

GenoType[®] MRSA

VER 2.0



Deutsch: S. 2-12

English: p. 13-22

Français : p. 23-33

Italiano: p. 34-44

Español: p. 45-55

Português: p. 56-66

Česky: s. 67-77

08/2008

HAIN
LIFESCIENCE

GenoType® MRSA

Molekulargenetisches Testsystem zur schnellen Identifizierung Methicillin-resistenter Staphylokokken aus Kulturproben

Methodik

Der **GenoType® MRSA**-Test beruht auf der **DNA•STRIP®**-Technologie und erlaubt die molekulargenetische Identifizierung von *S. aureus*- und *S. epidermidis*-Kulturen. Gleichzeitig kann das Methicillinresistenz-vermittelnde *mecA*-Gen sowie der Zweikomponenten-Cytotoxin-Virulenzfaktor PVL (Panton-Valentin-Leukozidin) detektiert werden. Der gesamte Testablauf unterteilt sich in folgende drei Phasen: DNA-Isolierung aus Kulturproben (vorzugsweise frisches Koloniematerial; die hierzu benötigten Reagenzien sind nicht Bestandteil des Kits), Multiplex-Amplifikation mit Biotin-markierten Primern (eine hierzu benötigte thermostabile DNA-Polymerase ist nicht Bestandteil des Kits) und reverse Hybridisierung. Die Hybridisierung gliedert sich in folgende Arbeitsschritte: chemische Denaturierung der Amplifikationsprodukte, Hybridisierung der Biotin-markierten, einzelsträngigen Amplifikate an membrangebundene Sonden, Entfernen aller unspezifisch gebundenen Amplifikate, Zugabe eines Streptavidin/Alkalische Phosphatase (AP)-Komplexes und AP-vermittelte Farbreaktion. Das Bandenmuster wird mit Hilfe einer Schablone visuell ausgewertet.

Lagerung und Vorsichtsmaßnahmen

Primer/Nukleotid-Mix (PNM) streng getrennt von DNA-haltigen Produkten lagern. Zur kurzzeitigen Lagerung bis zu 4 Wochen bei 2-8°C, zur langfristigen Lagerung bei -20°C aufbewahren. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden; gegebenenfalls den PNM aliquotieren. Alle weiteren Kitbestandteile bei 2-8°C lagern. Das angegebene Haltbarkeitsdatum sollte nicht überschritten werden.

Untersuchungsmaterial von Patienten und daraus angelegte Kulturen, wie sie für Laboratoriumsuntersuchungen eingesetzt werden, sind als potenziell infektiös einzustufen und entsprechend zu behandeln. Proben von Risikopatienten sowie daraus angelegte Kulturen sollten immer gekennzeichnet und unter geeigneten Sicherheitsvorkehrungen bearbeitet werden. Darüber hinaus sind die jeweils gel-

tenden Vorschriften zur Unfallverhütung, zum Umweltschutz und zum Umgang mit Gefahrstoffen einzuhalten. Insbesondere müssen stets geeignete Schutzkleidung und Schutzhandschuhe getragen werden.

Bei der Durchführung des Tests sind die für die Nukleinsäureamplifikation notwendigen Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Utensilien wie Pipettenspitzen, die mit den Reagenzien in Berührung kommen, müssen frei von DNasen sein.

Beim Umgang mit den Kitreagenzien sind folgende besondere Sicherheitsmaßnahmen zu beachten:

Das **Denaturierungsreagenz** (DEN) enthält <2% (w/w) NaOH und wirkt reizend.

Es gelten R 36/38 sowie S 26-37/39-45.

Das **Substrat-Konzentrat** (SUB-C) enthält Dimethylsulfoxid und wirkt reizend.

Es gelten R 36/37/38 und S 23-26-36.

Weitere Informationen können den Sicherheitsdatenblättern entnommen werden, die abrufbar sind unter: www.hain-lifescience.de/produkte/sicherheitsdaten.html

Qualitätssicherung

Zur Validierung der korrekten Testdurchführung und der Funktionalität der Lösungen trägt jeder Membranstreifen 2 Kontrollzonen:

- eine Konjugatkontrollzone, die eine erfolgreiche Konjugatbindung und Substratreaktion anzeigt
- eine Universalkontrollzone, die, soweit bekannt, alle Bakterienpezies erfasst.

DNA-Isolierung

Zur DNA-Isolierung sollte vorzugsweise frisches Koloniematerial eingesetzt werden. Der Arbeitsraum muss völlig frei von amplifizierter DNA sein. Bei Verwendung von Flüssigkulturen besteht die Gefahr, Bakterien-Mischkulturen als Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung einzusetzen, wodurch die Interpretation der Ergebnisse erschwert wird. Zur DNA-Isolierung eignen sich alle Methoden, mit denen amplifizierbare DNA aus Bakterien gewonnen werden kann. Folgende Schnellmethode liefert in der Regel ebenfalls gut amplifizierbare DNA:

- 1a. Bei Verwendung von Koloniematerial bis zu 5 Kolonien mit einer Impföse abnehmen und in 150 µl Wasser suspendieren.

1b. Bei Verwendung von Flüssigkulturen 1 ml Bakterienkultur durch fünfminütige Zentrifugation bei 5000-6000 x g (ca. 7500-8000 UpM) in einer Standard-Tisch-zentrifuge pelletieren. Überstand verwerfen, Pellet in 1 ml Wasser durch Vortexen resuspendieren und erneut zentrifugieren. Überstand verwerfen und Bakterienpellet in 50 µl Wasser resuspendieren.

Zuviel eingesetztes Zellmaterial kann bei der nachfolgenden DNA-Amplifikation zu Inhibitionsproblemen führen. Bei sehr stark bewachsenen Kulturen sollte daher die eingesetzte Menge reduziert werden.

2. Bakteriensuspension aus 1a oder 1b für 10 min bei 95°C inkubieren (Thermoblock).
3. Probe für 15 min in einem Ultraschallbad beschallen.
4. Lysat für 5 min bei max. Umdrehung zentrifugieren. Direkt nach Ablauf der Zentrifugation 5 µl des Überstandes zur PCR einsetzen. Soll die DNA-Lösung länger gelagert werden, den Überstand in ein neues Gefäß überführen.

Amplifikation

Den Amplifikations-Mix (45 µl) in einem Raum herstellen, der garantiert frei von DNA ist. Aus Gründen des Kontaminationsschutzes sollte die zu amplifizierende DNA in einem abgetrennten Bereich zugegeben werden.

Pro Ansatz werden benötigt:

- 35 µl PNM
- 5 µl 10-fach Polymerase-Puffer – nicht im Kit enthalten
- x µl $MgCl_2$ -Lösung¹⁾ – nicht im Kit enthalten
- 1-2 Unit(s) thermostabile DNA-Polymerase (Angaben des Herstellers beachten)
– nicht im Kit enthalten
- y µl Wasser zum Auffüllen auf 45 µl (ohne Berücksichtigung des Enzymvolumens)
– nicht im Kit enthalten
- 5 µl frisch isolierte DNA-Lösung (20-100 ng DNA) zugeben. Dies ergibt ein Endvolumen von 50 µl (ohne Berücksichtigung des Enzymvolumens).

¹⁾ Je nach eingesetztem Enzym/Puffersystem liegt die optimale $MgCl_2$ -Endkonzentration zwischen 1,5 und 2,5 mM. Beachten Sie, dass manche 10-fach Polymerase-Puffer bereits $MgCl_2$ enthalten.

Berechnen Sie die Anzahl der zu amplifizierenden Proben. Diese ergibt sich aus der Zahl der zu untersuchenden Proben zuzüglich der Zahl der gewünschten Kontrollproben. Einer Kontaminationskontrolle z. B. wird statt DNA-Lösung Wasser zugesetzt. Erstellen Sie einen Master-Mix, der bis auf die DNA-Lösungen sämtliche zur Amplifikation benötigten Reagenzien enthält und mischen Sie gut (nicht vortexen). Aliquotieren Sie den Mix zu je 45 µl in vorbereitete PCR-Reaktionsgefäße.

Programmierungsprotokoll für Thermocycler:

15 min²⁾ 95°C 1 Zyklus

20 sec 95°C }
30 sec 60°C } 22 Zyklen

²⁾ Bei einigen „Hot Start“ DNA-Polymerasen muss dieser Schritt verkürzt werden (Herstellerangaben beachten).

Amplifikationsprodukte können bei +4 bis -20°C gelagert werden.

Zur Überprüfung der Amplifikationsreaktion können 5 µl des betreffenden Amplifikates direkt ohne Zugabe von Ladepuffer auf ein Gel aufgetragen werden. Die Amplifikationsprodukte haben eine Länge von 63 bp (Universalkontroll-Fragment), 71 bp (*mecA*-Fragment), 77 bp (PVL-Fragment), 85 bp (*S. aureus*-spezifisches Fragment) bzw. 125 bp (*S. epidermidis*-spezifisches Fragment).

Hybridisierung

Vorbereitung

Schüttelwasserbad/**TwinCubator**[®] auf **45°C** vorwärmen; die maximal zulässige Abweichung von der Solltemperatur beträgt $\pm 1^\circ\text{C}$. Lösungen HYB und STR vor Gebrauch auf $37\text{-}45^\circ\text{C}$ erwärmen. Auf Präzipitatzfreiheit achten und gegebenenfalls vorsichtig schütteln. Alle anderen Reagenzien (außer CON-C und SUB-C) auf Raumtemperatur temperieren. Lösung CON-D weist eine leichte Trübung auf. Konjugat-Konzentrat (CON-C, orange) und Substrat-Konzentrat (SUB-C, gelb) werden in geeigneten Gefäßen in der benötigten Menge im Verhältnis 1:100 mit dem zugehörigen Puffer verdünnt (**CON-C mit CON-D, SUB-C mit SUB-D**), gut gemischt und auf Raumtemperatur temperiert. Pro Membranstreifen werden je 10 µl Konzentrat mit je 1 ml des entsprechenden Puffers verdünnt. CON-C stets vor Gebrauch frisch verdünnen. Verdünntes SUB-C ist lichtgeschützt und bei Raumtemperatur mindestens 4 Wochen stabil.

Anmerkung: Dieser Test kann auch mit einem kurzen Protokoll abgearbeitet werden, das unter www.hain-lifescience.de/pdf/mrsa_short.pdf verfügbar ist.

1. **Für jede zu untersuchende Probe in die untere Ecke einer Wannenkavität 20 µl Denaturierungsreagenz (DEN, blau) pipettieren.**
2. **Je 5-20 µl Amplifikat zugeben, durch Auf- und Abpipettieren gut mischen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.**

Währenddessen Membranstreifen (STRIPS) mit einer Pinzette aus dem Röhrchen nehmen und mit einem Bleistift unter der Farbmarkierung beschriften. Membranstreifen nur mit Handschuhen berühren.

3. **Jeweils 1 ml vorgewärmten und gemischten Hybridisierungspuffer (HYB, grün) zugeben. Die Wanne auf einer Unterlage so lange vorsichtig schwenken, bis die Lösung eine homogene Färbung aufweist.**

Darauf achten, dass keine Lösung in benachbarte Kavitäten gelangt.

4. **In jede benutzte Kavität einen Membranstreifen legen.**

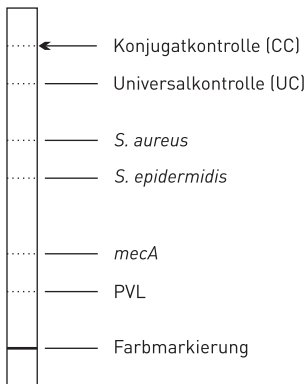
Die Membranstreifen müssen dabei vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein und die beschichtete Seite (kenntlich durch die Farbmarkierung) muss nach oben weisen. Membranstreifen, die sich wenden, mit einer Pinzette zurückdrehen. Zur Vermeidung von Kontaminationen die Pinzette nach jeder Benutzung reinigen. Dies gilt auch für alle nachfolgenden Inkubations- und Waschschrte.

