

cobas[®] MRSA/SA Test

zur Verwendung auf dem cobas[®] 4800 System

In-vitro-Diagnostikum



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

INHALTSVERZEICHNIS

Verwendungszweck

Zusammenfassung und Erklärung des Tests / Testprinzipien

Hintergrund: Screening auf MRSA und SA	4
Erklärung des Tests	5
Testprinzipien	5
Probenaufarbeitung	5
PCR-Amplifikation und TaqMan®-Detektion	5
Selektive Amplifikation	6

Materialien, Reagenzien und Proben

Mitgelieferte Materialien und Reagenzien	6
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	8
Zusätzlich benötigtes Material	14
Zusätzlich erhältliches Material	14
Zusätzlich benötigte Geräte und Software	14

Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	15
Gute Laborpraxis	15
Kontamination	16
Integrität	16
Entsorgung	16
Verschüttetes Material und Reinigung	17
Entnahme, Transport und Lagerung von Proben	17
Probenentnahme	17
Lagerung und Stabilität von Proben während des Transports	17

Gebrauchsanleitung

Durchführung des Tests	18
Arbeitsablauf	18
Testverfahren	18

Ergebnisse

Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse	23
Positivkontrolle	23
Negativkontrolle	23
Interne Kontrolle	23
Interpretation der Ergebnisse	23
Liste der Ergebnis-Flags	25

Kultivierung klinischer Proben	26
Verfahrenseinschränkungen.....	26

Nicht-klinische Leistungsmerkmale

Analytische Sensitivität.....	28
Detektion von MRSA- und SA-Genotypen.....	28
Geografische Subtypenerfassung	30
Präzision	31
Kompetitive Hemmung.....	33
Analytische Spezifität.....	34
Störeinflüsse	37
Klinische Leistung bei Verwendung klinischer Proben.....	38
Reproduzierbarkeits-Ergebnisse für MRSA	40
Reproduzierbarkeits-Ergebnisse für SA	42
Klinische Leistung	43
Ergebnisse.....	44
Erwartete Werte.....	47

Weitere Informationen

Wichtigste Leistungsmerkmale des Assays.....	49
Symbole.....	50
Technischer Support.....	51
Hersteller und Importeur	51
Marken und Patente.....	51
Copyright.....	51
Literatur	52
Dokumentversion.....	53

Verwendungszweck

Der **cobas®** MRSA/SA-Test zur Verwendung auf dem **cobas®** 4800 System ist ein automatisierter, qualitativer *in-vitro*-diagnostischer Test zur Detektion von Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-DNA (MRSA) und *Staphylococcus aureus*-DNA (SA) mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in nasalen Abstrichproben. Der Test dient zur Prävention und Kontrolle von MRSA- und SA-Infektionen in medizinischen Einrichtungen. Der **cobas®** MRSA/SA-Test ist nicht für die Diagnose, Steuerung oder Überwachung der Behandlung von MRSA- oder SA-Infektionen bestimmt und kann keine Ergebnisse zur Empfindlichkeit gegenüber Methicillin liefern. Ein negatives Ergebnis schließt eine nasale MRSA/SA-Besiedelung nicht aus. Es sind Begleitskulturen notwendig, wenn Organismen für epidemiologische Typisierung oder weitere Suszeptibilitätstests benötigt werden.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests / Testprinzipien

Hintergrund: Screening auf MRSA und SA

SA ist ein opportunistisches Pathogen, das als Kommensale die Haut und die Nasenhöhlen bei etwa 30 % der normalen Bevölkerung besiedelt. Es kann aber auch eine Vielzahl von Krankheiten auslösen.¹ SA kann sich schnell an verschiedene Antibiotika anpassen, was zum Auftreten und zur Verbreitung von MRSA-Stämmen geführt hat. Die Resistenz gegenüber Methicillin sowie anderen β -Lactam-Antibiotika, wird durch das Genprodukt von *mecA* herbeigeführt, welches innerhalb eines mobilen genetischen Elements liegt, der SCCmec-Kassette (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*). Das *mecA*-Gen kodiert ein modifiziertes Penicillinbindepotein (PBP) 2a. Dies verhindert die normale Bindung von β -Lactam-Antibiotika an die PBP in der Zellwand, wo sie die Synthese der Peptidoglykanschicht gestört hätten, was zum Zelltod der Bakterien führen würde. Es sind verschiedene Typen von SCCmec-Elementen bekannt.² Weltweit sind zahlreiche MRSA-Stämme verbreitet, und das SCCmec-Element wurde von vielen SA-Stämmen erworben.²

SA- und MRSA-Stämme sind eine Hauptquelle für nosokomiale Infektionen und seit vielen Jahren verantwortlich für Ausbrüche bakterieller Infektionen in medizinischen Einrichtungen.^{3,4} SA- und MRSA-Infektionen stellen eine enorme Belastung für das Gesundheitssystem und für die Krankenhäuser dar und sind dementsprechend mit erheblichen Kosten verbunden.⁵ Richtlinien und Empfehlungen⁶ sowie Standardverfahren von Krankenhäusern empfehlen ein aktives Screening und die Isolierung und/oder Dekolonisierung von Patienten als Maßnahmen zur Eindämmung der Verbreitung von MRSA und SA.⁷

Im Fall eines Ausbruchs können zusätzliche Maßnahmen wie das Screening von ambulanten Patienten und medizinischem Personal und das Schließen von Krankenstationen eingeleitet werden. Trotz allgemeingültiger Richtlinien gibt es von Land zu Land und von Krankenhaus zu Krankenhaus erhebliche Abweichungen in den Standardarbeitsanweisungen zur Infektionskontrolle.

Die Empfindlichkeit der angewendeten Methoden und die Zeit bis zur Ergebnisermittlung haben sich als wichtigste Faktoren für den Erfolg von Screening- und Behandlungsstrategien herausgestellt.⁸ Bei herkömmlichen kulturbasierten Methoden dauert es mehrere Tage, bis Ergebnisse vorliegen, so dass eine schnelle Umsetzung spezifischer Maßnahmen zur Infektionskontrolle nicht möglich ist; in diesen Fällen sind allgemeinere Maßnahmen zur Infektionskontrolle für alle Patienten anzuwenden. Nur schnelle Technologien wie molekulare Methoden ermöglichen eine frühe Detektion von MRSA und SA bei besiedelten Patienten und eine konsequente Umsetzung geeigneter infektionsverhütender Maßnahmen.⁹ Zahlreiche Berichte belegen den Nutzen schneller Molekultests zur schnellen Erkennung einer MRSA- und SA-Kolonisierung.¹⁰⁻¹³

Mit dem **cobas®** MRSA/SA-Test werden nasale Abstrichproben analysiert, die mit dem COPAN MSwab Entnahme-, Transport- und Konservierungskit gesammelt wurden. Die Röhrchen mit den Primärproben werden in das **cobas®** 4800 System geladen; die Nukleinsäureextraktion und die Einrichtung der PCR-Reaktion erfolgen automatisch. Während der anschließenden Echtzeit-PCR wird die eventuell in der Probe vorliegende MRSA- und SA-spezifische DNA detektiert. Der Test kann zusammen mit Batches für den **cobas®** Cdiff- und den **cobas®** HSV-1/2-Test innerhalb eines Laufs durchgeführt werden. Für alle drei Tests gilt derselbe automatisierte Probenextraktionsvorgang sowie dasselbe PCR-Profil für die Amplifikation und Detektion.

Erklärung des Tests

Der **cobas®** MRSA/SA-Test umfasst zwei Hauptprozesse: (1) automatisierte Probenaufarbeitung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus nasalen Abstrichproben, (2) PCR-Amplifikation der Ziel-DNA-Sequenzen unter Verwendung von MRSA- und SA-spezifischen Primern und Echtzeitdetektion der gespaltenen MRSA- und SA-spezifischen, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-Detektionssonden. Vor der automatisierten Probenaufarbeitung wird allen Proben eine interne Kontrolle mit einer nicht verwandten, randomisierten DNA-Sequenz zugegeben. Diese Kontrolle wird mit jeder Probe amplifiziert und gleichzeitig detektiert, um den gesamten Prozess zu überwachen.

Testprinzipien

Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung für den **cobas®** MRSA/SA-Test wird auf dem **cobas®** x 480 Instrument automatisch durchgeführt. Die Organismen werden mit einer chaotropen Substanz, Proteinase K und SDS-Reagenzien lysiert. Die freigesetzten Nukleinsäuren werden zusammen mit der DNA der zugegebenen internen Kontrolle an magnetische Glaspartikel gebunden. Sie werden gewaschen und dann in eine kleine Menge Puffer eluiert. Danach führt das Instrument eine PCR-Reaktion mit einem Aliquot des eluierten Materials und aktiviertem Master-Mix durch.

PCR-Amplifikation und TaqMan®-Detektion

Die PCR-Zyklen und die Detektion des Zielsignals erfolgen auf dem **cobas®** z 480 Analyzer. Der Master-Mix enthält Primerpaare und Sonden für drei Zielsequenzen: die für MRSA spezifische Umgebung der rechten Insertionsgrenze der SCCmec-Kassette, eine genomische Zielsequenz für alle SA (inkl. MRSA) und die interne Kontrolle. Wenn die Ziel-Nukleinsäuresequenzen vorhanden sind, erfolgt die Amplifikation mit den entsprechenden Primern durch eine thermostabile DNA-Polymerase, wobei PCR-Produkte (Amplifikat) entstehen. Diese Produkte werden von den spezifischen TaqMan-Sonden detektiert, die einen Fluoreszenzfarbstoff sowie einen Quencher enthalten. Normalerweise unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Farbstoffs. Wenn jedoch das PCR-Produkt vorliegt, hybridisiert die Sonde mit dem Produkt und wird durch die 5'-3'-Nukleaseaktivität der Polymerase gespalten. Bei dieser Reaktion kann der Farbstoff Fluoreszenz emittieren, und dieses Signal wird während jedes PCR-Zyklus in Echtzeit vom **cobas®** z 480 Analyzer aufgezeichnet. Das Signal wird von der Software des **cobas®** 4800 Systems interpretiert und als Endergebnis angegeben.

Selektive Amplifikation

Die selektive Amplifikation der Ziel-Nukleinsäure in der Probe wird beim **cobas®** MRSA/SA-Test durch die Verwendung des Enzyms AmpErase (Uracil-N-Glykosylase) und von Desoxyuridintriphosphat (dUTP) erreicht. Das Enzym AmpErase erkennt desoxyuridinhaltige¹¹ – nicht aber desoxythymidinhaltige – DNA-Stränge und katalysiert deren Zerstörung. Desoxyuridin ist in natürlich vorkommender DNA nicht enthalten, ist in den Amplifikaten jedoch immer vorhanden, da Desoxyuridintriphosphat anstelle von Thymidintriphosphat als eines der dNTPs im Master-Mix verwendet wird. Deshalb enthalten nur die Amplifikate Desoxyuridin. Desoxyuridin macht kontaminierende Amplifikate vor der Amplifikation der Ziel-DNA anfällig für die Zerstörung durch das Enzym AmpErase. Das im Master-Mix enthaltene Enzym AmpErase katalysiert die Spaltung desoxyuridinhaltiger DNA an den Desoxyuridin-Resten durch Öffnen der Desoxyribosekette an der C1-Position. Während der Erwärmung im ersten thermozyklischen Schritt (bei dem alkalischen pH-Wert des Master-Mix) tritt ein Bruch des DNA-Strangs des Amplifikats an der Desoxyuridin-Position auf, so dass die DNA nicht weiter amplifiziert werden kann. Das Enzym AmpErase ist bei Temperaturen über 55 °C (d. h. während aller thermozyklischen Schritte) inaktiv und zerstört deshalb keine Zielamplifikate. Es konnte gezeigt werden, dass mit dem **cobas®** MRSA/SA-Test pro PCR mindestens 10³ Kopien des desoxyuridinhaltigen mutierten MRSA/SA-Amplifikats inaktiviert werden.

Materialien, Reagenzien und Proben

Mitgelieferte Materialien und Reagenzien

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise*
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Probenvorbereitungskit für das cobas® 4800 System) 240 Tests (P/N: 05235782190)	MGP (Magnetische Glaspartikel für das cobas® 4800 System) Magnetische Glaspartikel 93 % Isopropanol**	10 × 4,5 ml	 GEFAHR H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. H319: Verursacht schwere Augenreizung. H336: Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. P210: Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen. P233: Behälter dicht verschlossen halten. P261: Einatmen von Nebel oder Dampf vermeiden. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz/Gehörschutz tragen. P303 + P361 + P353: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen. P370 + P378: Bei Brand: Trockenem Sand, Trockenlöschmittel oder alkoholbeständigen Schaum zum Löschen verwenden. 67-63-0 2-Propanol

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise*
	EB (Elutionspuffer für das cobas ® 4800 System) Tris-Puffer 0,09 % Natriumazid	10 × 18 ml	k. A.
cobas ® 4800 System Sample Preparation Kit (Probenvorbereitungskit für das cobas ® 4800 System) 960 Tests (P/N: 05235804190)	MGP (Magnetische Glaspartikel für das cobas ® 4800 System) Magnetische Glaspartikel 93 % Isopropanol**	10 × 13,5 ml	 GEFAHR H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. H319: Verursacht schwere Augenreizung. H336: Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. P210: Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen. P233: Behälter dicht verschlossen halten. P261: Einatmen von Nebel oder Dampf vermeiden. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz/Gehörschutz tragen. P303 + P361 + P353: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen. P370 + P378: Bei Brand: Trockenen Sand, Trockenlöschmittel oder alkoholbeständigen Schaum zum Löschen verwenden. 67-63-0 2-Propanol
	EB (Elutionspuffer für das cobas ® 4800 System) Tris-Puffer 0,09 % Natriumazid	10 × 18 ml	k. A.

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise*
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 240 Tests (P/N: 06768253190)	LYS-1 (Lysepuffer 1 für das cobas® 4800 System) Natriumcitrat 5 % Polidocanol** 42,6 % Guanidinthiocyanat** Dithiothreitol**	10 × 10 ml	 GEFAHR H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. H411: Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. EUH032: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. EUH071: Wirkt ätzend auf die Atemwege. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Schutzbrille/Gesichtsschutz/Gehörschutz tragen. P303 + P361 + P353: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen. P304 + P340 + P310: BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. P305 + P351 + P338 + P310: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. P391: Verschüttete Mengen aufnehmen. 593-84-0 Guanidinthiocyanat 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutan-2,3-diol

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise*
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 240 Tests (P/N: 06768253190)	PK (Proteinase K für das cobas® 4800 System) Tris-Puffer EDTA Calciumchlorid Calciumacetat < 2,0 % Proteinase K* Glyzerin	10 × 0,9 ml	 GEFAHR H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H334: Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. P261: Einatmen von Nebel oder Dampf. P280: Schutzhandschuhe tragen. P284: Atemschutz tragen. P304 + P340: BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. P342 + P311: Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. 39450-01-6 Proteinase, <i>Tritirachium album</i>-Serin
	SDS (SDS-Reagenz für das cobas® 4800 System) Tris-Puffer Natriumdodecylsulfat 0,09 % Natriumazid	10 × 3 ml	k. A.

