadkach próbki zostały pobrane w formie wymazu z nosa od pacjentów badanych pod kątem kolonizacji MRSA lub SA.

NPV = ujemna wartość predykcyjna; PPV = dodatnia wartość predykcyjna.

Hipotetyczne wartości predykcyjne dodatnie i ujemne dla testu cobas® MRSA/SA pod kątem SA

Hipotetyczne wartości predykcyjne dodatnie i ujemne (PPV i NPV) uzyskane na podstawie wskaźnika nosicielstwa wynoszącego od 1 do 30% w przypadku testu cobas® MRSA/SA pod kątem SA przedstawia Tabela 25. Czułość i swoistość testu cobas® MRSA/SA w porównaniu z łączoną metodą hodowli bezpośredniej i wzbogaconej (metoda referencyjna) wyniosły dla SA odpowiednio 93,9% i 94,2%.

Tabela 25 Hipotetyczne wartości predykcyjne dodatnie i ujemne w przypadku SA uzyskane na podstawie częstości występowania nosicielstwa w nosie

Częstość występowania (%)	Czułość (%)	Swoistość (%)	PPV (%)	NPV (%)
1	93,9%	94,2%	14,0%	99,9%
5	93,9%	94,2%	46,0%	99,7%
10	93,9%	94,2%	64,2%	99,3%
15	93,9%	94,2%	74,0%	98,9%
20	93,9%	94,2%	80,2%	98,4%
25	93,9%	94,2%	84,3%	97,9%
30	93,9%	94,2%	87,4%	97,3%

Uwaga: czułość i swoistość określono, porównując wyniki testu cobas® MRSA/SA z łączoną metodą hodowli bezpośredniej i wzbogaconej. W obu przypadkach próbki zostały pobrane w formie wymazu z nosa od pacjentów badanych pod kątem kolonizacji MRSA lub SA.

NPV = ujemna wartość predykcyjna; PPV = dodatnia wartość predykcyjna.

Dodatkowe informacje


























Najważniejsze cechy oznaczenia

Rodzaj próbki	Wymaz z jamy nosowej
Wymagana ilość próbki	1,6 ml pożywki MSwab w fiolce pierwotnej, do wykonania testu cobas® MRSA/SA wymagane jest co najmniej 700 µl próbki.
Czas trwania testu	Wyniki są dostępne w ciągu 2,5 godziny po umieszczeniu próbki w systemie (1–22 próbek).
Czułość analityczna	Od 175 CFU/wymaz do 750 CFU/wymaz w zależności od izolatu.
Swoistość	Nie stwierdzono reaktywności krzyżowej ze 147 blisko spokrewnionymi mikroorganizmami lub mikroorganizmami występującymi typowo w próbkach wymazu z jamy nosowej.
Reprezentatywność	Ogółem przebadano i wykryto 314 izolatów szczepów MRSA i 91 izolatów szczepów SA z 16 krajów, reprezentujących co najmniej 7 typów SCCmec, 10 typów RE oraz 71 typów spa.

Oznaczenia

Na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR stosuje się następujące oznaczenia.

Tabela 26 Oznaczenia stosowane na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR

Age/DOB Wiek lub data urodzenia	 Wyrób nieprzeznaczony do testów przy pacjencie	QS IU/PCR IU QS na reakcję PCR, użyć jednostek międzynarodowych (IU) QS na reakcję PCR w obliczeniach wyników.
 Oprogramowanie pomocnicze	 Wyrób nieprzeznaczony do samodzielnego testowania	SN Numer seryjny
Assigned Range [copies/mL] Przepisany zakres (kopie/ml)	 Dystrybutor (Uwaga: pod symbolem może być wskazany właściwy kraj/region.)	Site Ośrodek
Assigned Range [IU/mL] Przepisany zakres (IU/ml)	 Nie używać повторно	Procedure Standard Procedura standardowa
EC REP Autoryzowany Przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej	 Kobieta	STERILE EO Produkt sterylizowany tlenkiem etylenu
BARCODE Arkusze kodów kreskowych	 Wyłącznie do oceny działania w badaniach IVD	 Przechowywać z dala od światła
LOT Kod partii	GTIN Numer globalny jednostki handlowej	 Przestrzegać zakresu temperatury
 Zagrożenie biologiczne	 Importer	 Plik definicji testów
REF Numer katalogowy	IVD Wyrób do diagnostyki <i>in vitro</i>	 Tą stroną do góry
CE Oznaczenie zgodności CE — wyrób ten jest zgodny z obowiązującymi wymogami dotyczącymi oznaczenia CE dla wyrobu medycznego do diagnostyki <i>in vitro</i>	LLR Dolna granica przypisanego zakresu	Procedure UltraSensitive Procedura ultraczuła
Collect Date Data pobrania	 Mężczyzna	UDI Niepowtarzalny kod identyfikacyjny wyrobu
 Sprawdź w instrukcji użytkowania	 Wytwórca	ULR Górna granica przypisanego zakresu
 Zawartość wystarczająca na <n> testów	CONTROL - Kontrola ujemna	Urine Fill Line Linia napełniania moczem
CONTENT Zawartość zestawu	 Wyrób niejadalny	Rx Only Tylko Stany Zjednoczone: prawo federalne zezwala na sprzedaż tego wyrobu wyłącznie lekarzowi lub na zamówienie takiego lekarza.
CONTROL Próba kontrolna	 Nazwisko pacjenta	 Termin przydatności
 Data produkcji	 Numer pacjenta	
 Wyrób do testów przy pacjencie	 Rozerwać tutaj	
 Wyrób do samodzielnego testowania	CONTROL + Kontrola dodatnia	
	QS copies / PCR Kopie QS na reakcję PCR, użyć kopii QS na reakcję PCR w obliczeniach wyników.	