5. **Wanne für 30 Minuten bei 45°C im Schüttelwasserbad/TwinCubator® inkubieren.**
Schüttelfrequenz des Wasserbads so wählen, dass eine stetige Durchmischung der Flüssigkeit erreicht wird, aber eine Kontamination benachbarter Kavitäten durch Spritzen vermieden wird. Um eine gute Wärmeübertragung sicherzustellen, muss die Wanne mindestens zu einem Drittel in Wasser eingetaucht sein.
6. **Hybridisierungspuffer vollständig entfernen.**
Hierzu z. B. eine mit einer Vakuumpumpe verbundene Pasteurpipette verwenden.
7. **Jeweils 1 ml vorgewärmte Stringent-Waschlösung (STR, rot) zugeben und Wanne 15 Minuten bei 45°C im Wasserbad/TwinCubator® unter leichtem Schütteln inkubieren.**
8. **Von diesem Schritt an bei Raumtemperatur arbeiten. Stringent-Waschlösung vollständig entfernen.**
Anschließend Flüssigkeitsreste durch Abklopfen der Wanne auf einer saugfähigen Unterlage entfernen. Dies gilt auch für alle anderen Waschschrte.
9. **Membranstreifen einmal 1 Minute mit 1 ml Rinse-Lösung (RIN) unter stetiger Bewegung auf Horizontalschüttler/TwinCubator® waschen (RIN nach Inkubation abschütten).**
10. **1 ml verdünntes Konjugat (s.o.) zu jedem Membranstreifen geben und 30 Minuten auf Horizontalschüttler/TwinCubator® inkubieren.**
11. **Lösung abschütten und jeden Membranstreifen zweimal je 1 Minute mit 1 ml Rinse-Lösung (RIN) und einmal mit ca. 1 ml destilliertem Wasser (z. B. Spritzflasche verwenden) auf Horizontalschüttler/TwinCubator® waschen (Lösung jeweils abschütten).**
Nach dem letzten Waschschrte Wasser möglichst vollständig entfernen.
12. **Je 1 ml verdünntes Substrat (s.o.) zu jedem Membranstreifen geben und lichtgeschützt ohne Schütteln inkubieren. In Abhängigkeit von den Testbedingungen (z. B. der Raumtemperatur) kann die Substratinkubationszeit zwischen 3 und 20 Minuten variieren. Eine zu lang andauernde Substratinkubation führt zu einer Verstärkung der Hintergrundfärbung und kann die Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.**
13. **Substratreaktion durch zweimaliges kurzes Waschen mit destilliertem Wasser stoppen.**
14. **Membranstreifen mit einer Pinzette aus den Kavitäten nehmen und zum Trocknen auf saugfähiges Papier legen.**

Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Die Membranstreifen nach dem Trocknen auf eine geeignete Unterlage kleben und lichtgeschützt aufbewahren. Ein Auswertungsbogen liegt dem Kit bei und ist unter www.hain-lifescience.de/pdf/mrsa_evaluation.pdf verfügbar.

Als Auswertehilfe liegt dem Kit außerdem eine Schablone bei, die an der Konjugatkontrollbande des Membranstreifens ausgerichtet wird. Insgesamt sind auf dem Membranstreifen 6 Reaktionszonen vorhanden (s. Abbildung).



Hinweis: Der Membranstreifen entspricht nicht der Originalgröße und darf nicht zur Auswertung herangezogen werden.

Konjugatkontrolle (CC)

Diese Reaktionszone dokumentiert die Effizienz von Konjugatbindung und Substratreaktion und muss immer entwickelt sein.

Universalkontrolle (UC)

Diese Sonde ist gegen einen hochkonservativen, in allen bisher untersuchten Bakterien-Arten vorkommenden DNA-Abschnitt gerichtet. Sie zeigt damit das Vorhandensein bakterieller DNA sowie die korrekte Durchführung der DNA-Isolierung und -Amplifikation an. Da als Ausgangsmaterial für diesen Test eine Bakterienkultur

eingesetzt wird, sollte diese Reaktionszone entwickelt sein. Die Amplifikation der Kontrollsequenz kann jedoch durch die Amplifikation der spezifischen Sequenz(en) verdrängt werden.

Beachten Sie bitte, dass es sich bei der Universalkontrolle nicht um eine PCR-Kontrolle handelt, d. h. bei Kontaminationskontrollen (Wasser statt DNA-Lösung im PCR-Ansatz) bleibt diese Reaktionszone negativ.

Weitere Banden

Spezifische Gensonden; zur Auswertung s. Grafik/Schablone.

Ist keine der weiteren Banden entwickelt, müssen die Kontrollzonen nach der Testdurchführung ein positives Signal zeigen. Ist dies nicht der Fall, liegt eine falsch-negative Reaktion vor und der Test muss wiederholt werden.

Nicht alle Banden eines Membranstreifens müssen die gleiche Signalstärke aufweisen.

Grenzen der Methode

Vor der Amplifikation muss bakterielle DNA aus Kulturproben mit Hilfe eines geeigneten DNA-Isolierungsverfahrens extrahiert werden. Es muss gewährleistet sein, dass es während der Amplifikation zu einer effizienten Vervielfältigung der Ausgangs-DNA kommt.

Dieser Test und die daraus resultierende Aussage beziehen sich ausschließlich auf die Genomabschnitte, aus denen die spezifischen Primer und Sonden ausgewählt wurden. Eine eventuelle Sequenzanalyse bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten. Durch die Anwesenheit mehrerer Bakterienarten in der zu untersuchenden Probe kann die Auswertbarkeit des Tests beeinträchtigt werden.

Wie bei jedem Nachweissystem auf Hybridisierungs-Basis besteht auch bei dem vorliegenden Testsystem die Möglichkeit, dass Sequenzvariationen in den Genombereichen, aus denen die Primer und Sonden gewählt wurden, für deren Detektion der Test aber nicht konzipiert ist, zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Aufgrund der hohen Variabilität von Bakteriengenomen ist es daher möglich, dass bestimmte Subtypen nicht erkannt werden. Der Test spiegelt den aktuellen Kenntnisstand der Firma Hain Lifescience wider.

Dieser Test ist nur von Fachpersonal durchzuführen, welches im Testverfahren geschult wurde und mit molekularbiologischen Techniken vertraut ist.

Die Leistungsbewertungsprüfung dieses Testsystems wurde mit der HotStarTaq-Polymerase der Fa. Qiagen (Hilden) durchgeführt.

Troubleshooting

Durchweg schwache oder gar keine Banden (inkl. Konjugatkontrolle)

- Raumtemperatur zu niedrig oder Reagenzien nicht auf Raumtemperatur äquilibriert.
- CON-C und/oder SUB-C nicht oder in zu geringer Menge eingesetzt.

Schwache oder keine Banden mit Ausnahme der Konjugatkontrolle

- Qualität und/oder Quantität der isolierten DNA lassen keine effiziente Amplifikation zu. Amplifikationsprodukte in einem Gel überprüfen. Falls kein Amplifikat sichtbar ist, DNA-Isolierung und -Amplifikation wiederholen; evtl. eine andere DNA-Isolierungsmethode einsetzen (s. Kapitel DNA-Isolierung). Bitte beachten Sie, dass die Amplifikationsreaktion auch durch zu große Mengen an bakteriellem Material gehemmt werden kann.
- Inkubationstemperatur zu hoch.

Inhomogene Färbung

- Membranstreifen zeitweise nicht vollständig eingetaucht.
- Wanne während der Inkubation nicht ausreichend bewegt.

Hohe Hintergrundfärbung

- CON-C und/oder SUB-C zu konzentriert eingesetzt.
- Unzureichend gewaschen.
- Waschlösungen zu kalt.

Unerwartetes Ergebnis

- Falsche Inkubationstemperatur.
- Hybridisierungspuffer und/oder Stringent-Waschlösung nicht ausreichend erwärmt oder nicht ausreichend gemischt.
- Kontamination der isolierten DNA oder der Amplifikationsreagenzien durch zuvor isolierte oder amplifizierte DNA. Bei einer Kontamination der Amplifikationsreagenzien zeigt auch eine mitgeführte Negativ-Kontrollprobe ein entsprechendes Bandenmuster.

- Kontamination benachbarter Kavitäten während der Zugabe von Hybridisierungspuffer.
- In Abhängigkeit von der Menge an eingesetzter amplifizierter DNA und den speziellen Reaktionsbedingungen kann es zu einer starken und schnellen Farb-reaktion kommen. In solchen Fällen die Substratinkubation abbrechen, sobald die Banden gut sichtbar sind, da es sonst zu falsch-positiven Farbreaktionen kommen kann.
- Keine Reinkultur als Ausgangsmaterial.
- Beim Isolat handelt es sich um eine bakterielle Spezies, die mit dem vorliegenden Test nicht nachgewiesen werden kann.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- Einmal-Handschuhe
- Horizontalschüttler/**TwinCubator**[®]
- Messzylinder
- PCR-Reaktionsgefäße, DNase- und RNase-frei
- Pinzette
- Pipetten (variabel im Bereich bis 10, 20, 200 und 1000 µl)
- Reagenzien zur DNA-Isolierung für Amplifikationsanwendungen sowie hierfür notwendige Geräte
- Saugpapier
- Schüttelwasserbad/**TwinCubator**[®]
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Thermocycler (Heizrate: 3°C/sec, Kühlrate: 2°C/sec, Regelgenauigkeit: +/-0,2°C)
- Thermometer, kalibriert
- Thermostabile DNA-Polymerase inkl. Puffer (Empfehlung: „Hot Start“-Enzym, Extensionsrate: 2-4 kb/min bei 72°C, Halbwertszeit: 10 min bei 97°C, 60 min bei 94°C, Amplifikationseffizienz: >10⁵-fach)
- Wasser (*molecular biology grade*)
- Zeitmesser

Bestandteile des Kits

Gelieferte Menge

Membranstreifen beschichtet mit spezifischen Gensonden (STRIPS)	12	96
Primer-Nukleotid-Mix (PNM) enthält spezifische Primer, Nukleotide, Farbstoff	0,5 ml	4 ml
Denaturierungsreagenz (DEN) gebrauchsfertig enthält <2% NaOH, Farbstoff	0,3 ml	2,4 ml
Hybridisierungspuffer (HYB) gebrauchsfertig enthält 8-10% anionisches Tensid, Farbstoff	20 ml	120 ml
Stringent-Waschlösung (STR) gebrauchsfertig enthält >25% einer quartären Ammoniumverbindung, <1% anionisches Tensid, Farbstoff	20 ml	120 ml
Rinse-Lösung (RIN) gebrauchsfertig enthält Puffersubstanz, <1% NaCl, <1% anionisches Tensid	50 ml	360 ml
Konjugat-Konzentrat (CON-C) Konzentrat enthält Streptavidin-konjugierte Alkalische Phosphatase, Farbstoff	0,2 ml	1,2 ml
Konjugat-Puffer (CON-D) enthält Puffersubstanz, 1% Blocking-Reagenz, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Substrat-Konzentrat (SUB-C) Konzentrat enthält Dimethylsulfoxid, Substratlösung	0,2 ml	1,2 ml
Substrat-Puffer (SUB-D) enthält Puffersubstanz, <1% MgCl ₂ , <1%NaCl	20 ml	120 ml
Inkubationswanne, Auswertungsbogen	je 1	je 4
Arbeitsanleitung, Schablone	je 1	je 1

GenoType® MRSA Molecular Genetic Assay for Fast Identification of Methicillin-Resistant Staphylococci from Cultured Material

Methodology

The **GenoType® MRSA** test is based on the **DNA•STRIP®** technology and permits the identification of *S. aureus* and *S. epidermidis* strains. At the same time the methicillin resistance mediating *mecA* gene and the bicomponent cytotoxin virulence factor PVL (Panton-Valentine leukocidin) can be detected. The whole procedure is divided into three steps: DNA extraction from cultured material (bacteria freshly grown on culture plates; the necessary reagents are not provided), a multiplex amplification with biotinylated primers (the necessary thermostable DNA polymerase is not provided), and a reverse hybridization. The hybridization includes the following steps: chemical denaturation of the amplification products, hybridization of the single-stranded, biotin-labeled amplicons to membrane-bound probes, stringent washing, addition of a streptavidin/alkaline phosphatase (AP) conjugate, and an AP mediated staining reaction. A template ensures the easy and fast interpretation of the banding pattern obtained.