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise*
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 960 Tests (P/N: 06768270190)	LYS-1 (Lysepuffer 1 für das cobas® 4800 System) Natriumcitrat 5 % Polidocanol** 42,6 % Guanidinthiocyanat** Dithiothreitol**	10 × 36 ml	 GEFAHR H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. H411: Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. EUH032: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. EUH071: Wirkt ätzend auf die Atemwege. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz/Gehörschutz tragen. P303 + P361 + P353: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen. P304 + P340 + P310: BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. P305 + P351 + P338 + P310: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. P391: Verschüttete Mengen aufnehmen. 593-84-0 Guanidinthiocyanat 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutan-2,3-diol

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise*
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 960 Tests (P/N: 06768270190)	PK (Proteinase K für das cobas® 4800 System) Tris-Puffer EDTA Calciumchlorid Calciumacetat < 2,0 % Proteinase K** Glycerin	20 × 1,2 ml	 GEFAHR H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H334: Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. P261: Einatmen von Nebel oder Dampf. P280: Schutzhandschuhe tragen. P284: Atemschutz tragen. P304 + P340: BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. P342 + P311: Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. 39450-01-6 Proteinase, <i>Tritirachium album</i> -Serin
	SDS (SDS-Reagenz für das cobas® 4800 System) Tris-Puffer Natriumdodecylsulfat 0,09 % Natriumazid	10 × 9 ml	k. A.
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 240 Tests (P/N: 05235863190)	WB (Waschpuffer für das cobas® 4800 System) Natriumcitratdihydrat 0,05 % N-Methylisothiazolon-HCl	10 × 55 ml	k. A.
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 960 Tests (P/N: 05235871190)	WB (Waschpuffer für das cobas® 4800 System) Natriumcitratdihydrat 0,05 % N-Methylisothiazolon-HCl	10 × 200 ml	k. A.
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 20 Läufe (P/N: 06768318190)	IC-1 (cobas® 4800 IC-1) Tris-Puffer EDTA < 0,01 % Poly rA RNA (synthetisch) 0,05 % Natriumazid < 0,01 % nicht-infektiöse, synthetische DNA als interne Kontrolle, verkapselt in Bakteriophagenprotein Lambda	20 × 0,5 ml	k. A.

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise*
cobas® 4800 MRSA/SA Amplification/Detection Kit 80 Tests (P/N: 06768113190)	MRSA/SA MMX (cobas® MRSA/SA Master Mix) Tricinpuffer EDTA Kaliumacetat Kaliumhydroxid Tween 20 Glycerin 0,09 % Natriumazid < 0,19 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0,01 % Upstream- und Downstream-Primer für MRSA, SA und die interne Kontrolle < 0,01 % fluoreszenzmarkierte Sonden für MRSA, SA und die interne Kontrolle < 0,01 % Oligonukleotid-Aptamer < 0,01 % Z05-DNA-Polymerase (mikrobiell) < 0,02 % AmpErase-Enzym (Uracil-N- Glykosylase) (mikrobiell)	10 × 0,3 ml	k. A.
cobas® 4800 MRSA/SA Amplification/Detection Kit 240 Tests (P/N: 06768172190)	MRSA/SA MMX (cobas® MRSA/SA Master Mix) Tricinpuffer EDTA Kaliumacetat Kaliumhydroxid Tween 20 Glycerin 0,09 % Natriumazid < 0,19 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0,01 % Upstream- und Downstream-Primer für MRSA, SA und die interne Kontrolle < 0,01 % fluoreszenzmarkierte Sonden für MRSA, SA und die interne Kontrolle < 0,01 % Oligonukleotid-Aptamer < 0,01 % Z05-DNA-Polymerase (mikrobiell) < 0,02 % AmpErase-Enzym (Uracil-N- Glykosylase) (mikrobiell)	10 × 0,7 ml	k. A.

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise*
cobas® 4800 MRSA/SA Controls and Cofactor Kit 10 Läufe (P/N: 06768288190)	MRSA/SA (+) C (cobas® MRSA/SA Positivkontrolle) Tris-Puffer EDTA < 0,01 % Poly rA RNA (synthetisch) 0,05 % Natriumazid < 0,01 % nicht-infektiöse Plasmid-DNA (mikrobiell) mit MRSA-Sequenz < 0,01 % nicht-infektiöse Plasmid-DNA (mikrobiell) mit SA-Sequenz	10 × 0,5 ml	k. A.
	(-) C (Negativkontrolle für das cobas® 4800 System) Tris-Puffer EDTA < 0,01 % Poly rA RNA (synthetisch) 0,05 % Natriumazid	10 × 0,5 ml	k. A.
	Cofactor-1 (cobas® 4800 Kofaktor-1) Manganacetat Magnesiumacetat 0,09 % Natriumazid	10 × 1,7 ml	k. A.

* Die Sicherheitskennzeichnung der Produkte erfolgt in erster Linie gemäß GHS-Verordnung der EU.

** Gefährliche Substanz

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Reagenz	Lagertemperatur	Lagerdauer
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Probenaufarbeitungs-kit für das cobas® 4800 System)	2–8 °C	Bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Lysekit 1 für das cobas® 4800 System)	2–8 °C	Bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 (Internes Kontrollkit 1 für das cobas® 4800 System)	2–8 °C	Bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil
cobas® 4800 MRSA/SA Amplification/Detection Kit (cobas® 4800 MRSA/SA Amplifikations-/Detektions-Kit)	2–8 °C	Bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil
cobas® 4800 MRSA/SA Controls and Cofactor Kit (cobas® 4800 MRSA/SA Kontroll- und -Kofaktorkit)	2–8 °C	Bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Waschpufferkit für das cobas® 4800 System)	15–25 °C	Bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil

Reagenzien nicht einfrieren.

Für das angegebene Verfallsdatum der Reagenzien ist die koordinierte Weltzeit (Coordinated Universal Time, UTC) maßgeblich. Das lokale Verfallsdatum kann je nach Zeitzone bis zu 12 Stunden vor oder nach dem angegebenen Zeitpunkt liegen.

Zusätzlich benötigtes Material

Materialien	P/N
CORE-Spitzen, 1000 µl, Rack mit 96 Spitzen	04639642001
Reagenz-Reservoir, 50 ml	05232732001
Reagenz-Reservoir, 200 ml	05232759001
Extraktionsplatte (Deep-Well-Platte) für das cobas ® 4800 System	05232716001
Mikrotiterplatte (0,3 ml) und Versiegelungsfolie für das cobas ® 4800 System	05232724001
Versiegelungsfolienwerkzeug	04900383001
Carrier mit 32 Positionen	04639529001
Beutel für Festabfälle	05530873001 (klein) oder 04691989001 (groß)
Hamilton STAR Abfallschacht aus Kunststoff	Roche 04639669001
MSwab Entnahme-, Transport- und Konservierungssystem	07007248190 oder COPAN P/N 404C.R oder 404C
Laborhandschuhe, puderfrei	Es ist jede Art von puderfreien Laborhandschuhen geeignet.
Vortexer (Einzelröhrchen)	Es ist jeder Vortexer geeignet.

Weitere Informationen zu diesen separat erhältlichen Materialien erhalten Sie von Ihrer zuständigen Roche-Vertretung.

Zusätzlich erhältlich Material

Materialien	P/N
Abdeckmatte oder Abdeckung für Mikrotiterplatten	Roche 04789288001 oder Hamilton 6474-01
Verschlüsse, weiß (zum Verschließen von Primärproben nach der Analyse)	07033893001 oder COPAN 2U008N100.R oder 2U008N100

Weitere Informationen zu diesen zusätzlich erhältlichen Materialien erhalten Sie von Ihrer zuständigen Roche-Vertretung.

Zusätzlich benötigte Geräte und Software

Zusätzlich benötigte Geräte und Software
cobas ® 4800 System cobas ® x 480 Instrument cobas ® z 480 Analyzer Control Unit
cobas ® MRSA/SA AP Software Version 1.0.0 oder höher für das cobas ® 4800 System
Anwendungssoftware (Core) Version 2.2.0 oder höher für das cobas ® 4800 System

Weitere Informationen zu diesen separat erhältlichen Materialien erhalten Sie von Ihrer zuständigen Roche-Vertretung.

Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Wie bei allen Testverfahren ist gute Laborpraxis eine unerlässliche Voraussetzung für die ordnungsgemäße Durchführung dieses Tests. Aufgrund der hohen analytischen Sensitivität dieses Tests ist Vorsicht geboten, um eine Verunreinigung der Reagenzien, Proben und Amplifikationsansätze zu verhindern.

- Nur zur Verwendung als *In-vitro*-Diagnostikum bestimmt.
- Kontamination der Reagenzien und Proben durch Mikroorganismen und DNA vermeiden. SA besiedelt die Haut oder die Nasenhöhlen bei etwa 30 % der Bevölkerung. Beim Umgang mit Proben und Reagenzien ist besonders umsichtig vorzugehen, um eine durch den Bediener verursachte mögliche SA-Kontamination zu vermeiden.
- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind auf Anfrage bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.
- Das Reagenz LYS-1 enthält Guanidinthiocyanat. Guanidinthiocyanat darf nicht mit Natriumhypochlorit (Bleiche) oder anderen hochreaktiven Reagenzien wie Säuren oder Basen in direkten Kontakt kommen. Beim Mischen dieser Stoffe können giftige Gase entstehen.
- MGP enthält Isopropanol und ist leicht entzündlich. Von offenen Flammen und Umgebungen mit potenzieller Funkenbildung fernhalten.
- EB, MRSA/SA MMX, SDS, Cofactor-1, (-)C, MRSA/SA (+)C und IC-1 enthalten Natriumazid.
- Weitere Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Verfahren zur Verringerung der Kontaminationsgefahr für das **cobas**® x 480 instrument oder den **cobas**® z 480 analyzer sind der Benutzerunterstützung des **cobas**® 4800 Systems zu entnehmen. Wenn Verdacht auf eine Verunreinigung besteht, Reinigung und wöchentliche Wartung wie in der Benutzerunterstützung des **cobas**® 4800 Systems beschrieben durchführen.
- Schwerwiegende Vorkommnisse, die bei Verwendung dieses Tests auftreten, müssen den zuständigen Behörden und dem Hersteller gemeldet werden.

Hinweis: Spezifische Anweisungen sind dem Abschnitt „Entnahme, Transport und Lagerung von Proben“ zu entnehmen.

Gute Laborpraxis

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In den Arbeitsbereichen des Labors nicht essen, trinken oder rauchen.
- Nach dem Umgang mit Proben und Testreagenzien gründlich die Hände waschen.
- Beim Umgang mit Reagenzien Augenschutz, Laborkittel und Laborhandschuhe tragen. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit diesen Materialien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen. Unbehandelt können Verätzungen entstehen. Verschüttete Flüssigkeiten vor dem Aufwischen zunächst mit Wasser verdünnen.
- Alle Arbeitsflächen im Labor gründlich mit einer frisch hergestellten Lösung aus 0,5%igem Natriumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser reinigen und desinfizieren (Haushaltsbleiche im Verhältnis 1:10 verdünnen). Anschließend die Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol abreiben.

Kontamination

- Um Kontaminationen zu vermeiden, müssen Handschuhe getragen und zwischen der Handhabung von Proben und **cobas®** MRSA/SA-Reagenzien gewechselt werden. Darauf achten, dass die Handschuhe beim Umgang mit den Proben und Kontrollen nicht kontaminiert werden. Beim Umgang mit Proben und Testreagenzien Laborhandschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen.
- Kontamination der Reagenzien und Proben durch Mikroorganismen und Ribonuklease vermeiden.
- Wird während der Handhabung und Bearbeitung der Proben eine Verschleppung der Proben nicht vermieden, kann es zu falsch-positiven Ergebnissen kommen.
- Proben sind als potenziell infektiös und gemäß den Vorschriften für sicheres Arbeiten im Labor, wie in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ und dem CLSI-Dokument M29-A4¹⁵ beschrieben, zu behandeln.

Integrität

- Kits nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Reagenzien nicht vermischen.
- Einwegkomponenten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Es dürfen keine Reagenzien oder Behälter verwendet werden, die sichtbar beschädigt sind bzw. aus denen Flüssigkeiten auslaufen.
- Alle Einwegkomponenten sind für den einmaligen Gebrauch vorgesehen und dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Alle Geräte müssen gemäß den Anweisungen des Herstellers gepflegt und gewartet werden.

Entsorgung

- Die Reagenzien des **cobas®** 4800 Systems und die für den **cobas®** MRSA/SA-Test spezifischen Reagenzien enthalten Natriumazid (siehe Abschnitt „**Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen**“). Natriumazid kann bei der Reaktion mit Blei- und Kupferleitungen hochexplosive Metallazide bilden. Beim Ausgießen natriumazidhaltiger Lösungen in Laborwaschbecken mit reichlich kaltem Wasser nachspülen, um Azidansammlung zu vermeiden.
- Nicht verbrauchte Reagenzien und Abfall gemäß den einschlägigen regionalen und überregionalen Vorschriften entsorgen.

Hinweis: Anweisungen zur Entsorgung von Flüssigabfällen sind der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800 Systems** zu entnehmen.

Verschüttetes Material und Reinigung

- Das Reagenz LYS-1 enthält Guanidinthiocyanat. Wird eine Flüssigkeit verschüttet, die Guanidinthiocyanat enthält, mit einem geeigneten Laborreinigungsmittel und Wasser beseitigen. Enthält die verschüttete Flüssigkeit potenziell infektiöse Stoffe, muss der betroffene Bereich ZUERST mit Laborreinigungsmittel und Wasser und anschließend mit 0,5%igem Natriumhypochlorit gereinigt werden.
- Wenn im **cobas**® 4800 instrument Flüssigkeit verschüttet wird, die Reinigungsanweisungen in der Benutzerunterstützung des **cobas**® 4800 Systems befolgen.
- Zum Reinigen des **cobas**® x 480 instruments oder **cobas**® z 480 analyzers keine Natriumhypochloritlösung (Bleiche) verwenden. Das **cobas**® x 480 instrument oder den **cobas**® z 480 analyzer gemäß den Anweisungen in der Benutzerunterstützung des **cobas**® 4800 Systems reinigen.

Entnahme, Transport und Lagerung von Proben

Hinweis: Alle Proben wie potenzielle Überträger von Infektionserregern behandeln.