Pomoc techniczna

W celu uzyskania wsparcia (pomocy) technicznego należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem: https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Wytwórca i importer

Tabela 27 Wytwórca i importer



Roche Molecular Systems, Inc.
1080 US Highway 202 South
Branchburg, NJ 08876 USA
www.roche.com

Wyprodukowano w Stanach Zjednoczonych



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Znaki towarowe i patenty

Patrz <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Prawo autorskie

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.

Piśmiennictwo

1. Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. *J Infect Dis.* 2006;193(2):172-179. Epub 2005/12/20.
2. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Mol Med.* 2009;9(2):100-115. Epub 2009/03/12.
3. Bode LG, Kluytmans JA, Wertheim HF, et al. Preventing surgical-site infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med.* 2010;362(1):9-17. Epub 2010/01/08.
4. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2001;32 Suppl 2:S114-132. Epub 2001/04/26.
5. Reed SD, Friedman JY, Engemann JJ, et al. Costs and outcomes among hemodialysis-dependent patients with methicillin-resistant or methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005;26(2):175-183. Epub 2005/03/11.
6. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24(5):362-386. Epub 2003/06/06.
7. Huang SS, Yokoe DS, Hinrichsen VL, et al. Impact of routine intensive care unit surveillance cultures and resultant barrier precautions on hospital-wide methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2006;43(8):971-978. Epub 2006/09/20.
8. Peterson LR, Diekema DJ. To screen or not to screen for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2010;48(3):683-689. Epub 2010/01/15.
9. Cunningham R, Jenks P, Northwood J, Wallis M, Ferguson S, Hunt S. Effect on MRSA transmission of rapid PCR testing of patients admitted to critical care. *J Hosp Infect.* 2007;65(1):24-28. Epub 2006/12/06.
10. French GL. Methods for screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15 Suppl 7:10-16. Epub 2009/12/03.
11. Hardy K, Price C, Szczepura A, et al. Reduction in the rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition in surgical wards by rapid screening for colonization: a prospective, cross-over study. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(4):333-339. Epub 2009/07/23.
12. Peterson LR, Liesenfeld O, Woods CW, et al. Multicenter evaluation of the LightCycler methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) advanced test as a rapid method for detection of MRSA in nasal surveillance swabs. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1661-1666. Epub 2010/03/26.
13. Struelens MJ, Hawkey PM, French GL, Witte W, Tacconelli E. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(2):112-119. Epub 2009/03/18.
14. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. HHS Publication No. (CDC) 21-1112. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 5th edition. Revised December 2009.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.

Wersja dokumentu

Informacje dotyczące wersji dokumentu	
Doc. Rev. 4.0 07/2023	<p>Zaktualizowano sekcję Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania, aby poinformować użytkownika o konieczności skontaktowania się z lokalnym właściwym organem.</p> <p>Zmieniono nazwę sekcji Korelacja metody na Skuteczność w badaniach klinicznych z wykorzystaniem próbek klinicznych.</p> <p>Dodano dodatkowe dane dotyczące skuteczności klinicznej do części Skuteczność w badaniach klinicznych z wykorzystaniem próbek klinicznych.</p> <p>Dodano łącze internetowe do sprawozdania podsumowującego bezpieczeństwo i parametry działania.</p> <p>Zaktualizowano stronę z ujednoliconymi symbolami.</p> <p>Zaktualizowano adresy producenta i importera.</p> <p>Zaktualizowano sekcję Znaki towarowe i patenty oraz link.</p> <p>Dodano część Pomoc techniczna.</p> <p>Zaktualizowano w celu zapewnienia zgodności z wymaganiami IVDR.</p> <p>W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.</p>
Doc. Rev. 5.0 02/2024	<p>Informacje dotyczące zagrożeń związanych z zestawami Lysis Kit 1 zostały zaktualizowane.</p> <p>Zaktualizowano zapis marki cobas®.</p> <p>W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.</p>

Podsumowanie sprawozdania na temat bezpieczeństwa i parametrów działania można znaleźć pod następującym linkiem: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>