Storage and Precautions

Store Primer/Nucleotide Mix (PNM) at 2-8°C upon arrival isolated from any potential source of contaminating DNA. If longer storage (more than 4 weeks) is required, store at -20°C. In order to avoid repeated freezing and thawing, aliquot PNM. Store all other kit components at 2-8°C. Do not use the reagents beyond their expiry date. Patient specimens and cultures made from patient specimens must always be considered as potentially infectious. Samples from risk patients and cultures made from those samples must always be labeled and handled under suitable safety conditions. Observe all federal, state, and local safety and environmental regulations. Always wear suitable protective clothing and gloves.

Observe the usual precautions for amplification set-up. It is essential that all reagents and materials used for DNA extraction and amplification set-up are free from DNases.

When handling kit reagents, the following special safety measures must be applied:

The **Denaturation Solution** (DEN) contains <2% NaOH and is irritating to eyes and skin (R 36/38 and S 26-37/39-45).

The **Substrate Concentrate** (SUB-C) contains Dimethyl Sulfoxide and is irritating (R 36/37/38, S 23-26-36).

For additional information, please refer to material safety data sheets which can be downloaded from: www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Quality Control

In order to validate the correct performance of the test and the proper functioning of reagents, each strip includes 2 control zones:

- a Conjugate Control zone to check the binding of the conjugate on the strip and a correct chromogenic reaction
- a Universal Control zone which detects, as known, all bacterial species

DNA Extraction

The preferred starting material for DNA extraction consists of bacteria freshly grown on culture plates. The working area must be free from amplified DNA. When using bacteria grown in liquid medium, the probability of examining mixed populations is higher thus complicating interpretation of results. Any DNA extraction procedure producing amplifiable DNA from bacteria can be used. The following quick protocol normally also yields DNA suitable for amplification:

- 1a. When using bacteria grown on solid media, collect up to 5 colonies with an inoculation loop and suspend in 150 µl of water.
- 1b. When using bacteria grown in liquid media, directly apply 1 ml. Pellet bacteria by spinning for 5 min in a standard table top centrifuge at 5000-6000 x g (ap. 7500-8000 rpm). Discard supernatant, resuspend bacteria in 1 ml of water by vortexing and spin down as before. Discard supernatant and resuspend bacteria in 50 µl of water.
Using too much bacterial material for extraction may lead to inhibition of PCR. When densely grown cultures are used, the amount of starting material should be reduced.
2. Incubate solution from 1a or 1b at 95°C for 15 min.
3. Incubate for 15 min in an ultrasonic bath.

4. Spin down for 5 min at maximum speed and directly use 5 μl of the supernatant for PCR. In case DNA solution is to be stored for an extended time period, transfer supernatant to a new tube.

Amplification

Prepare the amplification mix (45 μl) in a DNA-free room. The DNA sample should be added in a separate area.

Per tube mix:

- 35 μl PNM
- 5 μl 10x polymerase incubation buffer – not provided
- x μl MgCl_2 solution¹⁾ – not provided
- 1-2 unit(s) thermostable DNA polymerase (refer to manual) – not provided
- y μl water to obtain a volume of 45 μl (not considering volume of enzyme) – not provided
- Add 5 μl freshly extracted DNA solution (20-100 ng DNA) leading to a final volume of 50 μl (not considering volume of enzyme).

¹⁾ Depending on the enzyme/buffer system used, the optimal MgCl_2 concentration may vary between 1.5 and 2.5 mM. Please note that some incubation buffers already contain MgCl_2 .

Determine the number of samples to be amplified (number of samples to be analyzed plus control samples). A negative control sample, for example, contains 5 μl of water instead of DNA solution. Prepare a master mix containing all reagents except for DNA solution and mix well (do not vortex). Aliquot 45 μl in each of the prepared PCR tubes.

Amplification profile:

15 min²⁾ 95°C 1 cycle

20 sec 95°C
30 sec 60°C } 22 cycles

²⁾ When using certain hot start DNA polymerases, the time interval of this step has to be reduced (please refer to manual of the enzyme).

Amplification products can be stored at +4 to -20°C.

For checking the amplification reaction, 5 µl of each sample might be directly applied to a gel without the addition of loading buffer. The amplicons have a length of 63 bp (Universal Control fragment), 71 bp (*mecA* fragment), 77 bp (PVL fragment), 85 bp (*S. aureus*-specific fragment), and 125 bp (*S. epidermidis*-specific fragment), respectively.

Hybridization

Preparation

Prewarm shaking water bath/**TwinCubator®** to **45°C**; the maximum tolerated deviation from the target temperature is +/-1°C. Prewarm solutions HYB and STR to 37-45°C before use. The reagents must be free from precipitates (note, however, that solution CON-D is opaque). Mix if necessary. Warm the remaining reagents with the exception of CON-C and SUB-C to room temperature. Using a suitable tube, dilute Conjugate Concentrate (CON-C, orange) and Substrate Concentrate (SUB-C, yellow) 1:100 with the respective buffer (**CON-C with CON-D, SUB-C with SUB-D**) in the amounts needed. Mix well and bring to room temperature. For each strip, add 10 µl concentrate to 1 ml of the respective buffer. Dilute CON-C before each use. Diluted SUB-C is stable for 4 weeks if stored at room temperature and protected from light.

Note: This test can also be performed using a shorter protocol which can be downloaded from: www.hain-lifescience.de/pdf/mrsa_short.pdf

1. **Dispense 20 µl of Denaturation Solution (DEN, blue) in a corner of each of the wells used.**
2. **Add to the solution 5-20 µl of amplified sample, pipette up and down to mix well and incubate at room temperature for 5 minutes.**

Meanwhile, take strips out of the tube using tweezers and mark them with a pencil underneath the colored marker. Always wear gloves when handling strips.

3. **Carefully add to each well 1 ml of prewarmed Hybridization Buffer (HYB, green). Gently shake the tray until the solution has a homogenous color.**

Take care not to spill solution into the neighboring wells.

4. Place a strip in each well.

The strips must be completely covered by the solution and the coated side (identifiable by the colored marker near the lower end) must face upward. Using tweezers, turn over strips which might have turned when immersed in the solution. Carefully clean tweezers after each use to avoid contamination. This also applies to all following steps.

5. Place tray in shaking water bath/TwinCubator® and incubate for 30 minutes at 45°C.

Adjust the shaking frequency of the water bath to achieve a constant and thorough mixing of the solution. To allow adequate heat transfer, the tray must be dipped into the water to at least 1/3 of its height.

6. Completely aspirate Hybridization Buffer.

For example, use a Pasteur pipette connected to a vacuum pump.

7. Add 1 ml of Stringent Wash Solution (STR, red) to each strip and incubate for 15 minutes at 45°C in shaking water bath/TwinCubator®.

8. Work at room temperature from this step forward.

Completely remove Stringent Wash Solution.

Pour out Wash Solution in a waste container and remove all remaining fluid by turning the tray upside down and gently striking it on an absorbent paper. This also applies to all other wash steps.

9. Wash each strip once with 1 ml of Rinse Solution (RIN) for 1 minute on shaking platform/TwinCubator® (pour out RIN after incubation).

10. Add 1 ml of diluted Conjugate (see above) to each strip and incubate for 30 minutes on shaking platform/TwinCubator®.

11. Remove solution and wash each strip twice for 1 minute with 1 ml of Rinse Solution (RIN) and once for 1 minute with approx. 1 ml of distilled water (e. g. use wash bottle) on shaking platform/TwinCubator® (pour out solution each time). Make sure to remove any trace of water after the last wash.

12. Add 1 ml of diluted substrate (see above) to each strip and incubate protected from light without shaking. Depending on the test conditions (e. g. room temperature), the substrate incubation time can vary between 3 and 20 minutes. Extended substrate incubation times can lead to increased background staining and might impair interpretation of the results.

13. Stop reaction by briefly rinsing twice with distilled water.

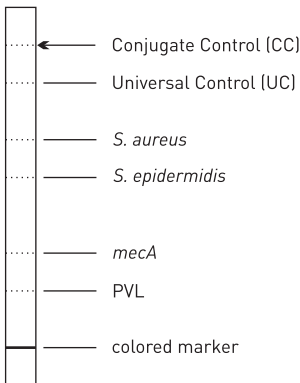
14. Using tweezers, remove strips from the tray and dry them between two layers of absorbent paper.

Evaluation and Interpretation of Results

Paste strips and store protected from light. An evaluation sheet is provided with the kit and can be downloaded from:

www.hain-lifescience.de/pdf/mrsa_evaluation.pdf

The supplied template serves as an aid for evaluation and is aligned with the Conjugate Control band of the strip. Each strip has a total of 6 reaction zones (see figure).



Note: The strip is not displayed in original size and must not be used for interpretation purposes.

Conjugate Control (CC)

A line must develop in this zone, documenting the efficiency of conjugate binding and substrate reaction.

Universal Control (UC)

This probe is directed against a highly conserved DNA region appearing in all bacterial species tested so far. It indicates the presence of bacterial DNA and the correct implementation of DNA extraction and amplification. Since the source material for this test is a bacterial culture, this reaction zone should be developed. The amplification of the

control sequence can, however, be suppressed by the amplification of the specific sequence(s).

Please be aware that the Universal Control is not a PCR control, i.e. when implementing a contamination control (water instead of DNA solution in the PCR preparation) this reaction zone remains negative.

Other bands

Specific probes; for evaluation see figure/template.

In case none of the other bands show a positive signal, the control zones have to stain positive. If this is not the case a false negative reaction occurred and the test has to be repeated.

Not all bands of a strip have to show the same signal strength.

Limitations

Prior to amplification, DNA has to be extracted from cultured bacteria using a suitable method. It must be ensured that the template DNA is efficiently amplified during the amplification reaction.

The test only works within the limits of the genomic regions the primers and probes were chosen from. Potential sequence analysis remains reserved to resuming investigations.

The presence of multiple bacterial species in the sample to be analyzed might hamper the interpretation of the test.

As with any detection system on hybridization basis the test system on hand bears the possibility that sequence variations in the genomic regions the primers and probes were chosen from but the detection of which the test was not designed for may lead to false results. Due to the high variability of bacterial genomes it is possible that certain sub-types might not be detected. The test reflects the state of knowledge of Hain Lifescience.

Use of this assay is limited to qualified personnel well trained in the test procedure and familiar with molecular biological methods.

Performance evaluation of this assay was carried out using the HotStarTaq polymerase from Qiagen (Hilden, Germany).

Troubleshooting

Overall weak or no signals (including Conjugate Control zone)

- Room temperature too low or reagents not equilibrated to room temperature.
- No or too little amount of CON-C and/or SUB-C used.

Weak or no signals except for Conjugate Control zone

- Quality and/or quantity of extracted DNA do not allow an efficient amplification. Check amplicon on a gel. In case no amplicon is visible, repeat DNA extraction and amplification. If necessary, try a different DNA extraction method (see chapter DNA Extraction). Please note that the amplification can also be inhibited by using too much bacterial material.
- Incubation temperature too high.

No homogeneous staining

- Strips were not completely immersed during incubation steps.
- Tray was not shaken properly.

High background color

- CON-C and/or SUB-C used too concentrated.
- Washing steps were not performed with the necessary care.
- Wash solutions too cold.

Unexpected result

- Wrong incubation temperature.
- Hybridization Buffer and/or Stringent Wash Solution were not properly prewarmed or mixed.
- Contamination of extracted DNA and/or amplification agents with extracted and/or amplified DNA. In case amplification agents are contaminated a negative control sample also shows the respective banding pattern.
- Contamination of neighboring wells by spillage during addition of Hybridization Buffer.
- Depending on the amount of amplified DNA used and on the specific reaction conditions, a strong and fast color development may occur. In such cases, dis-

- continue the substrate incubation as soon as the signals are clearly visible in order to prevent the development of cross-hybridizing bands.
- No pure culture as starting material.
 - The bacterial species present in the sample can not be detected with this test.