Probenentnahme

Nasale Abstrichproben, die mit dem MSwab Entnahme-, Transport- und Konservierungssystem gesammelt wurden, sind für die Verwendung mit dem **cobas**® MRSA/SA-Test validiert. Die Proben sollten unter Anwendung des im Abschnitt „Verfahren zur Probenentnahme“ erläuterten Verfahrens und gemäß den geltenden Standardarbeitsanweisungen entnommen werden.

Lagerung und Stabilität von Proben während des Transports

Nasale Abstrichproben, die mit dem MSwab Entnahme-, Transport- und Konservierungssystem gesammelt wurden, sind für Transport und Lagerung bei 2–30 °C 4 Tage bzw. bei 2–8 °C 9 Tage und gefroren bei –20 °C mindestens 30 Tage lang haltbar, bevor sie auf dem **cobas**® 4800 System getestet werden (dies wurde durch Tests von Proben belegt, die nacheinander 4 Tage bei 15 ± 1 °C und 31 ± 1 °C, 5 Tage bei 2–8 °C und 30 Tage bei -20 ± 5 °C gelagert wurden).

Beim Transport von MRSA/SA-Proben sind die geltenden Vorschriften für den Transport von Krankheitserregern zu beachten.

Gebrauchsanleitung

Durchführung des Tests

Arbeitsablauf

Abbildung 1: Arbeitsablauf für cobas® MRSA/SA

1	System einschalten.
2	Wartung des Instruments durchführen.
3	Proben und Reagenzien aus der Lagerung nehmen.
4	Lauf starten: • Carrier mit Proben laden.
5	Mit LIS: Arbeitsliste bestätigen. Ohne LIS: Arbeitsliste erstellen.
6	Verbrauchsmaterial (Deep-Well-Platte, Mikrotiterplatte, Spitzen-Racks) und Reagenzien laden.
7	Probenaufarbeitungslauf starten.
8	Mikrotiterplatte entnehmen und verschließen.
9	Proben, verbrauchte Reagenzien und Deep-Well-Platte entnehmen.
10	Mikrotiterplatte in den Analyzer laden.
11	Ergebnisse überprüfen.
12	Mit LIS: Ergebnisse an LIS übertragen.
13	Analyzer leeren.

Testverfahren

Verfahren zur Probenentnahme

1. Es ist der flauschige Tupfer des MSwab Entnahmekits zu verwenden. Der Tupfer wird entweder trocken verwendet oder vor der Verwendung mit zwei Tropfen steriler physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet.
2. Den Tupfer vorsichtig in das Nasenloch des Patienten einführen (die Spitze des Tupfers sollte vom Rand des Nasenlochs bis zu 2,5 cm tief eingeführt werden).
3. Den Tupfer 3-mal an der Nasenschleimhaut rotieren.
4. Die Schritte 2 und 3 mit demselben Tupfer auch für das zweite Nasenloch durchführen.
5. Den Tupfer wieder in das Transportröhrchen geben. Den Stiel des Tupfers gegen den Rand des Röhrchens drücken, so dass er an der vorgesehenen Stelle abbricht.
6. Das Röhrchen fest verschließen und dabei sicherstellen, dass sich das obere Ende des Tupferstiels in der Mitte des Verschlusses befindet.
7. Probe etikettieren und gemäß den geltenden Standardarbeitsanweisungen zum Testlabor transportieren (siehe Abschnitt „**Lagerung und Stabilität von Proben während des Transports**“). Der Abschnitt „**Arbeitsablauf**“ enthält weitere Hinweise zu Proben.

Mit Ausnahme von MRSA/SA MMX und Cofactor-1 müssen alle Reagenzien vor dem Einsetzen in das **cobas®** x 480 Instrument auf Raumtemperatur gebracht werden. MRSA/SA MMX und Cofactor-1 können direkt aus ihrem Aufbewahrungsort (bei 2–8 °C) genommen und eingesetzt werden, da diese Komponenten bis zu ihrem Gebrauch im Verfahren auf dem **cobas®** x 480 Instrument Raumtemperatur erreicht haben werden.

Hinweis: Detaillierte Anweisungen sind der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen.

Umfang eines Laufs

Das **cobas®** 4800 System unterstützt Läufe mit verschiedenen Batches für den **cobas®** MRSA/SA-Test, den **cobas®** Cdiff-Test und den **cobas®** HSV-1 und -2-Test. Das generische Probenaufarbeitungskit für das **cobas®** 4800 System, das generische Lysekit 1 für das **cobas®** 4800 System und das generische Waschpufferkit für das **cobas®** 4800 System stehen jeweils in zwei Größen zur Verfügung, die für 10 Läufe mit 24 bzw. 96 Proben ausreichen (Kontrollen und Proben für alle auszuführenden Assays eingerechnet). Das **cobas®** 4800 MRSA/SA Amplifikations-/Detektionskit steht ebenfalls in zwei Größen zur Verfügung, die für 80 bzw. 240 Proben reichen (zu analysierende MRSA/SA-Kontrollen und Proben eingerechnet). In einem Lauf können wie erforderlich mehrere Fläschchen des **cobas®** 4800 MRSA/SA Master-Mix mitgeführt werden, sofern sie dieselbe Kitgröße besitzen. Das generische interne Kontrollkit 1 für das **cobas®** 4800 System und das **cobas®** 4800 MRSA/SA Kontroll- und Kofaktorkit stehen nur in einer Kitgröße zur Verfügung, die für 20 bzw. 10 Läufe ausreichen und für alle Laufkonfigurationen geeignet sind. Für jeden Lauf mit MRSA/SA-Proben muss eine **cobas®** 4800 MRSA/SA-Positivkontrolle und eine Negativkontrolle für das **cobas®** 4800 System mitgeführt werden (siehe Abschnitt „Qualitätskontrolle“). Für einen einzelnen Analyselauf beträgt die zulässige Höchstbeladung 94 Proben und zwei Kontrollen.

Hinweis: Auch wenn die Reagenzien dabei nicht optimal eingesetzt werden, kann ein generisches Reagenz für 96 Tests für einen Lauf mit 1 bis 22 Proben verwendet werden. Die verschiedenen Größen des Waschpufferkits (WB) für das cobas® 4800 System, des Probenaufarbeitungskits für das cobas® 4800 System und des Lysekits 1 für das cobas® 4800 System können jedoch nicht miteinander kombiniert werden. Wenn beispielsweise zu Beginn des Laufs eine WB-Reagenzflasche für 96 Tests gescannt wird, müssen auch die für 96 Tests vorgesehene Reagenzien aus den anderen beiden Kits verwendet werden.

Hinweis: Auch wenn die Reagenzien dabei nicht optimal eingesetzt werden, kann ein cobas® 4800 MRSA/SA MMX für 24 Tests für einen Lauf mit 1 bis 6 MRSA/SA-Proben verwendet werden. Einzelheiten zum Wechsel der Kitgröße sind der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen.

Arbeitsablauf

Der **cobas®** MRSA/SA-Test wird unter Verwendung des vollständigen Arbeitsablaufs in der **cobas®** 4800 Software durchgeführt. Dieser umfasst die Probenvorbereitung auf dem **cobas®** x 480 instrument und die anschließende Amplifikation/Detektion auf dem **cobas®** z 480 analyzer. Der Lauf kann als reiner MRSA/SA-Lauf oder als Mixed-Batch-Lauf mit dem **cobas®** Cdiff-Test und/oder dem **cobas®** HSV-1/2-Test durchgeführt werden. Detaillierte Informationen sind der Benutzerunterstützung des **cobas®** 4800 Systems zu entnehmen.

Proben

- Hinweis:** Der cobas® MRSA/SA-Test wurde zur Verwendung mit dem MSwab Entnahme-, Transport- und Konservierungssystem validiert. Es dürfen keine anderen Abstrichinstrumente oder Medienarten verwendet werden.
- Hinweis:** Eine fachgerecht entnommene nasale Abstrichprobe sollte einen Einzeltupfer (FLOQ Swab) enthalten, dessen Stiel vom Röhrchenverschluss fixiert wird. Proben ohne Tupfer oder mit mehreren Tupfern wurden nicht vorschriftsgemäß entnommen und sollten nicht getestet werden.
- Hinweis:** Nasale Abstrichproben, die blutig sind oder eine dunkelbraune Farbe aufweisen, dürfen nicht verarbeitet werden.
- Hinweis:** Die Proben müssen sich in Primärprobenröhrchen befinden, die mit einem Barcode-Etikett zur Verarbeitung auf dem cobas® x 480 Instrument versehen sind. Informationen zur korrekten Kennzeichnung mit Barcodes und eine Liste der zulässigen Barcodes für das cobas® 4800 System sind der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen.
- Hinweis:** Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wird empfohlen, die Primärröhrchen auf dem cobas® 4800 System zu verarbeiten, bevor andere Materialien getestet und verarbeitet werden.
- Hinweis:** Um eine Kreuzkontamination verarbeiteter Proben zu verhindern, sollten die MSwab Probenbehälter nach der Verarbeitung mit zusätzlich erhältlichen Verschlüssen in einer anderen Farbe (weiß; siehe „Zusätzlich erhältliches Material“) wieder verschlossen werden.
- Hinweis:** Das Volumen nasaler Abstrichproben, die in MSwab-Medium gesammelt wurden, ist ausreichend für zwei Analyseläufe auf dem cobas® 4800 System und kann auch für die Verarbeitung von Kulturen verwendet werden (siehe „Kultivierung klinischer Proben“), vorausgesetzt es wurde vor dem Test kein Probenmaterial verschüttet. Anweisungen zur Beimpfung von Kulturen sind der Packungsbeilage des MSwab Entnahme-, Transport- und Konservierungssystems zu entnehmen. Das für die Durchführung eines cobas® MRSA/SA-Laufs benötigte Mindestvolumen beträgt 700 µl im MSwab Primärprobenbehälter.

Durchführen des cobas® MRSA/SA-Tests

- Hinweis:** Es sind Mixed-Batch-Läufe mit dem cobas® MRSA/SA-Test und dem cobas® Cdiff-Test und/oder dem cobas® HSV-1/2-Test möglich. Weitere Informationen sind der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen.
1. Verfahren zum Starten und Warten des Systems gemäß den Anweisungen in der Benutzerunterstützung des **cobas®** 4800 Systems durchführen.
 2. Alle benötigten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien bereitstellen. Die Reagenzien müssen vor dem Start des Laufs auf Raumtemperatur gebracht werden, ausgenommen hiervon sind nur **cobas®** MRSA/SA MMX und Cofactor-1.
- Hinweis:** Alle Reagenzien und Reagenz-Reservoirs sind mit Barcodes versehen und für den Einmalgebrauch vorgesehen. Die cobas® 4800 Software erfasst die Verwendung der Reagenzien und Reagenz-Reservoirs und weist bereits verwendete Reagenzien oder Reagenz-Reservoirs zurück.

3. Das äußere Erscheinungsbild der nasalen Abstrichproben in MSwab-Medium beurteilen, um sicherzustellen, dass die im Abschnitt „**Proben**“ genannten Anforderungen erfüllt sind. Sicherstellen, dass alle Verschlüsse fest aufgebracht wurden. Die Probe mindestens 10 Sekunden im Vortexer mischen. Das Röhrchen öffnen (der Tupferstiel sollte im Verschluss stecken) und den Tupfer an der Innenseite des Röhrchens in kreisförmigen Bewegungen entlangreiben, um anhaftende Flüssigkeit abzustreifen. Den Verschluss mit dem Tupfer unmittelbar vor dem Laden in das **cobas**® 4800 System entsorgen. Der Tupfer muss zusammen mit dem Verschluss aus dem Röhrchen entnommen werden. Verbleibt der Tupfer im Probengefäß, kann der **cobas**® MRSA/SA-Test nicht ordnungsgemäß durchgeführt werden.
4. Einen neuen Lauf starten und die Arbeitsliste für den Lauf definieren. Es gibt drei Möglichkeiten zum Erstellen einer Arbeitsliste:
 - Über den Probeneditor, bevor das Probenrack in das **cobas**® x 480 Instrument geladen wird (Schaltfläche „Editor“ rechts im Hauptmenü). Arbeitslisten können bei Bedarf gespeichert, bearbeitet und erneut geladen werden.
 - Über den Softwareassistenten für den neuen Lauf und das Laden der Proben in das **cobas**® x 480 Instrument, wenn die Software dazu auffordert. Die Barcodes der Proben werden automatisch gescannt, und es muss die Ergebnisausgabe für jede Probe definiert werden.
 - Über das LIS der Einrichtung.

Detaillierte Informationen sind der Benutzerunterstützung des **cobas**® 4800 Systems zu entnehmen. Bei der Auswahl der Ergebnisausgabe entweder nur „MRSA“, sowohl „MRSA“ als auch „SA“ oder nur „SA“ markieren, je nachdem, welche Tests durchgeführt werden sollen. Wird beispielsweise nur „SA“ ausgewählt, werden keine MRSA-Ergebnisse ausgegeben.

5. Proben laden und wie erforderlich Arbeitsliste definieren/auswählen oder das LIS verwenden. Die Option „Unload sample carriers after transferring to deep well plate“ ist standardmäßig aktiviert. Sie ermöglicht es dem Benutzer, die verbleibenden Proben möglichst bald aus dem System zu nehmen, nachdem die Aliquote für die Verarbeitung auf dem **cobas**® x 480 Instrument entnommen wurden. Die Probengefäße können mit frischen Verschlüssen (siehe „**Zusätzlich erhältliches Material**“) verschlossen werden, wenn sie gelagert werden sollen.
6. Mit Hilfe des Softwareassistenten alle Verbrauchsmaterialien laden. Keine einzelnen Spitzen in ein teilweise bestücktes Spitzenrack laden oder daraus entnehmen, da die Software die Anzahl der verbleibenden Spitzen erfasst. Wenn die Zahl der Spitzen nicht ausreicht, um den Lauf durchzuführen, warnt die Software den Benutzer.
7. Die Reagenzien für die Probenaufarbeitung in die mit Barcodes versehenen Reagenz-Reservoirs laden. Die Reagenz-Reservoirs sind in zwei Größen verfügbar: 200 ml und 50 ml. Zur Auswahl des richtigen Reagenz-Reservoirs die Anweisungen des Softwareassistenten befolgen. Die Barcodes der Reagenz-Reservoirs müssen nach rechts zeigen. Die Reagenzien für die Probenaufarbeitung nach dem Prinzip „Scannen-Scannen-Befüllen-Platzieren“ laden:
 - Barcode der Reagenzflasche einscannen.
 - Barcode des Reagenz-Reservoirs einscannen.
 - Reagenz in das Reservoir gießen.
 - Das gefüllte Reagenz-Reservoir an der vorgegebenen Position im Reagenz-Carrier platzieren.