Material Required but not Provided

- Absorbent paper
- Adjustable pipettes for 10, 20, 200, and 1000 μ l
- Calibrated thermometer
- DNA extraction reagents for amplification use as well as necessary equipment
- Disposable gloves
- Disposable sterile pipette tips with filter
- Graduated cylinder
- PCR tubes, DNase and RNase free
- Shaking water bath/**TwinCubator**[®]
- Shaking platform/**TwinCubator**[®]
- Thermal cycler (heating rate: 3°C/sec, cooling rate: 2°C/sec, precision: +/-0.2°C)
- Thermostable DNA polymerase with buffer (recommendation: hot start enzyme, extension rate: 2-4 kb/min at 72°C, half-life: 10 min at 97°C, 60 min at 94°C, amplification efficiency: >10⁵ fold)
- Timer
- Tweezers
- Water (molecular biology grade)

Kit Contents

	Supplied	
Membrane strips coated with specific probes (STRIPS)	12	96
Primer Nucleotide Mix (PNM) contains specific primers, nucleotides, dye	0.5 ml	4 ml
Denaturation Solution (DEN) ready to use contains <2% NaOH, dye	0.3 ml	2.4 ml
Hybridization Buffer (HYB) ready to use contains 8-10% anionic tenside, dye	20 ml	120 ml
Stringent Wash Solution (STR) ready to use contains >25% of a quaternary ammonium compound, <1% anionic tenside, dye	20 ml	120 ml
Rinse Solution (RIN) ready to use contains buffer, <1% NaCl, <1% anionic tenside	50 ml	360 ml
Conjugate Concentrate (CON-C) concentrate contains streptavidin-conjugated alkaline phosphatase, dye	0.2 ml	1.2 ml
Conjugate Buffer (CON-D) contains buffer, 1% blocking reagent, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Substrate Concentrate (SUB-C) concentrate contains Dimethyl Sulfoxide, substrate solution	0.2 ml	1.2 ml
Substrate Buffer (SUB-D) contains buffer, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	20 ml	120 ml
tray, evaluation sheet	1 of each	4 of each
manual, template	1 of each	1 of each

GenoType® MRSA

Test d'Analyse Génétique d'Identification Rapide des Staphylocoques Résistants à la Méthicilline à Partir de la Culture

Principe

Le test **GenoType® MRSA** est basé sur la technologie **DNA•STRIP®** qui permet l'identification des souches à *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis*. Le test permet de détecter parallèlement le gène de résistance à la méticilline *mecA*, ainsi que la PVL (leucocidine de Panton et Valentine), cytotoxine à deux sous-unités facteur de virulence. La procédure complète comporte trois phases : extraction de l'ADN à partir de cultures (bactéries fraîchement cultivées en milieu solide ; matériel requis pour l'extraction de l'ADN non fourni), une amplification multiplex à l'aide d'amorces biotinylées (ADN polymérase thermostable non fournie), et hybridation inverse. Cette dernière phase comporte les étapes suivantes : dénaturation chimique de l'ADN amplifié, hybridation des amplicons simples brins biotinylés aux sondes pré-immobilisées sur la membrane, lavage stringent, et enfin addition d'un conjugué streptavidine/phosphatase alcaline suivie d'une révélation chromogénique. Les signaux obtenus sont facilement et rapidement interprétés à l'aide d'une matrice fournie avec chaque kit.

Conservation et Précautions

Dès réception, conserver le Mélange Amorces/Nucléotides (PNM) à 2-8°C et isolés de toute source d'ADN potentiellement contaminante. Si la durée de conservation doit excéder 4 semaines, conserver à -20°C. Il est recommandé d'aliquoter le PNM afin d'éviter les congélations/décongélations répétées. Conserver tous les autres composants du kit à 2-8°C. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.

Les échantillons, prélevés sur patient ou à partir de culture doivent toujours être considérés comme potentiellement infectieux. Les échantillons et les cultures provenant de patients à risque doivent toujours être étiquetés et manipulés dans des conditions de sécurité adaptées. Suivre les recommandations (fédérale, nationale, locale) d'hygiène, de sécurité et d'environnement. Se protéger à l'aide de vêtements adéquats et de gants.

Observer les précautions usuelles pour la préparation de l'amplification. Il est essentiel que le matériel et les réactifs utilisés pour l'extraction de l'ADN et pour la préparation de l'amplification soient exempts de DNases.

Lors de la manipulation du kit, tenir compte des indications de sécurité suivantes :

La **Solution de Dénaturation** (DEN) contient du NaOH (<2%) et est irritante pour la peau et les yeux (R 36/38 et S 26-37/39-45).

Le **Substrat Concentré** (SUB-C) contient du Dimethyl Sulfoxide et est irritante (R 36/37/38, S 23-26-36).

Pour des informations supplémentaires, consulter les fiches de sécurité, qui peuvent également être téléchargées à l'adresse suivante :

www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Contrôle de Qualité

Afin de contrôler le bon déroulement du test et le bon fonctionnement des réactifs, chaque bandelette comporte 2 zones de contrôle :

- une zone de Contrôle Conjugué pour contrôler la fixation du conjugué sur la bandelette et le bon déroulement de la révélation chromogénique
- une zone de Contrôle Universel qui détecte, au vue des connaissances actuelles, toutes les espèces bactériennes

Extraction de l'ADN

Le matériel de départ conseillé pour l'extraction de l'ADN consiste en des bactéries fraîchement cultivées en milieu solide. L'espace de travail doit être exempt de toute trace d'ADN amplifié. L'utilisation de bactéries cultivées en milieu liquide accroît le risque de travailler sur une population non homogène, et est susceptible de compliquer l'interprétation des résultats. Toutes les procédures d'extraction de l'ADN à partir de bactéries et produisant de l'ADN capable d'être amplifié peuvent être employées. Le protocole d'extraction rapide décrit ci-après permet également de préparer l'ADN en vue d'une amplification :

- 1a. A partir de bactéries cultivées en milieu solide : à l'aide d'une oeuze standard, prélever jusqu'à cinq colonies et les mettre en suspension dans 150 µl d'eau.

1b. A partir de bactéries cultivées en milieu liquide : Prélever directement 1 ml de milieu. Centrifuger pendant 5 minutes à 5000-6000 x g (7500-8000 rpm) sur une centrifugeuse de paillasse. Jeter le surnageant et reprendre le culot par 1 ml d'eau. Vortexer et centrifuger à nouveau comme précédemment. Jeter le surnageant et reprendre le culot bactérien dans 50 µl d'eau.

L'utilisation d'un trop grand nombre de bactéries peut inhiber la PCR. Réduire la quantité de matériel de départ lorsque des cultures de haute densité sont utilisées.

2. Incuber la solution issue des étapes 1a ou 1b à 95°C pendant 15 minutes.
3. Soniquer pendant 15 minutes dans un bain ultrasons.
4. Centrifuger 5 minutes à vitesse maximale. Utiliser directement 5 µl de surnageant pour la PCR. Si la solution d'ADN doit être conservée de façon prolongée, transférer le surnageant dans un tube nouvel.

Amplification

Préparer le mélange réactionnel (45 µl) dans une pièce exempte d'ADN. L'ADN de l'échantillon doit être rajouté dans une pièce séparée.

Préparer le mélange suivant par tube :

- 35 µl de PNM
- 5 µl de tampon d'incubation de la polymérase 10x – non fourni
- x µl de $MgCl_2$ ¹¹ – non fourni
- 1-2 unité(s) d'ADN polymérase thermostable (se référer au manuel) – non fourni
- y µl d'eau qsp 45 µl (hors volume de l'enzyme) – non fourni
- Ajouter 5 µl de solution d'ADN fraîchement extrait (20-100 ng d'ADN) pour atteindre un volume final de 50 µl (hors volume de l'enzyme).

¹¹ Selon le système tampon/enzyme utilisé, la concentration optimale de $MgCl_2$ peut varier de 1,5 à 2,5 mM. A noter que certains tampons contiennent déjà le $MgCl_2$.

Déterminer le nombre d'échantillons à amplifier (nombre d'échantillons à analyser + contrôles). Pour un contrôle négatif, par exemple, la solution d'ADN à amplifier est remplacée par 5 µl d'eau. Préparer une solution mère de mélange réactionnel contenant tous les réactifs à l'exception de l'ADN, et bien homogénéiser (ne pas vortexer). Aliquoter 45 µl du mélange réactionnel dans les tubes de PCR.

Profil d'amplification :

15 min²⁾ 95°C 1 cycle

20 sec 95°C }
30 sec 60°C } 22 cycles

²⁾ La durée de cette étape doit être raccourcie en cas d'utilisation d'ADN polymérase de type « hot start » (se référer au manuel de l'enzyme).

Les produits de l'amplification peuvent être conservés entre +4 et -20°C.

La réaction d'amplification peut être contrôlée par électrophorèse en gel en déposant directement 5 µl de chaque échantillon (sans aucun tampon additionnel). Les amplicons ont des tailles de 63 pb (Contrôle Universel), 71 pb (fragment *mecA*), 77 pb (fragment PVL), 85 pb (fragment spécifique *S. aureus*) et 125 pb (fragment spécifique *S. epidermidis*).

Hybridation

Préparation

Préchauffer le bain-marie agitateur/**TwinCubator®** à **45°C** (dérivation maximum : +/-1°C). Préchauffer les solutions HYB et STR à 37-45°C avant utilisation. Les réactifs ne doivent présenter aucun précipité (à noter cependant que la solution CON-D est opaque). Si besoin, agiter. Equilibrer les autres réactifs (à l'exception des solutions CON-C et SUB-C) à température ambiante. Dans un tube approprié, diluer le Conjugué Concentré (CON-C, orange) et le Substrat Concentré (SUB-C, jaune) au 1:100 dans un volume adéquat du tampon correspondant (**CON-C avec CON-D, SUB-C avec SUB-D**). Bien homogénéiser et équilibrer à température ambiante. Pour chaque échantillon testé, ajouter 10 µl de concentré à 1 ml de tampon. Diluer CON-C avant chaque utilisation. Une fois dilué, SUB-C reste stable pendant 4 semaines conservé à température ambiante et à l'obscurité.

Note : Ce test peut également être exécuté en suivant un protocole court qui est déposé dans l'adresse suivante : www.hain-lifescience.de/pdf/mrsa_short.pdf

1. **Déposer 20 µl de Solution de Dénaturation (DEN, bleu) à une extrémité de chaque puits utilisé.**

- Ajouter 5-20 µl d'échantillon amplifié et mélanger les deux solutions par pipetages répétés. Incuber 5 minutes à température ambiante.**

Pendant ce temps, à l'aide d'une pince, sortir du tube le nombre approprié de bandelettes (STRIPS), et inscrire au crayon leur numéro d'identification dans l'espace situé sous le marquage coloré. Toujours porter des gants pour manipuler les bandelettes.

- Ajouter dans chaque puits 1 ml de Tampon d'Hybridation (HYB, vert) préchauffé et homogénéisé. Doucement agiter le bac jusqu'à ce que le mélange devienne une coloration homogène.**

Eviter les éclaboussures vers les autres puits.

- Déposer une bandelette dans chaque puits utilisé.**

Les bandelettes doivent être entièrement recouvertes par le liquide, avec la face sensibilisée (identifiable par le marquage coloré) tournée vers le haut. Les bandelettes mal orientées doivent être remises en position à l'aide de pincettes propres. Afin d'éviter toute contamination, bien nettoyer les pincettes après chaque utilisation. Cela vaut aussi pour toutes les étapes suivantes.

- Placer le bac dans bain-marie agitateur/TwinCubator® et incuber 30 minutes à 45°C.**

Pour le bain-marie agitateur sélectionner une fréquence d'agitation suffisante pour assurer un bon brassage du tampon. Ajuster le niveau de l'eau dans le bain-marie agitateur au moins à un tiers de la hauteur du bac de façon à assurer un bon transfert de chaleur. Cela vaut aussi pour toutes les étapes suivantes.

- Aspirer le Tampon d'Hybridation.**

Utiliser par exemple une pipette pasteur reliée à une pompe à vide.

- Ajouter à chaque puits 1 ml de Solution de Lavage Stringent (STR, rouge) et incuber 15 minutes à 45°C dans le bain-marie agitateur/TwinCubator®.**

- À partir de cette étape, travailler à température ambiante.**

Eliminer la Solution de Lavage Stringent.

Vider la Solution de Lavage Stringent dans un container à déchets. Eliminer tout le liquide résiduel en retournant le bac sur du papier absorbant (effectuer de même pour les autres étapes de lavage).

- Laver chaque puits avec 1 ml de Solution de Rinçage (RIN) et incuber pendant 1 minute sous agitation (TwinCubator®/plateau agitateur). Vider la Solution de Rinçage.**

- Ajouter à chaque puits 1 ml de Conjugué dilué (voir ci-dessus) et incuber 30 minutes sous agitation (TwinCubator®/plateau agitateur).**

11. Vider le contenu des puits et rincer sous agitation 1 minute à l'aide de 1 ml de Solution de Rinçage (RIN). Vider RIN. Répéter ce rinçage une nouvelle fois, puis rincer une fois avec environ 1 ml d'eau distillée à l'aide d'une pissette.

Bien éliminer toute trace d'eau dans les puits après cette dernière étape.

12. Ajouter 1 ml de Substrat dilué (voir ci-dessus) dans chaque puits et incuber sans agitation à l'obscurité.

Le temps de révélation peut varier en fonction des conditions de déroulement du test (de 3 à 20 minutes), notamment de la température de la pièce. Des temps de révélation trop longs peuvent entraîner un bruit de fond qui peut gêner l'interprétation des résultats.

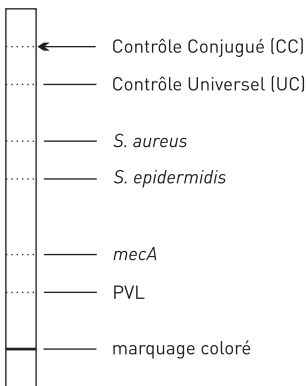
13. Arrêter la réaction en rinçant brièvement deux fois à l'eau distillée.

14. À l'aide de pincettes, récupérer les bandelettes et les sécher entre deux couches de papier absorbant.

Évaluation et Interprétation des Résultats

Classer et ranger les bandelettes à l'abri de la lumière. Une feuille d'évaluation est fournie avec le kit, mais peut également être téléchargée à l'adresse suivante : www.hain-lifescience.de/pdf/mrsa_evaluation.pdf

La matrice fournie avec le kit permet d'identifier chaque zone réactionnelle en alignant la bande CC de bandelette et de la matrice. Chaque bandelette comprend 6 zones réactionnelles (voir figure).



Remarque : Cette bandelette n'est pas représentée dans sa taille originale et ne doit donc pas être utilisée pour l'interprétation.

Contrôle Conjugué (CC)

Une ligne colorée doit se développer dans cette zone. Cette ligne témoigne de la bonne fixation du conjugué et du bon déroulement de la révélation.

Contrôle Universel (UC)

Cette zone comprend une sonde s'hybridant au niveau d'une région d'ADN hautement conservée au sein de toutes les espèces bactériennes testées à ce jour. Le développement d'une ligne colorée dans cette zone indique la présence d'ADN bactérien dans l'échantillon testé ainsi qu'une extraction et une amplification de l'ADN correctes. Puisque l'échantillon de départ étant une culture bactérienne, cette zone devrait

développer un signal positif. L'amplification du contrôle peut néanmoins être atténuée par l'amplification du (des) séquence(s) spécifique(s).

A noter que le Contrôle Universel n'est pas un contrôle de PCR puisqu'un échantillon de contrôle de contamination (eau) entraînera un signal négatif dans cette zone.

Autres bandes

Sondes spécifiques; utiliser la figure ou la matrice pour l'évaluation des résultats.

Lorsqu'aucune autres bandes ne développe de signaux positifs, les zones de contrôle doivent développer un signal positif. Si cela n'est pas le cas, il s'agit d'une réaction faussement négative, et le test doit être répété.

Toutes les lignes d'une même bandelette peuvent ne pas présenter la même intensité.

Limitations

En vue de l'amplification, l'ADN doit être extrait à partir de culture de bactéries à l'aide d'une méthode appropriée. L'ADN cible doit avoir été amplifiée efficacement pendant la réaction d'amplification.

Le test ne fonctionne que dans la région du génome dont les amorces et les sondes ont été choisis. Un séquençage potentiel doit être réalisés séparément.

La présence de différentes espèces bactériennes dans un même échantillon peut entraver l'interprétation du test.

Comme dans tout système de détection basé sur l'hybridation, il existe la possibilité que des variations situées dans la séquence d'ADN génomique cible à partir de laquelle les amorces et les sondes ont été choisis et pour lesquelles le test n'a pas été conçu, entraînent un résultat erroné. En raison de l'extrême variabilité des génomes bactériens, il est possible que certains sous-types puissent ne pas être détectés. Le test reflète l'état actuel des connaissances de la société Hain Lifescience.

L'utilisation de ce kit est réservée à un personnel qualifié déjà formé et rodé aux techniques de biologie moléculaire.

L'évaluation des performances du test a été réalisée à l'aide de la Taq polymérase HotStarTaq fournie par la société Qiagen (Hilden, Allemagne).

Causes d'Erreurs

Résultats faibles ou absence de signal (incluant la zone de Contrôle Conjugué)

- Température ambiante trop basse ou réactifs mal équilibrés.
- CON-C et/ou SUB-C n'a pas été ajouté ou était utilisé trop dilué.

Résultats faibles ou absence de signal, excepté dans la zone de Contrôle Conjugué

- La qualité et/ou la quantité de l'ADN extrait n'ont pas permis une amplification correcte. Analyser l'ADN amplifié sur un gel. Si aucun amplicon n'est visible, répéter les étapes d'extraction et d'amplification. Essayer éventuellement une autre méthode d'extraction de l'ADN (voir chapitre Extraction de l'ADN). A noter que la réaction d'amplification peut être inhibé par un échantillon de départ trop concentré.
- Température d'incubation trop élevée.

Coloration non homogène

- Les bandelettes n'ont pas été suffisamment immergées lors des différentes incubations.
- Le bac n'a pas été correctement agité.

Bruit de fond important

- CON-C et/ou SUB-C utilisé(s) trop concentré(s).
- Les étapes de lavage n'ont pas été correctement effectuées.
- Les solutions de lavage étaient trop froides lors de leur utilisation.

Résultat inattendu

- Fausse température d'incubation.
- Solution d'Hybridation et/ou Solution de Lavage Stringent incorrectement équilibrés ou homogénéisés.
- Contamination de l'ADN extrait et/ou des réactifs d'amplification avec de l'ADN précédemment extrait ou amplifié. Lorsque les réactifs d'amplification sont contaminés, un échantillon de contrôle négatif entraîne également le développement des lignes tests.
- Contamination des puits voisins par des éclaboussures lors de l'addition de la Solution d'Hybridation.
- Dans certaines conditions du test, une forte concentration d'ADN amplifié peut entraîner une réaction chromogénique très rapide. En pareil cas, afin de prévenir le

- développement de bandes dues à des réactions d'hybridation croisées, arrêter la réaction chromogénique dès que les premières lignes colorées deviennent visibles.
- La culture de départ n'est pas pure.
 - L'espèce bactérienne isolée ne peut pas être identifiée avec ce test.

Matériel Requis mais Non Fourni

- ADN polymérase thermostable avec tampon (enzyme de type « hot start » recommandée, taux d'extension : [2-4 kb/min à 72°C, demi-vie : 10 min à 97°C, 60 min à 94°C, rendement d'amplification : >10⁵]
- Bain-marie agitateur/**TwinCubator**[®]
- Chronomètre
- Eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire)
- Embouts de pipettes stériles avec filtre
- Eprouvette graduée
- Gants à usage unique
- Microtubes pour thermocycleur; exempt de contamination par DNase et RNase
- Papier absorbant
- Pincettes
- Pipettes réglables pour 10, 20, 200, et 1000 µl
- Plateau agitateur/**TwinCubator**[®]
- Réactifs pour l'extraction de l'ADN ainsi que les appareils associés
- Thermomètre calibré
- Thermocycleur (taux de chauffage : 3°C/sec, taux de refroidissement : 2°C/sec, précision : +/-0,2°C)

Composition du Kit

	Quantité	
Bandelettes sensibilisées avec les sondes spécifiques (STRIPS)	12	96
Mélange de Amorces/Nucléotides (PNM) contient amorces spécifiques, nucléotides, colorant	0,5 ml	4 ml
Solution de Dénaturation (DEN) prêt à l'emploi contient <2% NaOH, colorant	0,3 ml	2,4 ml
Solution d'Hybridation (HYB) prêt à l'emploi contient 8-10% de détergent anionique, colorant	20 ml	120 ml
Solution de Lavage Stringent (STR) prêt à l'emploi contient >25% d'un sel d'ammonium quaternaire, <1% détergent anionique, colorant	20 ml	120 ml
Solution de Rinçage (RIN) prêt à l'emploi contient du tampon, <1% NaCl, <1% de détergent, anionique	50 ml	360 ml
Conjugué Concentré (CON-C) concentré contient de la phosphatase alcaline conjugué à la streptavidine, colorant	0,2 ml	1,2 ml
Tampon Conjugué (CON-D) contient du tampon, 1% agent bloquant, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Substrat Concentré (SUB-C) concentré contient du Dimethyl Sulfoxide, solution substrat	0,2 ml	1,2 ml
Tampon Substrat (SUB-D) contient du tampon, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	20 ml	120 ml
bac, feuille d'évaluation	1 de chaque	4 de chaque
manuel d'utilisation, matrice	1 de chaque	1 de chaque

GenoType® MRSA

Test genetico molecolare per l'identificazione rapida degli stafilococchi resistenti alla meticillina da colture batteriche

Metodologia

Il test **GenoType® MRSA** si basa sulla tecnologia **DNA•STRIP®** e permette l'identificazione dei ceppi di *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. Contemporaneamente vengono rilevati la meticillino-resistenza dovuta alla presenza del gene *mecA* e le due componenti citotossiche del fattore di virulenza PVL (Panton-Valentine-leukocidin). L'intera procedura è suddivisa in tre fasi successive: isolamento del DNA da colture batteriche (colonie batteriche appena cresciute su terreno solido; i reattivi necessari non sono forniti), un'amplificazione multiplex mediante primers biotinilati (la necessaria DNA Polimerasi Termostabile non è fornita) e ibridazione inversa. L'ibridazione include i seguenti passaggi: la denaturazione chimica dei prodotti amplificati, l'ibridazione degli ampliconi biotinilati a singola elica con le sonde specifiche adese ad una membrana, un lavaggio stringente, l'aggiunta di un coniugato streptavidina/fosfatasi alcalina (AP) e infine di un substrato enzimatico cromogeno specifico per la AP. Una mascherina permette la facile e rapida interpretazione del pattern di bande ottenute.

Conservazione e precauzioni

Conservare la mix di primers e nucleotidi (PNM) a 2-8°C, in un luogo lontano da ogni possibile contaminazione con DNA. Se è necessaria una conservazione più prolungata (oltre 4 settimane) conservare a -20°C. Per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti, si consiglia di aliquotare la PNM. Conservare tutti gli altri componenti a 2-8°C. Non utilizzare i reattivi oltre la loro data di scadenza.

I campioni prelevati dai pazienti e le colture ottenute da questi campioni devono essere sempre considerati potenzialmente infettivi. I campioni di pazienti a rischio e le colture ottenute da questi campioni devono essere sempre etichettati e maneggiati in condizioni adeguate di sicurezza. Osservare tutte le norme legislative locali e nazionali in fatto di sicurezza e protezione dell'ambiente. Indossare sempre guanti e abiti protettivi.

Osservare le consuete norme e precauzioni per l'esecuzione della reazione di amplificazione. È essenziale che tutti i reattivi e i materiali utilizzati per l'estrazione del DNA e l'esecuzione dell'amplificazione siano privi di DNasi.

Nel maneggiare i reattivi del kit devono essere prese le seguenti speciali misure di sicurezza:

La **Soluzione di denaturazione** (DEN) contiene NaOH <2% ed è irritante per gli occhi e la pelle (R 36/38 e S 26-37/39-45).

Il **Substrato cromogeno concentrato** (SUB-C) contiene Dimetil-Solfossido ed è irritante (R 36/37/38, S 23-28-36).

Per ulteriori informazioni fare riferimento ai dati contenuti nella scheda di sicurezza che può anche essere scaricata dal sito:

www.hain-lifescience.com/products/msds.html.