Hinweis: Das cobas® 4800 System verfügt über eine interne Uhr zum Messen des Zeitraums, über den sich die Reagenzien im System befinden. Nach dem Scannen des Waschpuffers (WB) muss innerhalb von 1 Stunde der Ladevorgang abgeschlossen und auf die Schaltfläche „Start“ geklickt werden. Auf der Registerkarte „Workplace“ wird ein Countdown angezeigt. Der Lauf kann nicht gestartet werden, wenn die Haltbarkeit im System abgelaufen ist.

Hinweis: Um sicherzustellen, dass die magnetischen Glaspartikel (MGP) richtig überführt werden, das MGP-Fläschchen unmittelbar vor dem Einfüllen in das Reagenz-Reservoir im Vortexer mischen und kräftig schütteln.

8. Amplifikations-/Detektionsreagenzien (MRSA/SA MMX und Cofactor-1), Proteinase K (PK) und Kontrollen [MRSA/SA (+) C, IC und (-) C] direkt in die Reagenz-Carrier laden. Um Kontaminationen zu verhindern, müssen nach der Handhabung von Positivkontrollen die Handschuhe gewechselt werden.

Hinweis: Der Softwareassistent berechnet die optimale Kitanzahl und -größe für das zu verwendende cobas® MRSA/SA MMX-Reagenz. Die Angabe erscheint in der Spalte „Kit size“ auf dem Ladebildschirm für das Laden von MMX und Kofaktor. Um cobas® MRSA/SA MMX in einer anderen Kitgröße zu verwenden, auf die Schaltfläche „Change kit size“ klicken.

9. Die Probenvorbereitung durch Klicken auf „Start run“ starten.
10. Nach erfolgreichem Abschluss des Probenvorbereitungslaufs werden die Schaltflächen „Sample Preparation results“ und „Unload“ verfügbar. Falls gewünscht, auf die Schaltfläche „Sample Preparation results“ klicken, um die Ergebnisse anzuzeigen, und dann auf „Unload“ klicken, um den Platten-Carrier zu entladen. Alternativ direkt auf „Unload“ klicken, um den Platten-Carrier zu entladen, ohne die Ergebnisse zu überprüfen. Hierzu die Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems beachten.
11. Gemäß den Anweisungen in der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems die Mikrotiterplatte versiegeln, die Platte zum cobas® z 480 Analyzer überführen und den Amplifikations-/Detektionslauf starten.

Hinweis: Das cobas® 4800 System verfügt über eine interne Uhr zum Messen des Zeitraums nach der Zugabe der vorbereiteten Proben zum aktivierten Master-Mix. Amplifikation und Detektion sollten so bald wie möglich und nicht später als 90 Minuten nach Ende des Laufs auf dem cobas® x 480 Instrument gestartet werden. Auf der Registerkarte „Workplace“ wird ein Countdown angezeigt. Der Lauf wird vom System abgebrochen, wenn der Countdown abgelaufen ist.

12. Nach Abschluss des Amplifikations- und Detektionslaufs die Mikrotiterplatte aus dem cobas® z 480 Analyzer nehmen.
13. Die Ergebnisse gemäß den Anweisungen in der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems überprüfen und akzeptieren.

Ergebnisse

Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse

In jedem Lauf wird ein Satz Positiv- und -Negativkontrollen für den **cobas®** MRSA/SA-Test mitgeführt. Damit die **cobas®** 4800 Software für einen Lauf die Ergebnisse des **cobas®** MRSA/SA-Tests anzeigt, müssen für den Lauf sowohl für die Positiv- als auch die Negativkontrolle gültige Ergebnisse erzielt werden.

Positivkontrolle

Die MRSA-Positivkontrolle enthält nicht-infektiöse DNA-Plasmide von MRSA und *Staphylococcus aureus*. Sie überwacht die Isolierung, Amplifikation und Detektion der Nukleinsäuren im jeweiligen Testlauf. Die Ergebnisse der MRSA/SA-Positivkontrolle müssen gültig („Valid“) sein. Wenn die MRSA/SA-Positivkontrolle durchweg ungültige Ergebnisse ergibt, den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung verständigen.

Negativkontrolle

Die Ergebnisse der Negativkontrolle (–) müssen gültig („Valid“) sein. Wenn die Negativkontrolle durchweg ungültige Ergebnisse ergibt, den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung verständigen.

Interne Kontrolle

Die interne Kontrolle ist ein Lambda-Phagen-Molekül, das randomisierte Sequenzen und Zielsequenzen für die Primer und die Sonde enthält, die spezifisch für die interne Kontrolle sind. Die interne Kontrolle wird bei der Probenaufarbeitung auf dem **cobas®** x 480 Instrument allen Proben sowie der Positiv- und der Negativkontrolle zugegeben. Die interne Kontrolle überwacht die Isolierung, Amplifikation und Detektion der Nukleinsäuren für die jeweilige Probe. Außerdem wird sie für die Validierung der Laufkontrollen benötigt.

Interpretation der Ergebnisse

Hinweis: Die gesamte Assay- und Laufvalidierung wird von der **cobas®** 4800 Software bestimmt.

Hinweis: Ein gültiger Lauf kann sowohl gültige als auch ungültige Probenergebnisse enthalten.

Bei einem gültigen Lauf werden die Probenergebnisse wie in Tabelle 1 dargestellt interpretiert.

Tabelle 1 Interpretation der Ergebnisse des cobas® MRSA/SA-Tests

cobas® MRSA/SA-Test	Angabe und Interpretation der Ergebnisse
Ergebnisausgabe „MRSA/SA“	
POS MRSA, POS SA	MRSA-positiv, SA-positiv Probe ist positiv für MRSA und SA.
NEG MRSA, NEG SA	MRSA-negativ*, SA-negativ* Es konnte kein MRSA oder SA (sofern vorhanden) nachgewiesen werden.
NEG MRSA, POS SA	MRSA-negativ*, SA-positiv MRSA (sofern vorhanden) konnte nicht nachgewiesen werden. Probe ist positiv für SA.
Invalid MRSA, POS SA	MRSA ungültig, SA-positiv MRSA-Ergebnis ist ungültig. Originalprobe neu testen, um ein gültiges MRSA-Ergebnis zu erhalten. Probe ist positiv für SA.
Invalid MRSA, NEG SA	MRSA ungültig, SA-negativ* MRSA-Ergebnis ist ungültig. Originalprobe neu testen, um ein gültiges MRSA-Ergebnis zu erhalten. SA (sofern vorhanden) konnte nicht nachgewiesen werden.
NEG MRSA, Invalid SA	MRSA-negativ*, SA ungültig MRSA (sofern vorhanden) konnte nicht nachgewiesen werden. SA-Ergebnis ist ungültig. Originalprobe neu testen, um ein gültiges SA-Ergebnis zu erhalten.
Invalid MRSA, Invalid SA	MRSA ungültig, SA ungültig Sowohl die MRSA- als auch die SA-Ergebnisse sind ungültig. Originalprobe neu testen, um gültige MRSA- und SA-Ergebnisse zu erhalten.
Failed	Keine Ergebnisse für die Probe Anweisungen zur Überprüfung der Flags für einen Lauf und empfohlene Aktionen sind der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen. Wurde eine Verklumpung festgestellt und ist das verbleibende Volumen ausreichend, sollte die Originalprobe mindestens 10 Sekunden lang im Vortexer gemischt und erneut getestet werden, um gültige MRSA- und SA-Ergebnisse zu erhalten.
Ergebnisausgabe „MRSA“	
POS MRSA	MRSA-positiv Probe ist positiv für MRSA.
NEG MRSA	MRSA-negativ* MRSA (sofern vorhanden) konnte nicht nachgewiesen werden.
Invalid MRSA	MRSA ungültig MRSA-Ergebnis ist ungültig. Originalprobe neu testen, um ein gültiges MRSA-Ergebnis zu erhalten.
Failed	Keine Ergebnisse für die Probe Anweisungen zur Überprüfung der Flags für einen Lauf und empfohlene Aktionen sind der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen. Wurde eine Verklumpung festgestellt und ist das verbleibende Volumen ausreichend, sollte die Originalprobe mindestens 10 Sekunden lang im Vortexer gemischt und erneut getestet werden, um gültige MRSA-Ergebnisse zu erhalten.

Tabelle 1 Interpretation der Ergebnisse des cobas® MRSA/SA-Tests (Fortsetzung)

cobas® MRSA/SA-Test	Angabe und Interpretation der Ergebnisse
Ergebnisausgabe „SA“	
POS SA	SA-positiv Probe ist positiv für SA.
NEG SA	SA-negativ* SA (sofern vorhanden) konnte nicht nachgewiesen werden.
Invalid SA	SA ungültig SA-Ergebnis ist ungültig. Originalprobe neu testen, um ein gültiges SA-Ergebnis zu erhalten.
Failed	Keine Ergebnisse für die Probe Anweisungen zur Überprüfung der Flags für einen Lauf und empfohlene Aktionen sind der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen. Wurde eine Verklumpung festgestellt und ist das verbleibende Volumen ausreichend, sollte die Originalprobe mindestens 10 Sekunden lang im Vortexer gemischt und erneut getestet werden, um gültige SA-Ergebnisse zu erhalten.

* Ein negatives Ergebnis schließt das Vorhandensein von MRSA und/oder SA nicht aus, da die Ergebnisse von einer korrekten Probenentnahme, dem Fehlen von Inhibitoren sowie einer ausreichenden Menge zu detektierender DNA abhängen.

Es kann zu ungültigen Ergebnissen kommen, wenn die Probe hemmende Substanzen enthält, die die Isolierung und/oder Amplifikation und Detektion der Ziel-Nukleinsäuren verhindern. Informationen zu bekannten Störsubstanzen sind dem Abschnitt „**Verfahreenseinschränkungen**“ zu entnehmen.

Der Test kann fehlschlagen, wenn die Probe Verklumpungen enthält, die die Probenaufarbeitung auf dem cobas® 4800 Instrument stören.

Liste der Ergebnis-Flags

In der folgenden Tabelle sind die zur Interpretation der Ergebnisse benötigten Flags aufgeführt.

Tabelle 2 Liste der Flags für den cobas® MRSA/SA-Test

cobas® MRSA/SA-Test	cobas® MRSA/SA-Test	Angabe und Interpretation der Ergebnisse
R20	Die Positivkontrolle ist ungültig.	Eine externe Kontrolle ist ungültig. 1. Den gesamten Lauf mit frischen Reagenzien wiederholen. 2. Wenn das Problem weiterhin besteht, den Roche Kundendienst verständigen.
R21	Die Negativkontrolle ist ungültig.	Eine externe Kontrolle ist ungültig. 1. Den gesamten Lauf mit frischen Reagenzien wiederholen. 2. Wenn das Problem weiterhin besteht, den Roche Kundendienst verständigen.
X3	Fehler: Es wurde eine Verklumpung erkannt; die Probe wurde nicht verarbeitet.	Sicherstellen, dass die Proben gemäß der Beschreibung des Arbeitsablaufs verarbeitet wurden. 1. Die Probe auf Verklumpungen untersuchen. 2. Die Probe erneut analysieren.
X4	Fehler: Es ist ein Pipettierfehler aufgetreten. Die Probe wurde nicht prozessiert.	Der wahrscheinlichste Grund ist ein unzureichendes Probenvolumen oder ein mechanischer Fehler während der Pipettierung. 1. Sicherstellen, dass ausreichend Probenvolumen vorhanden ist. 2. Sicherstellen, dass die Spitzenabwurfplatte richtig platziert ist. 3. Die Probe erneut analysieren.

Kultivierung klinischer Proben

Zum Zweck einer antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung oder epidemiologischen Typisierung können klinische Proben aus dem Entnahmemedium kultiviert werden. Anweisungen zur Verarbeitung von Kulturen sind der Packungsbeilage des COPAN MSwab Entnahme-, Transport- und Konservierungssystems zu entnehmen.

Hinweis: Das für die Durchführung eines einzelnen cobas® MRSA/SA-Tests benötigte Mindestvolumen beträgt 700 µl im MSwab Primärprobenbehälter. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wird empfohlen, die Primärröhrchen auf dem cobas® 4800 System zu verarbeiten, bevor Aliquote für Bakterienkulturen entnommen werden. Wenn vor der Durchführung des cobas® MRSA/SA-Tests Probenaliquote für Kulturen entnommen werden müssen, müssen mindestens 700 µl der Probe im Röhrchen verbleiben und es ist beim Umgang mit der Probe äußerst umsichtig vorzugehen. Werden Proben volumina von weniger als 700 µl getestet, kann dies zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Verfahrenseinschränkungen

1. Der cobas® MRSA/SA-Test wurde nur zur Verwendung mit nasalen Abstrichproben validiert, die mit dem MSwab Entnahme-, Transport- und Konservierungssystem gesammelt wurden.
2. Zuverlässige Ergebnisse sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Entnahme, Transport, Lagerung und Bearbeitung der Proben gewährleistet. Die in der vorliegenden Gebrauchsanweisung (Packungsbeilage), in den Packungsbeilagen für das MSwab Entnahme-, Transport- und Konservierungssystem sowie in der Benutzerunterstützung für das cobas® 4800 System beschriebenen Vorgehensweisen sind zu befolgen.
3. Die Detektion von MRSA und SA hängt von der Anzahl der in der Probe enthaltenen Organismen ab und kann durch das Probenentnahmeverfahren, patientenbezogene Faktoren (Kolonisierungsstatus, bisherige Krankenhausaufenthalte, Behandlung mit Antibiotika, Kontakt zu MRSA-Trägern) und/oder den MRSA/SA-Stämmen beeinflusst werden.
4. Verschiedene Störsubstanzen können zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen. Der cobas® MRSA/SA-Test umfasst eine interne Kontrolle zur Erkennung von Proben, die Stoffe enthalten, die bei der Isolierung von Nukleinsäuren und der PCR-Amplifikation störend wirken. Zu den bekannten Störeinflüssen gehören unter anderem:
 - Proben mit einem Blutanteil von mehr als 75 % (Vol.-%) pro Abstrich können zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Proben mit dunkelroter oder brauner Färbung dürfen nicht getestet werden.
 - Proben mit einem Schleimanteil von mehr als 10 % (Massenvol.-%) pro Abstrich können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
 - Proben mit einem Anteil von mehr als 15 % (Massenvol.-%) Rhinaris® Nasen-Gel pro Abstrich können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
 - Proben mit einem Anteil von mehr als 25 % (Vol.-%) Releev Tinktur gegen Herpes pro Abstrich können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
5. Ein positives Ergebnis zeigt das Vorliegen von MRSA-DNA und nicht zwingend das Vorliegen lebensfähiger Organismen an. Daher bedeutet ein positives Ergebnis nicht zwangsläufig, dass eine Eradikationstherapie fehlgeschlagen ist. Ein negatives Ergebnis, das auf ein zuvor positives Testergebnis folgt, kann auf den Erfolg einer Eradikationstherapie hinweisen oder durch eine zeitweilige Kolonisierung bedingt sein.