Controllo di qualità

Al fine di validare la corretta esecuzione del test e il regolare funzionamento dei reattivi, ogni striscia presenta 2 bande di controllo:

- una banda di Controllo del Coniugato per verificare l'avvenuto legame del coniugato sulla striscia e la corretta reazione cromogena
- una banda di Controllo Universale che, come noto, rileva tutte le specie batteriche

Isolamento del DNA

Il materiale di partenza più consigliabile per l'isolamento del DNA è rappresentato da colonie batteriche appena cresciute su terreno di coltura. L'area di lavoro deve essere libera da contaminazione con DNA amplificato. In caso di utilizzo di colonie batteriche cresciute in mezzo liquido, la probabilità di avere popolazioni batteriche miste è più elevata, complicando così l'interpretazione dei risultati. Può essere utilizzata qualsiasi procedura di isolamento da materiale batterico in grado di produrre DNA amplificabile. La seguente procedura rapida può normalmente garantire DNA idoneo per l'amplificazione:

- 1a. Da coltura su terreno solido: raccogliere fino a 5 colonie con un'ansa e sospenderle in 150 µl di acqua sterile.

- 1b. Da coltura su terreno liquido: prelevare direttamente 1 ml di sospensione batterica. Creare un pellet di batteri centrifugando per 5 minuti a 5000-6000 x g (7500-8000 rpm) con una centrifuga da banco. Eliminare il surnatante, risospendere il pellet in 1 ml di acqua sterile con vortex e centrifugare come in precedenza. Eliminare nuovamente il surnatante e risospendere i batteri in 50 µl di acqua sterile.
- Una quantità eccessiva di materiale batterico utilizzato per l'isolamento del DNA può portare all'inibizione della PCR. Se si usano colture abbondanti la quantità del materiale di partenza deve essere ridotta.
2. Incubare la soluzione ottenuta dalla procedura 1a o 1b per 15 minuti a 95°C.
 3. Incubare per 15 min in un bagno ultrasonico.
 4. Centrifugare per 5 min alla massima velocità e utilizzare direttamente 5 µl del surnatante per la PCR. Nel caso non sia possibile processare subito il campione trasferire il surnatante in una nuova provetta.

Amplificazione

Preparare la mix di amplificazione (45 µl) in uno spazio lontano da possibile contaminazione con DNA. I campioni di DNA dovrebbero essere aggiunti in una stanza dedicata.

Per ogni campione miscelare:

- 35 µl di PNM
- 5 µl tampone specifico per polimerasi, 10x – non fornito
- x µl di soluzione di $MgCl_2$ ¹¹ – non fornita
- 1-2 Unità di DNA polimerasi (riferirsi al manuale d'uso) – non fornita
- y µl di acqua. La quantità aggiunta deve portare ad un volume finale della mix di 45 µl (non considerare il volume dell'enzima) – non fornita
- Aggiungere 5 µl di soluzione di DNA isolato di recente (20-100 ng DNA) fino ad un volume finale di 50 µl (non considerare il volume dell'enzima).

¹¹ La concentrazione ottimale di $MgCl_2$ dipende dal tipo di enzima usato e può variare fra 1,5 e 2,5 mM. Tener conto della quantità di $MgCl_2$ già eventualmente presente nel tampone.

Determinare il numero dei campioni da amplificare, considerando il numero dei campioni da analizzare e dei campioni di controllo. Per il controllo negativo aggiun-

gere, ad esempio, 5 µl di acqua sterile invece della soluzione di DNA. Preparare una master mix contenente tutti i reagenti ad eccezione della soluzione di DNA e miscelare bene (non vortexare). Aliquotare la mix in volumi di 45 µl nelle provette per PCR precedentemente preparate.

Protocollo di amplificazione:

15 min²⁾ 95°C 1 ciclo

20 sec 95°C }
30 sec 60°C } 22 cicli

²⁾ Nel caso di utilizzo di un enzima di tipo “Hot Start” questo passaggio va ridotto (riferirsi al manuale dell’enzima).

I prodotti amplificati possono essere conservati ad una temperatura fra +4 e -20°C. Per verificare la reazione di amplificazione si possono caricare 5 µl di ogni campione su gel di agarosio senza l’aggiunta di tampone di caricamento. Le lunghezze degli ampliconi sono rispettivamente di 63 bp (frammento del Controllo Universale), 71 bp (frammento *mecA*), 77 bp (frammento PVL), 85 bp (frammento specifico per *S. aureus*) e 125 bp (frammento specifico per *S. epidermidis*).

Ibridazione

Preparazione

Preriscaldare a **45°C** il bagno termostato dotato di agitatore/**TwinCubator®**; il massimo scarto tollerato è di $\pm 1^\circ\text{C}$. Preriscaldare prima dell'uso HYB e STR a 37-45°C. I reattivi devono essere privi di precipitati (nota comunque che la soluzione CON-D è opaca). Se necessario, miscelarli. Portare tutti gli altri reattivi a temperatura ambiente, ad eccezione del CON-C e del SUB-C. Diluire 1:100 il coniugato concentrato (CON-C, arancione) e il substrato concentrato (SUB-C, giallo) nei rispettivi tamponi di diluizione (**CON-C con CON-D e SUB-C con SUB-D**) in base ai volumi richiesti. Miscelare bene e portare a temperatura ambiente. Per ogni striscia da testare, aggiungere 10 μl di reagente concentrato in 1 ml di tampone. Diluire CON-C ogni volta prima del test. Il SUB-C diluito è stabile per 4 settimane a temperatura ambiente e protetto dalla luce.

Nota: Questo test può anche essere effettuato usando un protocollo più breve che può essere scaricato dal sito: www.hain-lifescience.de/pdf/mrsa_short.pdf

1. **Dispensare 20 μl di soluzione di denaturazione (DEN, blu) nell'angolo di ogni canale della vaschetta usato.**
2. **Aggiungere 5-20 μl di campione amplificato, miscelare bene col puntale e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.**

Nel frattempo estrarre con una pinzetta le strisce e numerarle con una matita al di sotto della marcatura colorata. Maneggiare le strisce sempre con i guanti.

3. **Aggiungere con attenzione 1 ml di Tampone di ibridazione (HYB, verde) preriscaldato in ogni canale utilizzato. Agitare gentilmente la vaschetta fino a rendere la soluzione omogeneamente colorata.**

Fare attenzione a non far traboccare il liquido nei canali vicini.

4. **Con le pinzette porre le strisce nei canali da utilizzare.**

Le strisce devono essere completamente immerse nella soluzione e con il lato su cui sono adese le sonde (identificabile dalla presenza di una marcatura colorata alla base della striscia) rivolto verso l'alto. Nel caso in cui la striscia si volti nel momento in cui è posta nel liquido, rimetterla nel giusto orientamento con le pinzette, che vanno poi accuratamente pulite per evitare contaminazioni. Questo procedimento si applica a tutti i passaggi seguenti.

5. **Porre la vaschetta su un agitatore all'interno di un bagno termostato/TwinCubator® e incubare per 30 minuti a 45°C.**

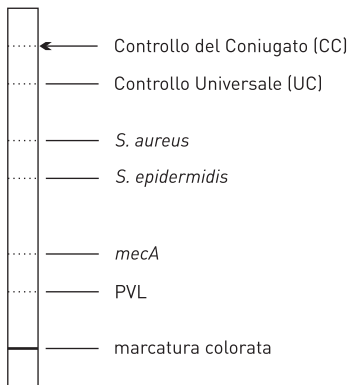
- Regolare in modo appropriato la frequenza dell'agitatore per miscelare la soluzione in modo ottimale. Per assicurare un riscaldamento adeguato la vaschetta dovrebbe restare immersa per almeno 1/3 della sua altezza.
6. **Aspirare completamente il Tampone di ibridazione.**
Usare, ad esempio, una pipetta Pasteur o un puntale collegato a una pompa a vuoto.
 7. **Aggiungere 1 ml di soluzione di lavaggio stringente (STR, rosso) ad ogni striscia e incubare per 15 minuti a 45°C sull'agitatore nel bagno termostato/TwinCubator®.**
 8. **Da questo momento in poi si lavora a temperatura ambiente. Eliminare completamente il Tampone di lavaggio stringente.**
Eliminare il Tampone di lavaggio stringente prima rovesciando la vaschetta in un contenitore per i rifiuti e poi battendola gentilmente su carta assorbente. Questo procedimento si applica ad ogni fase di lavaggio.
 9. **Lavare ogni striscia con 1 ml di soluzione di risciacquo (RIN) per 1 minuto su TwinCubator® o agitatore a temperatura ambiente. Eliminare poi la soluzione rovesciando la vaschetta.**
 10. **Aggiungere 1 ml di coniugato diluito (vedi sopra) ad ogni striscia e incubare per 30 minuti su agitatore/TwinCubator® a temperatura ambiente.**
 11. **Rimuovere la soluzione e lavare le strisce due volte per 1 minuto con 1 ml di soluzione di Risciacquo (RIN) e una volta per 1 minuto con 1 ml di acqua distillata su agitatore/TwinCubator® a temperatura ambiente.**
Assicurarsi di eliminare completamente l'acqua al termine dell'ultimo lavaggio.
 12. **Aggiungere 1 ml di substrato diluito (vedi sopra) ad ogni striscia e incubare al buio senza agitare.**
Il tempo di incubazione può variare da 3 a 20 minuti in funzione delle condizioni ambientali (ad esempio la temperatura del locale). Un tempo di incubazione prolungato può portare ad un aumento della colorazione di fondo e interferire con l'interpretazione dei risultati.
 13. **Fermare la reazione lavando con acqua distillata per due volte.**
 14. **Utilizzando le pinzette rimuovere le strisce dalla vaschetta e lasciarle asciugare fra due strati di carta assorbente.**

Letture e interpretazione dei risultati

Incollare le strisce e conservarle protette dalla luce. Nel kit è fornita una scheda di valutazione che può anche essere scaricata dal sito:

www.hain-lifescience.de/pdf/mrsa_evaluation.pdf

La mascherina di riferimento fornita nel kit serve come aiuto per la valutazione e deve essere allineata con la banda di Controllo del Coniugato della striscia. Ogni striscia possiede un totale di 6 zone reattive (vedi figura).



Nota: La striscia non è visualizzata nel formato originale e non deve essere utilizzata per l'interpretazione.

Controllo del Coniugato (CC)

Lo sviluppo di questa banda sulla striscia conferma l'efficacia del legame del coniugato e della reazione del substrato.

Controllo Universale (UC)

La sonda è diretta contro una regione di DNA altamente conservata di tutti i batteri testati fino ad ora. La comparsa della banda indica la presenza di DNA batterico e la corretta esecuzione delle fasi di estrazione ed amplificazione. Poiché il campione di partenza per questo test è una coltura batterica, questa banda di controllo deve

svilupparsi. L'amplificazione della sequenza controllo può essere comunque inibita dall'amplificazione delle sequenza(e) specifica(he).

Occorre tener presente che il Controllo Universale non è una banda di controllo della PCR, es. volendo controllare la contaminazione (aggiungendo acqua invece del campione nella preparazione della PCR) questa banda deve rimanere negativa.

Altre bande

Sonde specifiche; per la valutazione vedi figura/mascherina.

Nel caso in cui nessuna delle sonde mostri un segnale di positività, le zone di controllo devono comunque risultare positive. Se ciò non avviene si devono sospettare risultate falsi negativi e il test va ripetuto.

Non tutte le bande positive di una striscia devono mostrare la stessa intensità.

Limitazioni

Prima della fase di amplificazione il DNA deve essere isolato da colture batteriche con un metodo appropriato. Assicurarsi che il DNA venga efficientemente amplificato durante la reazione di amplificazione.

Il test opera strettamente entro i limiti della regione genomica in cui sono stati scelti i primers e le sonde. Un'eventuale analisi di sequenziamento può essere effettuata come test di completamento.

La presenza di più specie batteriche nel campione di partenza può complicare l'interpretazione del test.

Come per ogni sistema di rilevazione basato su ibridazione genica esiste la possibilità che il test, in casi di variazioni nelle sequenze geniche dalle quali i primers e le sonde sono stati scelti e per le quali il test non è stato progettato, possa dare falsi risultati. Vista l'alta variabilità del genoma batterico è possibile che alcuni sottotipi batterici possano non essere rilevati. Il test riflette l'attuale stato di conoscenza di Hain Lifescience.