6. Mit dem **cobas**® MRSA/SA-Test können das *mecA*-Gen und das Penicillinbindeprotein (PBP 2a), das von diesem Gen kodiert wird, nicht direkt detektiert werden. Ein falsch-positives MRSA-Ergebnis kann auftreten, wenn eine „leere Kassette“ einer *Staphylococcus aureus*-Variante vorliegt.
7. Mutationen oder Polymorphismen in Primer- und Sonden-Bindungsregionen können die Detektion neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen, so dass der **cobas**® MRSA/SA-Test ein falsch-negatives Ergebnis liefert.
8. Der prädiktive Wert eines Assays hängt von der Prävalenz der Erkrankung in einer bestimmten Population ab.
9. Die Zugabe des Enzyms AmpErase zum **cobas**® 4800 MRSA/SA Master-Mix ermöglicht eine selektive Amplifikation der Ziel-DNA; es ist jedoch eine gute Laborpraxis sowie die genaue Einhaltung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren erforderlich, um eine Kontamination der Reagenzien und Amplifikationsansätze zu vermeiden.
10. Dieses Produkt darf nur von Personal verwendet werden, das in der PCR-Technik und der Verwendung des **cobas**® 4800 Systems geschult ist.
11. Für die Verwendung mit diesem Produkt wurden ausschließlich das **cobas**® x 480 Instrument und der **cobas**® z 480 Analyzer validiert. Kein anderes Probenaufarbeitungs- oder PCR-System darf mit diesem Produkt verwendet werden.
12. Bevor Benutzer zwischen verschiedenen Verfahren wechseln, sollten sie aufgrund der inhärenten Unterschiede zwischen den Verfahren in ihrem Labor Studien zur Korrelation der Methoden durchführen, um die Unterschiede der Verfahren zu ermitteln. Eine hundertprozentige Übereinstimmung der Ergebnisse ist aufgrund der bereits erwähnten Unterschiede zwischen den Verfahren nicht zu erwarten.
13. Kreuzkontaminationen können zu falsch-positiven Ergebnissen führen. In einer nicht-klinischen Studie lag die Kreuzkontaminationsrate von Probe zu Probe mit dem **cobas**® MRSA/SA-Test auf dem **cobas**® 4800 System bei 0 %. Eine Kreuzkontamination von Lauf zu Lauf wurde nicht beobachtet.

Nicht-klinische Leistungsmerkmale

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität (Nachweisgrenze oder LoD, Limit of Detection) des **cobas®** MRSA/SA-Tests wurde durch die Analyse quantifizierter MRSA- und SA-Kulturisolate in verschiedenen Konzentrationen mit mindestens 61 Replikaten pro Konzentration bestimmt. Die Testproben wurden vorbereitet, indem FLOQ Tupfer mit Kulturen versetzt wurden und der Tupfer in einer simulierten nasalen Abstrichmatrix inkubiert wurde. Die simulierte Matrix, bestehend aus Schleim und Humanzellen, ahmt den Effekt des Hintergrunds der klinischen nasalen Abstrichproben im **cobas®** MRSA/SA-Test nach. Alle Panelproben wurden mit dem **cobas®** MRSA/SA-Test über drei Chargen von **cobas®** MRSA/SA-Testreagenzien getestet. Die Nachweisgrenze (LoD) dieses Tests ist als diejenige Zielkonzentration definiert, die bei $\geq 95\%$ der getesteten Replikate als positiv nachgewiesen werden kann, bezogen auf die Ergebnisse der Reagenzcharge mit der schlechtesten Leistung.

Zwei MRSA-Isolate und ein SA-Isolat wurden im Rahmen der Untersuchung der analytischen Sensitivität getestet. Die Nachweisgrenze des **cobas®** MRSA/SA-Tests für diese Isolate ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 Nachweisgrenze (LoD) des **cobas®** MRSA/SA-Tests

Organismus	Ursprung	Ursprungs-ID	RE-Typ	SCCmec-Typ	spa-Typ	PFGE-Typ	MHK-Wert	Getestete Konzentrationen	LoD (CFU/Abstrich)
MRSA	NARSA	NRS384	2	IVa	t008	USA300-0114	32	9	650
MRSA	ATCC	43300	2	II	t007	Sac-15	N/A	8	700
SA	NARSA	NRS164	N/A	N/A	t084	N/A	N/A	8	700

N/A = nicht zutreffend

Detektion von MRSA- und SA-Genotypen

Zur Überprüfung der Nachweisgrenze des **cobas®** MRSA/SA-Tests wurden 35 MRSA-Isolate und fünf SA-Isolate in verschiedenen Konzentrationen mit jeweils 40 Replikaten analysiert. Die Isolate stellten gängige Genotypen dar, einschließlich der RE-Typen 1, 2, 3, 4, 6, der MRSA-SCCmec-Typen I, II, III, IV, V, VI und VIII sowie der MRSA-PFGE-Typen USA 100 bis 1000 (PFGE, Pulsfeldgelelektrophorese). Die genetische Diversität dieser MRSA/SA-Auswahl ist durch die Integration verschiedener SCCmec-Typen, MREJ-Typen und spa-Typen, die auf der Grundlage der phylogenetischen Struktur in der Spezies *Staphylococcus aureus* vorkommen, sowie repräsentativer Stämme verschiedener PFGE-Typen gewährleistet. Die Verdünnungen und Analyseproben wurden in ähnlicher Weise wie bei der zuvor beschriebenen Studie zur Nachweisgrenze hergestellt. Die niedrigsten Konzentrationen, bei denen noch eine Trefferquote von mindestens 95 % erreicht wurde, sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 angegeben. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass der **cobas®** MRSA/SA-Test bei Nachweisgrenzen zwischen 175 und 750 CFU/Abstrich alle 35 MRSA und alle fünf SA-Stämme korrekt detektiert. Die detektierten Stämme stellen mindestens acht SCCmec-Typen (I, II, III, IV, V, VI, VIII und neu), 10 MREJ-Typen, 21 spa-Typen und neun PFGE-Typen dar und erstrecken sich über Cefoxitin-MHK-Werte von 8 bis über 32.

Tabelle 4 Nachweisgrenze (LoD) des cobas® MRSA/SA-Tests für verschiedene MRSA-Genotypen

MRSA-Isolat Nr.	RE-Typ	SCCmec-Typ	spa-Typ	MHK-Wert	PFGE-Typ	LoD (CFU/Abstrich)
1	11	neu	t002	>32	Unbekannt	485
2	6	II	t242	>32	Unbekannt	720
3	9/11	neu	t024	16	Unbekannt	175
4	14	Unbekannt	Unbekannt	Unbekannt	Unbekannt	700
5	25	Unbekannt	t003	>32	Unbekannt	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	Iberian	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	neu	t476	8	Unbekannt	350
31	1	I	t149	>32	Unbekannt	175
32	3	VIII	Unbekannt	16	Unbekannt	700
33	4	IV	Unbekannt	12	Unbekannt	350
34	2	III	t030	>32	Unbekannt	700
35	25	VI	Unbekannt	Unbekannt	Unbekannt	175

Tabelle 5 Nachweisgrenze (LoD) des **cobas**® MRSA/SA-Tests für verschiedene SA-Genotypen

SA-Isolat Nr.	<i>spa</i> -Typ	LoD (CFU/Abstrich)
1	t238	175
2	t018	175
3	t008	175
4	t002	175
5	t088	175

Geografische Subtypenerfassung

Zusätzlich zu den 37 MRSA-Isolaten und sechs SA-Isolaten in den oben erläuterten Studien zur analytischen Sensitivität und der Genotyp-Subtypenerfassung wurden 281 MRSA-Isolate und 85 SA-Isolate aus verschiedenen geografischen Regionen in Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze des **cobas**® MRSA/SA-Tests getestet. Die 281 MRSA-Isolate aus 16 verschiedenen Ländern enthielten MRSA-Isolate verschiedener SCCmec-Typen (I, II, III, IV, IVa, V, VI, VII und neu), 71 *spa*-Typen und Cefoxitin-MHK-Werte von 6 bis über 256. Die 85 SA-Isolate aus unterschiedlichen Orten in den USA enthielten SA-Isolate 75 verschiedener *spa*-Typen. Der **cobas**® MRSA/SA-Test detektierte alle 85 SA-Isolate. 277 der 281 MRSA-Isolate wurden detektiert. Die vier MRSA-Isolate, die vom **cobas**® MRSA/SA-Test nicht detektiert wurden, waren sequenziert und die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Zielregionen Sequenzen enthielten, die von den Primern und Sonden des **cobas**® MRSA/SA-Tests nicht erkannt werden können. Bei einem der vier Isolate handelte es sich um den Stamm mecALGA251 (auch als mecC bekannt). Die Ursprungsländer der MRSA-Isolate sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6 Geografische Subtypenerfassung für den cobas® MRSA/SA-Test

Ursprungsland	Gesamtzahl von MRSA-Isolaten	Mit dem cobas® MRSA/SA-Test detektiert
Vereinigtes Königreich	58	58
Deutschland	51	51
Dänemark	37	36
Frankreich	33	31
USA	20	20
Spanien	20	20
Schweiz	18	18
Japan	15	15
Schweden	7	7
Australien	6	5
Niederlande	5	5
Italien	4	4
Belgien	3	3
Schottland	2	2
Irland	1	1
Norwegen	1	1
Gesamt	281	277

Präzision

Die interne Präzisionsstudie wurde mit zwei MRSA-Isolaten und einem SA-Isolat bestimmt, die in einer simulierten nasalen Abstrichmatrix auf Konzentrationsstufen unterhalb der Nachweisgrenze (LoD), nahe der Nachweisgrenze und über der Nachweisgrenze des cobas® MRSA/SA-Tests verdünnt wurden. Eine negative Konzentrationsstufe, die nur aus der simulierten nasalen Abstrichmatrix bestand, wurde ebenfalls analysiert. Die Tests wurden über 12 Tage in insgesamt 36 Läufen auf drei Geräten mit drei verschiedenen Chargen von cobas® MRSA/SA-Testreagenzien durchgeführt. Tabelle 7 enthält eine Beschreibung der Panels zur Bestimmung der Präzision und die Leistung der Studie als Trefferquote. Die Analyse der Varianz der Ct-Werte aus Tests mit positiven Panelproben über der Nachweisgrenze (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9) ergab Gesamt-VK-Werte (in %) von 0,8 % bis 1,3 % für MRSA-Ct und 1,2 % für SA-Ct.

Tabelle 7 Analyse der Trefferquote aus der Studie zur internen Präzision

Panelprobe	Isolat	Konzentration der Zielsequenz	Anz. getestet	Anz. Positive	Treffer quote	95 %-KI	
						Untere Grenze	Obere Grenze
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	Keine	Negativ	72	0	0,0 %	0,0 %	5,0 %

Tabelle 8 Analyse der Varianzkomponenten für die Panelproben über der Nachweisgrenze in der Präzisionsstudie

Stamm	Mittlerer Ct	Varianzkomponenten/prozentualer Einfluss zum Gesamtwert					Gesamt
		Charge	Kitgröße	Instrument	Lauf	Zufall	
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 %

Tabelle 9 Analyse der Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (%) für die Panelproben über der Nachweisgrenze in der Präzisionsstudie

Stamm	Mittlerer Ct	SD-Komponenten/VK (%)					Gesamt
		Charge	Kitgröße	Instrument	Lauf	Zufall	
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 %

Kompetitive Hemmung

Es wurden Panels aus zwei MRSA-Isolaten als Zielsequenzen in Konzentrationen der 3fachen Nachweisgrenze des **cobas®** MRSA/SA-Tests und kompetitiven *Staphylococcus aureus*-Isolaten und Methicillin-resistenten *Staphylococcus epidermidis*-Isolaten (MRSE) in steigenden Konzentrationen gebildet. Die steigende Konzentration von SA oder MRSE hatte keine Auswirkung auf die Detektion der MRSA/SA-Zielsequenzen, wie der relativ stabile Ct-Wert belegt (Tabelle 10).

Tabelle 10 Untersuchung der kompetitiven Hemmung für MRSA mittels SA (Ct-Werte)

Kompetitiver Organismus (Konzentration)	Zielsequenz		
	MRSA 10364	MRSA 8065	SA 10851
<i>Staphylococcus aureus</i> 10851 (1 Zielsequenz)	38,2	38,8	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i> 10851 (100 Zielsequenzen)	38,1	39,1	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i> 10851 (10.000 Zielsequenzen)	38,4	38,8	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i> 10852 (1 Zielsequenz)	38,1	39,0	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i> 10852 (100 Zielsequenzen)	38,5	39,3	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i> 10852 (10.000 Zielsequenzen)	37,4	39,0	N/A
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5649 (1 Zielsequenz)	37,9	39,5	36,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5649 (100 Zielsequenzen)	38,6	38,6	36,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5649 (10.000 Zielsequenzen)	38,1	39,7	37,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5657 (1 Zielsequenz)	39,0	40,1	36,9
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5657 (100 Zielsequenzen)	38,4	39,1	36,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5657 (10.000 Zielsequenzen)	38,3	39,7	36,7

Analytische Spezifität

Zur Bestimmung der analytischen Spezifität des **cobas**® MRSA/SA-Tests wurden die folgenden Panels getestet: 1) 92 Bakterien, Pilze und Viren, die in nasalen Abstrichproben vorkommen können (Tabelle 11); 2) Humanzellen (Tabelle 11); 3) 43 Organismen der Gattung koagulasenegativer *Staphylococcus* (CoNS) und Methicillin-resistenter koagulasenegativer *Staphylococcus* (MR-CoNS) (Tabelle 12); 4) 10 Borderline-Methicillin-resistente SA-Isolate (BORSA) und zwei SA-Isolate ausschließlich zur MRSA-Spezifität (Tabelle 13).

Alle Bakterien und Humanzellen wurden mit Ausnahme von *Chlamydia pneumoniae* durch Versetzen auf eine Konzentration von mindestens 1×10^6 Einheiten*/ml eingestellt. Alle Viren wurden durch Versetzen auf die höchste Konzentration eingestellt, die für die jeweilige Stammkultur zulässig war (1×10^5 Einheiten*/ml, außer für das Adenovirus Typ 1 und das Influenzavirus A/H1N1). Getestet wurden die Organismen alleine oder mit zwei MRSA-Isolaten und einem SA-Isolat, die in einer der 3fachen Nachweisgrenze (LoD) des **cobas**® MRSA/SA-Tests entsprechenden Konzentration vorlagen. Die Ergebnisse zeigten an, dass keiner der Organismen die Detektion der vorgesehenen MRSA- oder SA-Zielsequenzen störte. In keinem Fall kam es zu falsch-positiven Ergebnissen, wenn keine vorgesehene MRSA/SA-Zielsequenz vorhanden war.