L'utilizzo di questo test è limitato a personale qualificato, ben addestrato sulla procedura del test e che conosce bene le tecniche di biologia molecolare.

Le valutazioni di questo test sono state eseguite utilizzando l'enzima HotStarTaq Polymerase fornito da Qiagen (Hilden, Germania).

Risoluzione dei problemi

Bande deboli o assenti (compreso il Controllo del Coniugato)

- Temperatura ambiente troppo bassa o reagenti non equilibrati alla temperatura del locale.
- Quantità nulla o insufficiente di CON-C e/o di SUB-C usati.

Bande deboli o assenti ad eccezione del Controllo del Coniugato

- La quantità e/o la qualità del DNA estratto non garantisce un'efficiente reazione di amplificazione. Verificare la presenza degli ampliconi su gel. Se gli ampliconi non risultano visibili, ripetere la fase di estrazione e amplificazione del DNA. Se è il caso, utilizzare un altro metodo di estrazione (vedi capitolo Isolamento del DNA). Tener presente che l'amplificazione può essere inibita anche dall'uso di una quantità eccessiva di materiale batterico.
- La temperatura delle incubazioni è troppo elevata.

Colorazione non omogenea

- Le strisce non sono state completamente sommerse durante le fasi di incubazione.
- Le vaschette non sono state sufficientemente agitate.

Forte colorazione di fondo

- Il CON-C e/o il SUB-C usati troppo concentrati.
- I cicli di lavaggio non accuratamente eseguiti.
- La soluzione di lavaggio troppo fredda.

Risultati inattesi

- Temperatura di incubazione errata.
- Tampone di ibridazione e/o soluzione di lavaggio stringente non adeguatamente preriscaldati o miscelati.
- Contaminazione del DNA isolato e/o dei reattivi di amplificazione con DNA isolato e/o amplificato. Quando sono contaminati i reattivi di amplificazione, anche un eventuale controllo negativo (in cui è stata aggiunta solo acqua) mostra il relativo pattern di bande.
- Contaminazione dei canali adiacenti in seguito a schizzi durante l'aggiunta del Tampone di Ibridazione.

- Si può avere un rapido ed intenso sviluppo di una banda, che dipende dalla quantità di DNA amplificato e dalle specifiche condizioni in cui avviene la reazione. In tal caso, interrompere tempestivamente l'incubazione del substrato appena la banda diventa chiaramente visibile, per prevenire lo sviluppo di bande dovute a reazioni di cross-ibridazione.
- Il campione di partenza costituito da una coltura non pura.
- I batteri isolati non possono essere differenziati con questo test.

Materiale richiesto ma non fornito

- Acqua distillata sterile, per biologia molecolare
- Agitatore/**TwinCubator**[®]
- Bagno termostatico provvisto di agitatore/**TwinCubator**[®]
- Carta assorbente
- Cilindri graduati
- DNA Polimerasi Termostabile con relativo tampone. Si raccomanda: tipo "Hot start"; capacità di estensione 2-4 kb/min a 72°C; tempo di emivita 10 min a 97°C e 60 min a 94°C; efficienza di amplificazione >10⁵ volte
- Guanti monouso
- Pinzette
- Pipette regolabili da 10, 20, 200, 1000 µl
- Provette per PCR, DNasi e RNasi free
- Puntali monouso sterili con filtro
- Reagenti per l'isolamento del DNA e relativa strumentazione
- Termometro calibrato
- Termociclatore automatico (velocità di riscaldamento 3°C/sec; velocità di raffreddamento 2°C/sec; precisione +/-0,2°C)
- Timer

Contenuto del kit

	Quantità	
Strisce coattate con sonde specifiche (STRIPS)	12	96
Mix di primers/nucleotidi (PNM) contiene primers biotinilati specifici, nucleotidi, colorante	0,5 ml	4 ml
Soluzione di denaturazione (DEN) pronta all'uso contiene NaOH <2%, colorante	0,3 ml	2,4 ml
Tampone di ibridazione (HYB) pronto all'uso contiene tensioattivo anionico 8-10%, colorante	20 ml	120 ml
Soluzione di lavaggio stringente (STR) pronta all'uso contiene un composto ammoniacale quaternario >25%, tensioattivo anionico <1%, colorante	20 ml	120 ml
Soluzione di risciacquo (RIN) pronta all'uso contiene tampone, NaCl <1%, tensioattivo anionico <1%	50 ml	360 ml
Coniugato concentrato (CON-C) concentrato contiene streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina, colorante	0,2 ml	1,2 ml
Tampone di diluizione del coniugato (CON-D) contiene tampone, reagente bloccante 1%, NaCl <1%	20 ml	120 ml
Substrato concentrato (SUB-C) concentrato contiene Dimetil-Sulfossido, complesso substrato	0,2 ml	1,2 ml
Tampone di diluizione del substrato (SUB-D) contiene tampone, MgCl ₂ <1%, NaCl <1%	20 ml	120 ml
Vaschetta, scheda di valutazione	1 cad.	4 cad.
Foglio di istruzioni, mascherina	1 cad.	1 cad.

GenoType® MRSA

Test de Genética Molecular para la Identificación Rápida de Staphylococcus resistentes a Meticilina desde Cultivo

Metodología

El kit **GenoType® MRSA** está basado en la tecnología **DNA•STRIP®** y permite la identificación de cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*. Al mismo tiempo pueden ser detectados el gen *mecA* que media la resistencia a meticilina y el factor de virulencia de la citotoxina PVL (Panton-Valentin Leucocidina). El procedimiento completo se divide en tres pasos: aislamiento de DNA procedente de cultivo (crecimiento reciente en placas de cultivo; los reactivos necesarios no se suministran), una amplificación múltiple con primers marcados con biotina (la DNA polimerasa termoestable no se incluye), y una hibridación reversa. La hibridación incluye los siguientes pasos: desnaturalización química del producto a amplificar, hibridación de amplicones en una sola cadena, marcados con biotina, a sondas unidas a membrana, lavado astringente, adición de conjugado de fosfatasa alcalina/streptavidina (AP), y una reacción de tinción mediada por AP. Una plantilla asegura la interpretación sencilla y rápida del esquema de bandas obtenido.

Almacenamiento y Precauciones

Almacene la mezcla del Primer/Nucleótido (PNM) a 2-8°C a su llegada aislándola de cualquier fuente potencial de DNA contaminante. Si se requiere almacenamiento durante más de 4 semanas, almacene a -20°C. A fin de evitar congelaciones y descongelaciones repetidas, alicuote el PNM. Almacene el resto de los componentes del kit en 2-8°C. No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad.

Los especímenes de los pacientes y los cultivos realizados a partir de especímenes de pacientes deben ser considerados siempre como potencialmente infecciosos. Las muestras de pacientes de riesgo y los cultivos realizados a partir de esas muestras deben ser etiquetados y manejados siempre bajo las condiciones de seguridad adecuadas. Observe todas las normas medioambientales y de seguridad, tanto federales, estatales como locales. Lleve siempre guantes y ropa adecuados.

Observe las precauciones normales para preparar la amplificación. Es esencial que todos los materiales y reactivos usados para aislamiento de DNA y amplificación estén libres de DNAsas.

Cuando manipule los reactivos del kit debe tomar las siguientes medidas especiales de seguridad:

La **Solución de Desnaturalización** (DEN) contiene <2% de NaOH y es irritante para ojos y piel (R 36/38 y S 26-37/39-45).

El **Sustrato Concentrado** (SUB-C) contiene Dimetil Sulfoxido y es irritante (R 36/37/38, S 23-26-36).

Para información adicional, consulte las fichas de seguridad del material. También puede descargarse de: www.hain-lifescience.com/products/msds.htm.

Control de Calidad

A fin de validar el funcionamiento correcto del test y la funcionalidad de los reactivos, cada tira incluye 2 zonas de control:

- Una zona de Control de Conjugado para comprobar la unión del conjugado a la tira y una reacción cromogénica correcta
- Una zona de Control Universal que detecta, como es conocido, todas las especies bacterianas

Aislamiento de DNA

El material preferible de partida para aislamiento de DNA consiste en crecimiento reciente en placas de cultivo. La zona de trabajo ha de estar libre de DNA amplificado. Cuando se use crecimiento bacteriano en medio líquido, la probabilidad de poblaciones mixtas es mayor, complicando así la interpretación de los resultados. Se puede seguir cualquier procedimiento de aislamiento de DNA que produzca DNA de bacterias amplificable. El siguiente protocolo rápido normalmente produce DNA adecuado para amplificación:

- 1a. Cuando use crecimiento bacteriano en medio sólido, tome hasta 5 colonias con un asa de inoculación de muestra bacteriana y suspenda en 150 µl de agua.
- 1b. Cuando use crecimiento bacteriano procedente de medio líquido, aplique directamente 1 ml. Precipite las bacterias mediante centrifugación a 5000-6000 x g

(aprox. 7500-8000 rpm). Deseche el sobrenadante y resuspenda la bacteria en 1 ml de agua, agitando en vortex y centrifugando como anteriormente. Deseche el sobrenadante y resuspenda la bacteria en 50 μ l de agua.

El empleo de demasiado material bacteriano para aislamiento puede conducir a inhibición de la amplificación de DNA. Cuando existan cultivos con crecimiento denso, se debe reducir la cantidad de material de partida.

2. Incube la solución obtenida en 1a, o 1b a 95°C durante 15 min.
3. Incube durante 15 min. en baño ultrasónico.
4. Centrifugue durante 5 min. a velocidad máxima y use directamente 5 μ l de sobrenadante para PCR. En caso de que la solución de DNA haya de almacenarse por períodos prolongados de tiempo, transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo.

Amplificación

Prepare la mezcla de amplificación (45 μ l) en una habitación libre de DNA. La muestra debe añadirse en un área separada.

Mezcle por tubo:

- 35 μ l de PNM
- 5 μ l 10x de tampón para incubación de polimerasa – no suministrado.
- x μ l de solución $MgCl_2$ ¹⁾ – no suministrado
- 1-2 unidades de DNA polimerasa termoestable (consulte el manual) – no suministrado
- y μ l de agua para obtener un volumen de 45 μ l (sin considerar el volumen de enzima) – no suministrado.
- Añada 5 μ l de solución de DNA recién aislado (20-100 ng DNA) para obtener un volumen final de 50 μ l (sin considerar el volumen de enzima).

¹⁾ Dependiendo del sistema enzima/tampón usado, la concentración óptima de $MgCl_2$ puede variar entre 1,5 y 2,5 mM. Tenga en cuenta que algunos tampones para incubación ya contienen $MgCl_2$.

Determine el número de muestras a amplificar (número de muestras a analizar más las muestras de control). Por ejemplo, un control negativo contiene 5 μ l de agua en lugar de solución de DNA. Prepare una mezcla que contenga todos los reactivos

excepto la solución de DNA y mezcle bien. No utilice vortex. Alicuote la mezcla madre en volúmenes de 45 µl en tubos preparados de PCR.

Perfil de amplificación:

15 min²⁾ 95°C 1 ciclo

20 seg 95°C }
30 seg 60°C } 22 ciclos

²⁾ Cuando se usen ciertas DNA polimerasas hot start, este paso tiene que ser reducido (consulte el manual de la enzima).

Los productos para amplificación pueden almacenarse entre +4 y -20°C.

Para comprobar la reacción de amplificación, aplique directamente 5 µl de cada muestra a un gel de agarosa, sin la adición de tampón de carga. Los amplicones tienen una longitud de 63 bp (fragmento de Control Universal), 71 bp (fragmento *mecA*), 77 pb (fragmento PVL), 85 bp (fragmento específico de *S. aureus*) y 125 bp (fragmento específico de *S. epidermidis*), respectivamente.