*Alle Bakterien wurden in CFU (Colony Forming Units, koloniebildende Einheiten) quantifiziert, mit Ausnahme von *Chlamydia pneumoniae*, welches in DNA-Kopien quantifiziert wurde. Das humane Metapneumovirus wurde in Virenpartikeln quantifiziert. Folgende Viren wurden in PFU (Plaque Forming Units, plaque-bildende Einheit) quantifiziert: Adenovirus Typ 1, 7 und 40, humanes Enterovirus, HSV1, Influenza A/H3N2A/Hong Kong/8/68, Masernvirus, Mumpsvirus, Parainfluenzavirus Typ 1, Parainfluenzavirus Typ 2, und Parainfluenzavirus Typ 3, Coronavirus 229E, Coronavirus OC43, Cytomegalovirus und Rhinovirus. RSV A und RSV B wurden in TCID₅₀-Einheiten quantifiziert. Das Influenzavirus A/H1N1 und Influenzavirus Typ B wurden in EID₅₀-Einheiten quantifiziert. EBV wurde in Kopien quantifiziert.

Tabelle 11 Häufig in der Nasenflora vorkommende getestete Mikroorganismen für die Ermittlung der analytischen Spezifität

<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> (Carbapenemase bildend) ATCC # 700603	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Carbapenemase bildend) 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>Adenovirus 40</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Microbacterium testaceum</i>	<i>Coronavirus 229E</i>
<i>Chlamydia pneumoniae</i> *	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Coronavirus OC43</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Cytomegalievirus</i>
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis avirulent</i>	<i>Epstein-Barr-Virus</i>
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>HSV 1</i>
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>	<i>Humanes Adenovirus Typ 1*</i>
<i>Corynebacterium flavesces</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Humanes Adenovirus Typ 7A</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Humanes Enterovirus 71</i>
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>Pasteurella aerogenes</i>	<i>Humanes Metapneumovirus</i>
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>Planococcus maritimus</i>	<i>Influenza A/H1N1</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Influenzavirus A/H3N2 A/ Hong Kong/8/68</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Influenza B</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Masernvirus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Mumps-Virus</i>
<i>Enterococcus flavescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Parainfluenza 1</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Parainfluenza 2</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Rothia mucilaginosa</i>	<i>Parainfluenza 3</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica subsp. Enterica</i>	<i>Rhinovirus Typ 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>HCT-15-Zellen (humane genomische DNA)</i>

* *Chlamydia pneumoniae* wurde in einer Konzentration von $1,0 \times 10^5$ Kopien/ml und das Adenovirus Typ 1 in einer Konzentration von $1,0 \times 10^4$ PFU/ml getestet.

Tabelle 12 Eng verwandte CoNS- und MR-CoNS-Organismen, die zur Ermittlung der Spezifität getestet wurden

<i>Staphylococcus arlettae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC27676 (Methicillin-resistent)	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
<i>Staphylococcus auricularis</i> (Methicillin-resistent)	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>
<i>Staphylococcus caprae</i> (Methicillin-resistent)	<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 (Methicillin-resistent)	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC43252	<i>Staphylococcus simulans</i> ATCC27848 (Methicillin-resistent)
<i>Staphylococcus delphini</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> ATCC25615	<i>Staphylococcus simulans</i> ATCC11631
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC14990 (Methicillin-resistent)	<i>Staphylococcus hominis</i> ATCC35982	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC27836 (Methicillin-resistent)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC35547 (Methicillin-resistent)	<i>Staphylococcus hominis</i> ATCC27844	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC27839 (Methicillin-resistent)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC35983 (Methicillin-resistent)	<i>Staphylococcus hominis</i> ATCC27845	<i>Staphylococcus warneri</i> RMSCC1224
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC35984 (Methicillin-resistent)	<i>Staphylococcus intermedius</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC35663
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC51624 (Methicillin-resistent)	<i>Staphylococcus kloosii</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC29971
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC51625 (Methicillin-resistent)	<i>Staphylococcus lentus</i>	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC700583	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	-

Tabelle 13 Getestete SA- und BORSA-Isolate zur Ermittlung der MRSA-Spezifität

<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)

Störeinflüsse

Es wurden die potentiellen Störeinflüsse von 25 gängigen Medikamenten für den Nasen- und Rachenraum sowie von Vollblut und Schleim auf den **cobas®** MRSA/SA-Test untersucht. Alle Substanzen wurden in Konzentrationen getestet, die über den bei nasalen Abstrichproben zu erwartenden Werten lagen. Die Menge der Störsubstanz wird als Prozentsatz der Menge angegeben, die maximal von einem Tupfer aufgenommen werden kann. Zwei MRSA-Isolate und ein SA-Isolat wurden auf eine Konzentration an der 3fachen Nachweisgrenze (LoD) des **cobas®** MRSA/SA-Tests gebracht und in den Tests als Zielorganismen verwendet. Bei exogenen Substanzen wurden bis 100 % der Tupferkapazität keine Störeinflüsse festgestellt, mit Ausnahme von Relenza® (kein Störeinfluss bis 6,25 % der Tupferkapazität), Rhinaris® Nasen-Gel (kein Störeinfluss bis 15 % der Tupferkapazität) und Releev (kein Störeinfluss bis 25 % der Tupferkapazität). Es ist zu beachten, dass Relenza® nur bis 6,25 % der Tupferkapazität getestet wurde, da dies bereits die Gesamtmenge einer normalen Anwendung des Medikaments laut Packungsbeilage darstellt. Bei Vollblut wurde bis 75 % der Tupferkapazität kein Störeinfluss beobachtet; bei Schleim wurde bis 10 % der Tupferkapazität kein Störeinfluss beobachtet. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14 Ergebnisse der Tests von Störsubstanzen

Substanz	Ergebnisse
Vollblut	Kein Störeinfluss bis 75 % der Tupferkapazität
Schleim	Kein Störeinfluss bis 10 % der Tupferkapazität
Afrin Nasenspray	Kein Störeinfluss
Beconase Nasenspray	Kein Störeinfluss
Bepanthen® Nasensalbe	Kein Störeinfluss
Chloraseptic Max Lutschpastillen	Kein Störeinfluss
Fluticasone Propionate (50 mcg) Nasenspray	Kein Störeinfluss
FluMist® (Afluria, Gripeschutzimpfung)	Kein Störeinfluss
Flunisolide Nasenspray USP, 0,025 %	Kein Störeinfluss
Mupirocin Salbe	Kein Störeinfluss
Dristan™ Nasenspray	Kein Störeinfluss
Luffeel™	Kein Störeinfluss
Triamcinolone Acetonide Nasenspray	Kein Störeinfluss
NasalCrom Nasenspray	Kein Störeinfluss
Nasonex Nasenspray	Kein Störeinfluss
Neo-Synephrine	Kein Störeinfluss
Otrivin Nasenspray	Kein Störeinfluss
Relenza®	Kein Störeinfluss bis 6,25 % der Tupferkapazität
Budesonide Inhalationsspray 0,25 mg/2 ml	Kein Störeinfluss
Azelastin HCl Nasenspray	Kein Störeinfluss
Equate Nasenspray mit Kochsalzlösung zur Befeuchtung der Nase	Kein Störeinfluss
Rhinaris® Nasen-Gel	Kein Störeinfluss bis 15 % der Tupferkapazität
Tobramycin and Dexamethasone Augentropfen	Kein Störeinfluss
Releev (gegen Herpes)	Kein Störeinfluss bis 25 % der Tupferkapazität
Zicam Nasen-Gel	Kein Störeinfluss
QVAR (40 mcg) Inhalationsaerosol	Kein Störeinfluss
Nostrilla	Kein Störeinfluss

* Diese Konzentration ist die Gesamtmenge von Relenza®, die laut Packungsbeilage bei einer Einzeldosis verabreicht wird.

Klinische Leistung bei Verwendung klinischer Proben

Die Leistung des **cobas®** MRSA/SA-Tests wurde mit der Leistung eines von der FDA zugelassenen und CE-gekennzeichneten NAT (Nukleinsäuretests) auf dem neuesten Stand der Technik verglichen. Dabei wurde eine Kombination aus Bakterien-Direktkultur und -Anreicherungskultur als Referenzmethode herangezogen. Von jeder an der Studie teilnehmenden Testperson wurden je zwei nasale Abstrichproben entnommen. Die Probe für den **cobas®** MRSA/SA-Test wurde mit dem MSwab Entnahme-, Transport- und Konservierungssystem entnommen und die Probe für den Vergleichstest wurde mit Liquid Stuart-Tupfern entnommen. Mit der MSwab-Probe wurden je eine Platte chromogenes Selektiv- und Differentialmedium für MRSA und für SA (Direktkultur) sowie ein Röhrchen mit Trypticase-Soja-Bouillon (TSB) mit 6,5 % NaCl zur Anreicherung über Nacht (Anreicherungskultur) beimpft. Die Anreicherungskultur wurde anschließend auf chromogene Medien aufgebracht. Mutmaßlich SA-positive Kolonien auf chromogenen Medien wurden mit einem Latex-Agglutinationstest (Staphraurex®, Remel Microbiology Products, Thermo Scientific, Inc.) bestätigt. Mutmaßlich MRSA-positive Kolonien wurden mit einem Cefoxitin-Blättchen-Diffusionstest bestätigt.

Es nahmen insgesamt 383 Testpersonen von zwei Zentren in der EU an der Studie teil. Vier Testpersonen wurden aufgrund unvollständiger Ergebnisse für einen der beiden Tests ausgeschlossen. In der Kombination aus Bakterien-Direktkultur und -Anreicherungskultur waren 27 Proben MRSA-positiv und 144 Proben SA-positiv (Prävalenz: MRSA 7,1 %, SA 38,0 %). Die Leistung des **cobas®** MRSA/SA-Tests und des Vergleichs-NAT im Vergleich zur Direktkultur ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15 **cobas®** MRSA/SA-Test und Vergleichs-Nukleinsäuretest (NAT) im Vergleich zur Direktkultur

MRSA		Direktkultur	
		Positiv	Negativ
cobas® MRSA/SA	Positiv	15	18
	Negativ	1	345
	Schätzung	95 % KI Unt. Grenze	95 % KI Ob. Grenze
Sensitivität		94 %	100 %
Spezifität		95 %	97 %

SA		Direktkultur	
		Positiv	Negativ
cobas® MRSA/SA	Positiv	121	29
	Negativ	5	224
	Schätzung	95 % KI Unt. Grenze	95 % KI Ob. Grenze
Sensitivität		96 %	99 %
Spezifität		89 %	92 %

MRSA		Direktkultur	
		Positiv	Negativ
Vergleichs- NAT	Positiv	14	16
	Negativ	2	347
	Schätzung	95 % KI Unt. Grenze	95 % KI Ob. Grenze
Sensitivität		88 %	98 %
Spezifität		96 %	97 %

SA		Direktkultur	
		Positiv	Negativ
Vergleichs- NAT	Positiv	122	31
	Negativ	4	222
	Schätzung	95 % KI Unt. Grenze	95 % KI Ob. Grenze
Sensitivität		97 %	99 %
Spezifität		88 %	92 %

Die Leistung des **cobas®** MRSA/SA-Tests und des Vergleichs-NAT im Vergleich zur Direkt-/Anreicherungskultur ist in Tabelle 16 dargestellt. In dieser Analyse wird ein positives Ergebnis aus der Direkt- oder der Anreicherungskultur als positiv betrachtet. Ein negatives Ergebnis liegt nur dann vor, wenn sowohl die Ergebnisse der Direktkultur als auch die der Anreicherungskultur negativ sind.

Tabelle 16 cobas® MRSA/SA-Test und Vergleichs-Nukleinsäuretest (NAT) im Vergleich zur Direkt-/Anreicherungskultur

MRSA		Direkt-/ Anreicherungskultur	
cobas® MRSA/SA	Positiv	Positiv	Negativ
	Negativ	25	8
		95 % KI	95 % KI
	Schätzung	Unt. Grenze	Ob. Grenze
Sensitivität	93 %	76 %	99 %
Spezifität	98 %	96 %	99 %

SA		Direkt-/ Anreicherungskultur	
cobas® MRSA/SA	Positiv	Positiv	Negativ
	Negativ	137	13
		95 % KI	95 % KI
	Schätzung	Unt. Grenze	Ob. Grenze
Sensitivität	95 %	90 %	98 %
Spezifität	94 %	91 %	97 %

MRSA		Direkt-/ Anreicherungskultur	
Vergleichs- NAT	Positiv	Positiv	Negativ
	Negativ	24	6
		95 % KI	95 % KI
	Schätzung	Unt. Grenze	Ob. Grenze
Sensitivität	89 %	71 %	98 %
Spezifität	98 %	96 %	99 %
NPV	99 %	98 %	100 %
PPV	80 %	61 %	92 %

SA		Direkt-/ Anreicherungskultur	
Vergleichs- NAT	Positiv	Positiv	Negativ
	Negativ	138	15
		95 % KI	95 % KI
	Schätzung	Unt. Grenze	Ob. Grenze
Sensitivität	96 %	91 %	98 %
Spezifität	94 %	90 %	96 %
NPV	97 %	94 %	99 %
PPV	90 %	84 %	94 %

Die Leistung des **cobas®** MRSA/SA-Tests im direkten Vergleich mit einem von der FDA zugelassenen und CE-gezeichneten Vergleichs-NAT auf dem neuesten Stand der Technik ist schließlich in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17 cobas® MRSA/SA-Test im Vergleich zum Vergleichs-Nukleinsäuretest (NAT)

MRSA		Vergleichs-NAT	
cobas® MRSA/SA	Positiv	Positiv	Negativ
	Negativ	28	5
		95 % KI	95 % KI
	Schätzung	Unt. Grenze	Ob. Grenze
Positive Übereinstimmung	93 %	78 %	99 %
Negative Übereinstimmung	99 %	97 %	100 %

SA		Vergleichs-NAT	
cobas® MRSA/SA	Positiv	Positiv	Negativ
	Negativ	144	6
		95 % KI	95 % KI
	Schätzung	Unt. Grenze	Ob. Grenze
Positive Übereinstimmung	94 %	89 %	97 %
Negative Übereinstimmung	97 %	94 %	99 %

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des **cobas**® MRSA/SA-Tests auf dem **cobas**® 4800 System wurde in einer multi-zentrischen Studie anhand von künstlich hergestellten klinischen Proben unter Berücksichtigung der Faktoren Charge, Testort/Gerät, Anwender, Tag und Lauf bestimmt.

Die zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit des MRSA/SA-Tests verwendeten Panels wurden erstellt, indem einer künstlich hergestellten Probenmatrix (simulierte klinische MSwab-Nasalabstriche mit Schleim und menschlichen Epithelzellen) die MRSA-Stämme NRS384 (MRSA-384) und ATCC 43300 (MRSA-43300) bzw. der SA-Stamm RMSCC 10851 in einer von drei Konzentrationen (Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze, in Höhe der 1fachen Nachweisgrenze oder in Höhe der 3fachen Nachweisgrenze) zugesetzt wurde. Als Negativkontrolle war im Panel eine MRSA/SA-negative Panelprobe enthalten. Insgesamt umfasste jeder Lauf pro Testpanel 10 Proben, für die es jeweils 3 Replikate gab. Die Panels wurden in 3 Testzentren von jeweils 2 Anwendern getestet, von denen jeder über 5 Tage mit 2 Chargen täglich 1 Lauf pro Charge durchführte, sodass sich eine Gesamtzahl von 1800 Tests ergibt (180 Tests/Panelprobe bzw. 90 Tests/Panelprobe/Charge). Insgesamt wurden 60 Läufe durchgeführt. Alle Läufe waren gültig. Kein Test schlug fehl/war ungültig.

Reproduzierbarkeits-Ergebnisse für MRSA

Tabelle 18 fasst die Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie für MRSA zu Ct-Wert und prozentualer Übereinstimmung (exaktes zweiseitiges 95-%-KI) nach Testort und Panelprobe zusammen. Die positive Übereinstimmung in Prozent lag für die MRSA-positiven Panelproben mit „MRSA-384 unter LoD“ und „MRSA-43300 unter LoD“ bei 85,6 % (95-%-KI: 79,6 % bis 90,3 %) bzw. 87,2 % (95-%-KI: 81,4 % bis 91,7 %). Für alle anderen MRSA-positiven Panelproben betrug die positive Übereinstimmung in Prozent 100,0 % (95-%-KI: 98,0 % bis 100,0 %). Bezogen auf alle MRSA-positiven Panelproben lagen Gesamt-SD und Gesamt-VK (%) der Ct-Werte bei $\leq 0,51$ % bzw. $\leq 1,4$ %.

Tabelle 18 Zusammenfassung der Reproduzierbarkeits-Ergebnisse für MRSA – Ct-Wert und Übereinstimmung in Prozent nach Testort und Panelprobe

Panelprobe	Gültige Test- ergebnisse (n)	Ct			Übereinstimmung in Prozent nach Testort (n/N) ^a			Gesamtübereinstimmung	
		Mittel- wert	SD	VK (%)	1	2	3	Prozent (n/N)	(95-%-KI) ^b
Negativ	180	k. A.	k. A.	k. A.	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0 % (180/180)	(98,0 %, 100,0 %)
MRSA-384 unter LoD	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 %)
MRSA-384 1 × LoD	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 %)
MRSA-384 3 × LoD	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 %)
MRSA-43300 unter LoD	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 %)
MRSA-43300 1 × LoD	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 %)
MRSA-43300 3 × LoD	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 Für negative Panelproben: Übereinstimmung in Prozent = (Anzahl der negativen Ergebnisse ÷ Anzahl aller gültigen Ergebnisse) × 100;
für positive Panelproben: Übereinstimmung in Prozent = (Anzahl der positiven Ergebnisse ÷ Anzahl aller gültigen Ergebnisse) × 100

^b 95-%-KI = zweiseitiges, exaktes binomisches 95-%-Konfidenzintervall

Ct = Zyklusschwellenwert; k. A. = keine Angabe; KI = Konfidenzintervall; LoD = Nachweisgrenze; MRSA = Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*; MRSA-384 = Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stamm NRS384; MRSA-43300 = Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stamm ATCC 43300; SA = *Staphylococcus aureus*; VK = Variationskoeffizient

In Tabelle 19 sind die SD und der VK (%) der Ct-Werte für MRSA-positive Panelproben insgesamt sowie jeweils bezogen auf Charge, Testort/Gerät, Anwender, Tag und einzelnen Lauf dargestellt.

Tabelle 19 Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient in % für Ct-Werte bei positiven Panelproben mit gültigem Ergebnis – MRSA

MRSA			Standardabweichung und Variationskoeffizient in Prozent											
			Charge		Testort/Gerät		Anwender		Tag		Intra-Lauf		Gesamt	
Panelprobe	N	Mittlerer Ct	SD	VK	SD	VK	SD	VK	SD	VK	SD	VK	SD	VK
MRSA-384 unter LoD	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 %
MRSA-384 1 × LoD	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 %
MRSA-384 3 × LoD	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 %
MRSA-43300 unter LoD	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 %
MRSA-43300 1 × LoD	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 %
MRSA-43300 3 × LoD	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 = Zyklusschwellenwert; LoD = Nachweisgrenze; MRSA = Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*; MRSA-384 = Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stamm NRS384; MRSA-43300 = Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stamm ATCC 43300; SD = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient

Reproduzierbarkeits-Ergebnisse für SA

Tabelle 20 fasst die Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie für SA zu Ct-Wert und prozentualer Übereinstimmung (exaktes zweiseitiges 95-%-KI) nach Testort und Panelprobe zusammen. Die positive Übereinstimmung in Prozent für die SA-positiven Panelprobengruppen „SA unter LoD“, „SA 1 × LoD“ und „SA 3 × LoD“ lag bei 50,0 % (95-%-KI: 42,5 % bis 57,5 %), 99,4 % (95-%-KI: 96,9 % bis 100,0 %) bzw. 100,0 % (95-%-KI: 98,0 % bis 100,0 %). Bezogen auf alle SA-positiven Panelproben lagen Gesamt-SD und Gesamt-VK (%) der Ct-Werte bei ≤ 0,49 % bzw. ≤ 1,3 %. Die negative Übereinstimmung in Prozent betrug bei den MRSA/SA-negativen Panelproben 100,0 % (95-%-KI: 98,0 % bis 100,0 %).

Tabelle 20 Zusammenfassung der Reproduzierbarkeits-Ergebnisse für SA – Ct-Wert und Übereinstimmung in Prozent nach Testort und Panelprobe

Panelprobe	Gültige Test- ergebnisse (n)	Ct			Übereinstimmung in Prozent nach Testort (n/N) ^a			Gesamtübereinstimmung	
		Mittel- wert	SD	VK (%)	1	2	3	Prozent (n/N)	(95-%-KI) ^b
Negativ	180	k. A.	k. A.	k. A.	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0 (60/60)	100,0 % (180/180)	(98,0 %, 100,0 %)
SA unter LoD	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 %)
SA 1 × LoD	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 %)
SA 3 × LoD	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 Für negative Panelproben: Übereinstimmung in Prozent = (Anzahl der negativen Ergebnisse ÷ Anzahl aller gültigen Ergebnisse) × 100;
für positive Panelproben: Übereinstimmung in Prozent = (Anzahl der positiven Ergebnisse ÷ Anzahl aller gültigen Ergebnisse) × 100

^b 95-%-KI = zweiseitiges, exaktes binomisches 95-%-Konfidenzintervall

Ct = Zyklusschwellenwert; k. A. = keine Angabe; KI = Konfidenzintervall; LoD = Nachweisgrenze; SA = *Staphylococcus aureus*;

VK = Variationskoeffizient

In Tabelle 21 sind die SD und der VK (%) der Ct-Werte für SA-positive Panelproben insgesamt sowie jeweils bezogen auf Charge, Testort/Gerät, Anwender, Tag und einzelnen Lauf dargestellt.

Tabelle 21 Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient in % für Ct-Werte bei positiven Panelproben mit gültigem Ergebnis – SA

SA			Standardabweichung und Variationskoeffizient in Prozent											
			Charge		Testort/Gerät		Anwender		Tag		Intra-Lauf		Gesamt	
Panelprobe	N	Mittlerer Ct	SD	VK	SD	VK	SD	VK	SD	VK	SD	VK	SD	VK
SA unter LoD	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 %
SA 1 × LoD	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 %
SA 3 × LoD	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 = Zyklusschwellenwert; LoD = Nachweisgrenze; SA = *Staphylococcus aureus*; SD = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient

Klinische Leistung

Die klinische Leistung des **cobas**® MRSA/SA-Tests wurde in einer durch eine Ethikkommission genehmigten prospektiven, multizentrischen Studie bestimmt, in der anhand von Nasalabstrichen geeigneter männlicher und weiblicher Probanden die Ergebnisse mit einer direkten chromogenen Kultur sowie mit einer mit Anreicherungskultur kombinierten direkten chromogenen Kultur verglichen wurden.

Die Proben wurden an sechs unterschiedlichen Standorten in den USA entnommen. Es wurden von jedem Probanden ein oder zwei Abstrichproben genommen: ein Abstrich, mit MSwab (Copan Flock Technologies Srl., Brescia, Italien), für den **cobas**® MRSA/SA-Test und die Direkt-/Anreicherungskultur sowie gegebenenfalls ein Abstrich für Laborstandardverfahren.

Der **cobas**® MRSA/SA-Test wurde an drei verschiedenen Standorten durchgeführt, und das Verfahren mit Direkt- und Anreicherungskultur übernahm ein Referenzlabor, das auf die Kultivierung und den molekularen Nachweis von MRSA und SA spezialisiert ist. Von dem MSwab-Abstrich jedes Probanden wurde jeweils ein 100-µl-Aliquot kurz direkt auf eine Platte chromogenes Selektiv- und Differentialmedium für MRSA und für SA (Direktkultur) sowie in ein Röhrchen mit Trypticase-Soja-Bouillon (TSB) mit 6,5 % NaCl (Anreicherungskultur) gegeben. Isolate mit Positivverdacht und positive Bouillon-Anreicherungskulturen wurden auf Agar mit 5 % Schafsblut subkultiviert und für die Isolate wurde mittels Gram-Färbung und Latex-Agglutinationstest ein SA-Befund gestellt. Für mutmaßlich MRSA-positive Isolate erfolgte die Bestätigung anhand eines Cefoxitin-Blättchen-Diffusionstests auf Methicillin-Resistenz nach dem Kirby-Bauer-Verfahren.

Als MRSA/SA-positiv galten Proben bei der Kulturmethode, wenn sie mit der Direkt- oder Anreicherungskultur positiv auf MRSA/SA getestet wurden. Als MRSA/SA-negativ galten Proben bei der Kulturmethode, wenn sie sowohl mit der Direkt- als auch mit der Anreicherungskultur negativ auf MRSA/SA getestet wurden.

Für alle Proben, bei denen die mit dem **cobas**® MRSA/SA-Test und mit der kombinierten Direkt- und Anreicherungskultur erzielten Ergebnisse voneinander abwichen, wurde eine Diskrepanzanalyse mit einem zweiten, von der FDA zugelassenen Nukleinsäure-Amplifikationstest (NAAT) und einer nicht selektiven Direkt- sowie einer nicht selektiven Anreicherungskultur vorgenommen, wobei eine zufällig ausgewählte Teilmenge der Proben mit übereinstimmenden Ergebnissen als Kontrollen einbezogen wurde. Ein 100-µl-Aliquot der noch verbleibenden MSwab-Probenmenge wurde kurz auf eine Schokolade-Agar-Platte (nicht selektive Direktkultur) gegeben und ein zweites 100-µl-Aliquot wurde einer NaCl-freien TSB (nicht selektive Anreicherungskultur) zugesetzt. Die der nicht selektiven Direkt- und der nicht selektiven Anreicherungskultur entnommenen Isolate wurden wie beschrieben charakterisiert. Zusätzlich wurden atypische Isolate mit Positivverdacht zur Befundabklärung entsprechend der gängigen Praxis des Referenzlabors anhand eines laborentwickelten PCR-Tests auf *femA*- und *mecA*-Gene getestet.

Ergebnisse

Es wurden Proben von 2528 Probanden genommen; dabei wurden mit Proben von 1372 männlichen (54,8 %) und 1132 weiblichen (45,2 %) Probanden insgesamt 2504 (99,1 %) auswertbare Ergebnisse erzielt. Die meisten Probanden waren im Alter von > 50 Jahren (67,2 %), die Altersspanne reichte von 18 bis 101 (Altersmedian = 57). Von den Proben waren insgesamt 160 MRSA-positiv und 660 SA-positiv.

Leistung des cobas® MRSA/SA-Tests im Vergleich zur Bestimmung über eine kombinierte Direkt- und Anreicherungskultur (Referenzmethode)

Die Leistung des **cobas**® MRSA/SA-Tests im Vergleich zum Verfahren mit kombinierter Direkt- und Anreicherungskultur, ermittelt mit 2500 auswertbaren Ergebnissen für MRSA und 2501 auswertbaren Ergebnissen für SA, ist in Tabelle 22 zusammengefasst.

Sensitivität und Spezifität für MRSA betrugen im Vergleich zum Verfahren mit kombinierter Direkt- und Anreicherungskultur 93,1 % (149/160) bzw. 97,5 % (2281/2340); Prävalenz, PPV und NPV lagen jeweils bei 6,4 %, 71,6 % bzw. 99,5 %.

Sensitivität und Spezifität für SA betrugen im Vergleich zum Verfahren mit kombinierter Direkt- und Anreicherungskultur 93,9 % (620/660) bzw. 94,2 % (1734/1841); Prävalenz, PPV und NPV lagen jeweils bei 26,4 %, 85,3 % bzw. 97,7 %.

Tabelle 22 Vergleich der Ergebnisse des **cobas®** MRSA/SA-Tests und der Direkt- und Anreicherungskultur (Referenzmethode)

		Direkt- und Anreicherungskultur (Referenzmethode)					
		MRSA			SA		
		Positiv	Negativ	Gesamt	Positiv	Negativ	Gesamt
cobas® MRSA/SA- Test	Positiv	149	59	208	620	107	727
	Negativ	11	2281	2292	40	1734	1774
	Gesamt	160	2340	2500	660	1841	2501
MRSA Sensitivität: 93,1 % (149/160) (95%-KI: 88,1–96,1 %) Spezifität: 97,5 % (2281/2340) (95%-KI: 96,8–98,0 %) Prävalenz: 6,4 % PPV: 71,6 % NPV: 99,5 % SA Sensitivität: 93,9 % (620/660) (95%-KI: 91,9–95,5 %) Spezifität: 94,2 % (1734/1841) (95%-KI: 93,0–95,2 %) Prävalenz: 26,4 % PPV: 85,3 % NPV: 97,7 %							

Hinweis: Probandenproben mit gültigen Ergebnissen sowohl für die Direktkultur als auch für den **cobas®** MRSA/SA-Test gelten als auswertbar und sind in dieser Tabelle enthalten.

MRSA = Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*; NPV = negativer prädiktiver Wert; PPV = positiver prädiktiver Wert; SA = *Staphylococcus aureus*

Ergebnisvergleich zwischen dem **cobas®** MRSA/SA-Test und der Direktkultur

Tabelle 23 zeigt die mit dem **cobas®** MRSA/SA-Test und die mit einer Direktkultur erzielten auswertbaren 2504 Ergebnisse im Vergleich.

Für MRSA betrugen die Gesamtübereinstimmung sowie die positive und negative Übereinstimmung in Prozent zwischen **cobas®** MRSA/SA-Test und Direktkulturverfahren 96,9 % (2427/2504), 97,1 % (135/139) bzw. 96,9 % (2292/2365) bei einer Prävalenz von 5,6 %.

Für SA betrugen die Gesamtübereinstimmung sowie die positive und negative Übereinstimmung in Prozent zwischen **cobas®** MRSA/SA-Test und Direktkulturverfahren 93,3 % (2336/2504), 97,0 % (577/595) bzw. 92,1 % (1759/1909) bei einer Prävalenz von 23,8 %.

Tabelle 23 Ergebnisvergleich zwischen dem cobas® MRSA/SA-Test und der Direktkultur

		Direktkultur					
		MRSA			SA		
		Positiv	Negativ	Gesamt	Positiv	Negativ	Gesamt
cobas® MRSA/SA- Test	Positiv	135	73	208	577	150	727
	Negativ	4	2292	2296	18	1759	1777
	Gesamt	139	2365	2504	595	1909	2504
MRSA Positive Übereinstimmung in Prozent: 97,1 % (135/139) (95-%-KI: 92,8–98,9 %) Negative Übereinstimmung in Prozent: 96,9 % (2292/2365) (95-%-KI: 96,1–97,5 %) Gesamtübereinstimmung in Prozent: 96,9 % (2427/2504) (95-%-KI: 96,2–97,5 %) Prävalenz: 5,6 % SA Positive Übereinstimmung in Prozent: 97,0 % (577/595) (95-%-KI: 95,3–98,1 %) Negative Übereinstimmung in Prozent: 92,1 % (1759/1909) (95-%-KI: 90,8–93,3 %) Gesamtübereinstimmung in Prozent: 93,3 % (2336/2504) (95-%-KI: 92,2–94,2 %) Prävalenz: 23,8 %							

Hinweis: Probandenproben mit gültigen Ergebnissen sowohl für die Direktkultur als auch für den cobas® MRSA/SA-Test gelten als auswertbar und sind in dieser Tabelle enthalten.

MRSA = Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*; SA = *Staphylococcus aureus*

Diskrepanzanalyse von Proben mit nicht übereinstimmenden und übereinstimmenden Ergebnissen

Für alle Proben, bei denen die mit dem cobas® MRSA/SA-Test und mit der kombinierten Direkt- und Anreicherungskultur (Referenzmethode) erzielten Ergebnisse voneinander abwichen (Tabelle 22), wurde eine Diskrepanzanalyse mit einem zweiten, von der FDA zugelassenen Nukleinsäure-Amplifikationstest (NAAT) und einer nicht selektiven Direkt- sowie einer nicht selektiven Anreicherungskultur vorgenommen, wobei eine zufällig ausgewählte Teilmenge der Proben mit übereinstimmenden Ergebnissen als Kontrollen einbezogen wurde.

Es gab insgesamt 70 Proben, deren MRSA-Ergebnisse nicht übereinstimmten: 11 abweichend MRSA-negativ und 59 abweichend MRSA-positiv (Tabelle 22). Von den 11 abweichend MRSA-negativen Proben wurden 5 mit dem zweiten NAAT und der nicht selektiven Direkt- und der nicht selektiven Anreicherungskultur für MRSA-negativ befunden. Von den 59 abweichend MRSA-positiven Proben wurden 20 mit dem zweiten NAAT oder mit einer oder beiden nicht selektiven Kulturen (Direkt- und Anreicherungskultur) für MRSA-positiv befunden.

Es gab insgesamt 147 Proben, deren SA-Ergebnisse nicht übereinstimmten: 40 abweichend SA-negativ und 107 abweichend SA-positiv (Tabelle 22). Von den 40 abweichend SA-negativen Proben wurden 31 mit dem zweiten NAAT und der nicht selektiven Direkt- und der nicht selektiven Anreicherungskultur für SA-negativ befunden. Von den 107 abweichend SA-positiven Proben wurden 24 mit dem zweiten NAAT oder mit einer oder beiden nicht selektiven Kulturen (Direkt- und Anreicherungskultur) für SA-positiv befunden.

Als Kontrollen wurden 74 zufällig ausgewählte Proben mit übereinstimmenden Ergebnissen in die Diskrepanzanalyse einbezogen: 25 MRSA-positive, 25 SA-negative und 24 SA-positive/MRSA-negative. Von den 74 Kontrollen wurden alle 25 MRSA-positiven Proben mit dem zweiten NAAT oder mit einer oder beiden nicht selektiven Kulturen (Direkt- und Anreicherungskultur) für MRSA-positiv befunden; alle 25 SA-negativen Proben wurden mit dem zweiten NAAT und der nicht selektiven Direkt- und der nicht selektiven Anreicherungskultur für SA-negativ befunden; und von den 24 SA-positiven Proben wurden 21 mit dem zweiten NAAT oder mit einer oder beiden nicht selektiven Kulturen (Direkt- und Anreicherungskultur) für SA-positiv befunden, während 1 mit der nicht selektiven Anreicherungskultur für MRSA-positiv und 2 mit dem zweiten NAAT und der nicht selektiven Direkt- und der nicht selektiven Anreicherungskultur für SA-negativ befunden wurden.

Erwartete Werte

Prävalenz

Die Prävalenz der nasalen Besiedlung mit MRSA und SA ist von einer Vielzahl an Faktoren abhängig, darunter Aufenthalt in einer Langzeitpflegeeinrichtung, zurückliegende MRSA-Infektion oder -Besiedlung, Diabetes Mellitus, enger Kontakt mit MRSA/SA-Trägern und Antibiotikaeinnahme zu einem früheren Zeitpunkt. Die mit dem **cobas®** MRSA/SA-Test ermittelte Gesamtprävalenz von MRSA und SA lag bei einer multizentrischen klinischen Studie bei 6,4 % gegenüber den mit dem Vergleichsverfahren der kombinierten Direkt- und Anreicherungskultur ermittelten 26,4 %.

Hypothetische positive und negative prädiktive Werte des cobas® MRSA/SA-Tests für MRSA

Die hypothetischen positiven und negativen prädiktiven Werte (PPV und NPV) des **cobas®** MRSA/SA-Tests für MRSA in Abhängigkeit von einer nasalen Besiedlungsrate von 1 bis 30 % sind in Tabelle 24 aufgeführt. Die Sensitivität und Spezifität des **cobas®** MRSA/SA-Tests für MRSA lag bei 93,1 % gegenüber den mit dem Verfahren mit kombinierter Direkt- und Anreicherungskultur (Referenz) ermittelten 97,5 %.

Tabelle 24 Hypothetische positive und negative prädiktive Werte für MRSA in Abhängigkeit von der nasalen Besiedlungsrate

Prävalenz (%)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	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 %

Hinweis: Sensitivität und Spezifität wurden durch den Vergleich der Ergebnisse des **cobas®** MRSA/SA-Tests und des Verfahrens mit kombinierter Direkt- und Anreicherungskultur bestimmt, für die Nasalabstriche von Patienten auf eine MRSA- oder SA-Besiedlung getestet wurden.

NPV = negativer prädiktiver Wert; PPV = positiver prädiktiver Wert

Hypothetische positive und negative prädiktive Werte des cobas® MRSA/SA-Tests für SA

Die hypothetischen positiven und negativen prädiktiven Werte (PPV und NPV) des **cobas®** MRSA/SA-Tests für SA in Abhängigkeit von einer nasalen Besiedlungsrate von 1 bis 30 % sind in Tabelle 25 aufgeführt. Die Sensitivität und Spezifität des **cobas®** MRSA/SA-Tests lag für SA bei 93,9 % gegenüber den mit dem Verfahren mit kombinierter Direkt- und Anreicherungskultur (Referenz) ermittelten 94,2 %.

Tabelle 25 Hypothetische positive und negative prädiktive Werte für SA in Abhängigkeit von der nasalen Besiedlungsrate

Prävalenz (%)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	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 %

Hinweis: Sensitivität und Spezifität wurden durch den Vergleich der Ergebnisse des **cobas®** MRSA/SA-Tests und des Verfahrens mit kombinierter Direkt- und Anreicherungskultur bestimmt, für die Nasalabstriche von Patienten auf eine MRSA- oder SA-Besiedlung getestet wurden.

NPV = negativer prädiktiver Wert; PPV = positiver prädiktiver Wert

Weitere Informationen

Wichtigste Leistungsmerkmale des Assays

Probentyp	Nasale Abstrichproben
Erforderliche Probenmenge	1,6 ml des MSwab-Mediums in einem Primärröhrchen, mindestens 700 µl werden für den cobas® MRSA/SA-Test benötigt.
Testdauer	Die Ergebnisse liegen innerhalb von 2,5 Stunden nach dem Laden der Proben in das System vor (1–22 Proben).
Analytische Sensitivität	Von 175 CFU/Abstrich bis 750 CFU/Abstrich, je nach Isolat.
Spezifität	Keine Kreuzreaktivität mit 147 eng verwandten Organismen und Organismen, die üblicherweise in nasalen Abstrichproben vorhanden sind.
Subtypenerfassung	314 MRSA-Isolate und 91 SA-Isolates aus 16 Ländern mit mindestens 7 SCCmec-Typen, 10 RE-Typen und 71 spa-Typen wurden insgesamt getestet und detektiert.

Symbole

Die folgenden Symbole werden bei der Etikettierung von Roche PCR-Diagnostikprodukten verwendet.

Tabelle 26 Symbole auf den Etiketten von Roche PCR-Diagnostikprodukten

Age/DOB Alter oder Geburtsdatum	 Produkt nicht für eine patientennahe Testung geeignet	QS IU/PCR Quantifizierungsstandard zur Berechnung der Ergebnisse, in Internationalen Einheiten pro PCR-Reaktion
 Zusatz-Software	 Produkt nicht für Selbsttests geeignet	SN Seriennummer
Assigned Range [copies/mL] Sollbereich (Kopien/mL)	 Vertrieb (Hinweis: ggf. Angabe von Land/Region unter dem Symbol)	Site Zentrum, Labor
Assigned Range [IU/mL] Sollbereich (IE/mL)	 Nicht wiederverwenden	Procedure Standard Standardverfahren
EC REP Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft	 Frauen, weiblich	STERILE EO Mit Ethylenoxid sterilisiert
BARCODE Barcode-Datenblatt	 Nur zur Beurteilung der IVD-Leistung	 Im Dunkeln lagern
LOT Chargenbezeichnung	GTIN Globale Artikelnummer GTIN	 Temperaturbegrenzung
 Biogefährdung	 Import	 Testdefinitionsdatei
REF Bestellnummer	IVD <i>In-vitro</i> -Diagnostikum	 Diese Seite oben
 CE-Kennzeichnung für Konformität; dieses Produkt entspricht den geltenden Vorschriften für die CE-Kennzeichnung für <i>In-vitro</i> -Diagnostika.	LLR Unterer Grenzwert des Sollbereichs	Procedure UltraSensitive Ultrasensitives Verfahren
Collect Date Entnahmedatum	 Männer, männlich	UDI Einmalige Produktkennung
 Gebrauchsanweisung beachten	 Hersteller	ULR Oberer Grenzwert des Sollbereichs
 Ausreichend für <n> Tests	CONTROL - Negativkontrolle	Urine Fill Line Fülllinie für Urin
CONTENT Inhalt der Packung	 Nicht steril	Rx Only Nur für die USA: In den USA darf dieses Produkt nach den gesetzlichen Vorschriften nur durch einen Arzt oder auf ärztliche Verschreibung abgegeben werden.
CONTROL Kontrolle	 Patientenname	 Verwendbar bis
 Herstellungsdatum	 Patienten-ID	
 Produkt für patientennahe Tests	 Hier abziehen	
 Produkt zur Eigenanwendung	CONTROL + Positivkontrolle	
	QS copies / PCR Quantifizierungsstandard zur Berechnung der Ergebnisse, in Kopien pro PCR-Reaktion	

Technischer Support

Für technischen Support wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Hersteller und Importeur

Tabelle 27 Hersteller und Importeur



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

Hergestellt in den USA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Marken und Patente

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

Copyright

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.

Literatur

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.

Dokumentversion

Dokumentversionsübersicht	
Doc. Rev. 4.0 07/2023	Im Abschnitt Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung wurde der Hinweis hinzugefügt, dass sich der Benutzer im Falle schwerwiegender Vorkommnisse an die zuständigen Behörden wenden soll. Der Abschnitt Korrelation der Methoden wurde zu Klinische Leistung bei Verwendung klinischer Proben geändert. Der Abschnitt Klinische Leistung bei Verwendung klinischer Proben wurde um zusätzliche Daten zur klinischen Leistung ergänzt. Es wurde ein Weblink zur Zusammenfassung des Berichts zu Sicherheit und Leistung hinzugefügt. Die Symbolbezeichnungen auf der Symbolseite wurden im Zuge der Harmonisierung aktualisiert. Die Adressen des Herstellers und des Importeurs wurden aktualisiert. Der Abschnitt Marken und Patente einschließlich des darin enthaltenen Links wurde aktualisiert. Der Abschnitt Technischer Support wurde hinzugefügt. Es wurden einige Textstellen an die Vorgaben der IVDR angepasst. Bei Fragen wenden Sie sich bitte an den Kundendienst von Roche Diagnostics vor Ort.
Doc. Rev. 5.0 02/2024	Die Gefahrenhinweise für Lysis Kit 1 wurden aktualisiert. Die Marke cobas® wurde aktualisiert. Bei Fragen wenden Sie sich bitte an den Kundendienst von Roche Diagnostics vor Ort.
Doc. Rev. 6.0 06/2024	Die Gefahrenhinweise für das Sample Preparation Kit wurden aktualisiert. Das Symbol „Rx Only“ wurde von der Titelseite entfernt. Die Symbolbezeichnungen auf der Symbolseite wurden im Zuge der Harmonisierung aktualisiert. Bei Fragen wenden Sie sich bitte an den Kundendienst von Roche Diagnostics vor Ort.

Unter dem folgenden Link finden Sie eine Zusammenfassung des Berichts zu Sicherheit und Leistung:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>