Hibridación

Preparación

Precaliente en baño de agua con agitación o **TwinCubator®** a **45°C**; la máxima desviación tolerada en la temperatura idónea es de +/-1°C. Precaliente las soluciones HYB y STR a 37-45°C antes de usar. Los reactivos han de estar libres de precipitado (tenga en cuenta, no obstante que la solución CON-D es opaca). Mezcle si fuera necesario. Caliente a temperatura ambiente los restantes reactivos, con la excepción del CON-C y el SUB-C. Usando un tubo adecuado, diluya el Conjugado Concentrado (CON-C, naranja) y el Sustrato Concentrado (SUB-C, amarillo) 1:100 con sus tampones respectivos (**CON-C con CON-D, SUB-C con SUB-D**) en las cantidades necesarias. Mezcle bien y equilibre a temperatura ambiente. Para cada tira añada 10 µl de concentrado a 1 ml de los respectivos tampones. Diluya el CON-C antes de cada uso. El SUB-C diluido es estable durante 4 semanas si se almacena a temperatura ambiente y se protege de la luz.

Nota: Esta prueba también puede realizarse utilizando un protocolo más corto que puede ser descargado desde: www.hain-lifescience.de/pdf/mrsa_short.pdf

1. **Dispense 20 µl de la Solución de Desnaturalización (DEN, azul) en una esquina de cada uno de los pocillos usados.**
2. **Añada a la solución 5-20 µl de muestra amplificada, pipetee arriba y abajo para mezclar bien e incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.**
Entretanto, saque tiras de sus tubos usando pinzas e identifíquelas marcando bajo el marcador coloreado con un lápiz. Lleve siempre guantes cuando manipule tiras.
3. **Añada cuidadosamente a cada pocillo 1 ml de Tampón de Hibridación (HYB, verde) precalentado. Agite suavemente la bandeja hasta que la solución tenga un color homogéneo.**
Tenga la precaución de no derramar solución en los pocillos cercanos.
4. **Ponga una tira en cada pocillo.**
Las tiras tienen que quedar completamente cubiertas por la solución y el lado con la sonda hacia arriba (identificable por el marcador coloreado próximo al extremo inferior). Usando pinzas, de la vuelta a las tiras que pudieran haberse girado durante su inmersión. Limpie cuidadosamente las pinzas después de cada uso para evitar contaminación. Ello, es también de aplicación en los pasos siguientes.
5. **Ponga la bandeja en el baño de agua con agitación o en el TwinCubator® durante 30 minutos a 45°C.**
Ajuste la frecuencia de agitación del baño de agua para que realice una mezcla completa y constante de la solución. Para obtener una adecuada transferencia de calor, la bandeja debe estar sumergida en el agua, al menos, 1/3 de su altura.
6. **Aspire completamente el Tampón de Hibridación.**
Por ejemplo, use una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío.
7. **Añada 1 ml de Solución de Lavado Astringente (STR, roja) a cada tira e incube durante 15 minutos a 45°C en un baño con agitación o TwinCubator®.**
8. **Desde este paso, en adelante, trabaje a temperatura ambiente. Elimine completamente la Solución de Lavado Astringente.**
Deseche la Solución de Lavado en un contenedor y elimine todo el líquido restante volcando la bandeja y golpeándola suavemente sobre un papel absorbente. Ello es también de aplicación a todos los demás pasos de lavado.
9. **Lave una vez cada tira con 1 ml de Solución de Aclarado (RIN) sobre la plataforma de agitado del TwinCubator® (elimine el RIN después de la incubación).**
10. **Añada 1 ml de Conjugado diluido (ver más arriba) a cada tira e incube durante 30 minutos sobre la plataforma de agitado del TwinCubator®.**

- 11. Elimine la solución y lave cada tira dos veces durante 1 minuto con 1 ml de Solución de Aclarado (RIN) y de nuevo durante 1 minuto aproximadamente con 1 ml de agua destilada (ej.: botella de lavado) sobre la plataforma de agitación del TwinCubator® (deseche la solución cada vez).**

Asegúrese de eliminar cualquier resto de agua después del lavado anterior.

- 12. Añada 1 ml de sustrato diluido (ver más arriba) a cada tira e incube sin agitación y protegiéndolas de la luz.**

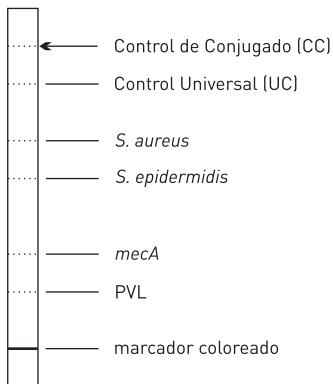
Dependiendo de las condiciones del test (por ej. la temperatura ambiente), el tiempo de incubación del sustrato puede variar entre 3 y 20 minutos. Tiempos prolongados de incubación del sustrato pueden conducir a una tinción incrementada del fondo y podría dificultar la interpretación de los resultados.

- 13. Detenga la reacción aclarando brevemente por dos veces con agua destilada.**
- 14. Usando pinzas, saque las tiras de la bandeja y séquelas entre dos capas de papel absorbente.**

Evaluación e Interpretación de Resultados

Pegue las tiras y almacénelas protegidas de la luz. Con cada kit se proporciona un formulario de evaluación. También puede descargarse de: www.hain-lifescience.de/pdf/mrsa_evaluation.pdf

La plantilla suministrada también sirve como ayuda para evaluación y ha de ser alineada con la banda de Control de Conjugado de la tira. Cada tira tiene un total de 6 zonas de reacción (ver esquema).



Nota: La tira no se muestra a tamaño original y no debe ser usada para propósitos de interpretación.

Control de Conjugado (CC)

Debe aparecer una línea en esta zona, documentando la eficacia del conjugado unido y la reacción del sustrato.

Control Universal (UC)

Esta sonda está dirigida contra una región del DNA altamente conservada que aparece en todas las especies bacterianas probadas hasta la fecha. Indica la presencia de DNA bacteriana, así como la correcta implementación de aislamiento y amplificación de DNA. Debido a que el material de partida para esta prueba es un cultivo bacteriano, esta zona de reacción tiene que revelarse. La amplificación de la

secuencia control puede, sin embargo, ser reprimida por la amplificación de la secuencia(s) específica(s).

Por favor, tenga en cuenta que el control universal no es un control de PCR, por ej.: cuando se implemente un control de contaminación (agua en lugar de solución de DNA en la preparación de la PCR) esta zona permanece negativa.

Otras bandas

Sondas específicas; para la evaluación mirar figura/plantilla.

En caso de que ninguna de las otras bandas muestren una señal positiva, las zonas de control habrán de teñirse como positivas. Si no ocurre así, se ha producido una reacción negativa falsa y el test ha de repetirse.

No todas las bandas de una tira muestran la misma intensidad.

Limitaciones

Antes de la amplificación, el DNA ha de ser aislado de cultivo bacteriano realizado por un método idóneo. Ha de tenerse la seguridad de que la muestra de DNA ha sido amplificada eficientemente durante la reacción de amplificación.

El test solo funciona dentro de los límites de las regiones genómicas para las que los primers y sondas han sido elegidos. El análisis de secuencias potenciales permanece reservado para la reanudación de investigaciones.

La presencia de múltiples especies de bacterias en la muestra a analizar puede dificultar la interpretación de resultados.

Como cualquier sistema de detección basado en la hibridación, este sistema contempla la posibilidad de que variaciones de las secuencias en las regiones genómicas que fueron elegidas para los primers y sondas, y la detección de regiones para las cuales el kit no fue diseñado, pueden conducir a resultados falsos. Debido a la gran variabilidad existente en los genomas bacterianos es posible que ciertos sub-tipos puedan no ser detectados. El test refleja los conocimientos de Hain Lifescience.

La utilización de este ensayo está limitada a personas cualificadas, bien entrenadas en el procedimiento de utilización del ensayo y familiarizadas con métodos de biología molecular.

La evaluación de este sistema de análisis fue llevada a cabo utilizando la HotStarTaq polimerasa de Qiagen (Hilden, Alemania).

Anomalías

Todas la señales son débiles o no hay señales (incluyendo la zona de Control de Conjugado)

- Temperatura ambiente demasiado baja o reactivos no equilibrados a temperatura ambiente.
- Se ha usado muy poco, o nada, de CON-C y/o SUB-C.

Ausencia de señales, o señales débiles, excepto en la zona de Control de Conjugado

- La cantidad y/o la calidad del DNA aislado no permite una amplificación eficiente. Compruebe el amplicón en un gel. En caso de que no haya amplicón visible, repita el aislamiento y amplificación de DNA. Si fuese necesario, pruebe un método diferente de aislamiento de DNA (ver sección Aislamiento de DNA). Tenga en cuenta que la amplificación puede inhibirse si se utiliza demasiado material bacteriano.
- Temperatura de incubación demasiado alta.

Tinción no homogénea

- Tiras no sumergidas por completo durante los pasos de incubación.
- Bandeja no agitada adecuadamente.

Fuerte color de fondo

- CON-C y/o SUB-B se han usado demasiado concentrados.
- Los pasos de lavado no fueron realizados con el cuidado necesario.
- Soluciones de lavado demasiado frías.

Resultado inesperado

- Temperatura de incubación incorrecta.
- El Tampón de Hibridación y/o la Solución de Lavado Astringente no se ha precalentado o mezclado adecuadamente.
- Contaminación de DNA aislado y/o agentes de amplificación con DNA aislado y/o amplificado. Cuando los reactivos de amplificación están contaminados, una muestra para control negativo también mostrará las correspondientes bandas.
- Contaminación de pocillos adyacentes debido a derrame durante la adición del Tampón de Hibridación.

- Dependiendo de la cantidad de DNA usado, y dependiendo de las condiciones específicas de la reacción, puede producirse un desarrollo fuerte y rápido de color. En tales casos interrumpa la incubación del sustrato tan pronto como las señales sean claramente visibles a fin de evitar bandas de hibridación cruzada.
- No se ha usado cultivo puro como material de partida.
- Especie bacteriana aislada no puede detectarse mediante este test.

Materiales Requeridos pero no Suministrados

- Agua destilada
- Baño de agua con agitación/**TwinCubator**[®]
- Cronómetro
- DNA polimerasa termoestable con tampón (recomendación: enzima hot start, rango de extensión: 2-4 kb/min a 72°C, vida-media 10 min a 97°C, 60 min a 94°C, eficiencia de amplificación >10⁵ doble)
- Guantes desechables
- Papel absorbente
- Pipetas ajustables de 10, 20, 200, 1000 µl
- Pinzas
- Plataforma de agitación/**TwinCubator**[®]
- Probeta graduada
- Puntas de pipeta desechables con filtro
- Reactivos para aislamiento de DNA, así como equipos necesarios
- Termómetro calibrado
- Termociclador (rango de calentamiento 3°C/seg., rango de enfriamiento 2°C/seg., precisión +/-0,2°C)
- Tubos para PCR, libres de DNasa y RNasa

Contenido del Kit

	Suministrado	
Tiras de membranas recubiertas con sondas específicas (STRIPS)	12	96
Mezcla del Primer/Nucleótido (PNM) contiene primers específicos, nucleótidos, colorante	0,5 ml	4 ml
Solución de Desnaturalización (DEN) lista para usar contiene <2% NaOH, colorante	0,3 ml	2,4 ml
Tampón de Hibridación (HYB) listo para usar contiene tenso-aniónico al 8-10%, colorante	20 ml	120 ml
Solución de Lavado Astringente (STR) lista para usar contiene compuesto cuaternario de amonio al >25%, tenso-aniónico al <1%, colorante	20 ml	120 ml
Solución de Aclarado (RIN) lista para usar contiene tampón, <1% NaCl, tenso aniónico al <1%	50 ml	360 ml
Concentrado de Conjugado (CON-C) concentrado contiene fosfatasa alcalina conjugada con streptavidina, colorante	0,2 ml	1,2 ml
Tampón Conjugado (CON-D) contiene tampón, reactivo de bloqueo al 1%, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Concentrado de Sustrato (SUB-C) concentrado contiene Dimetil Sulfoxido, solución sustrato	0,2 ml	1,2 ml
Tampón Sustrato (SUB-D) contiene tampón, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	20 ml	120 ml
Bandeja, formulario de evaluación	1 de cada	4 de cada
Manual de instrucciones, tablas	1 de cada	1 de cada

GenoType® MRSA

Teste de Genética Molecular para a Identificação Rápida de Staphylococci Resistentes à Meticilina a partir de Material Cultivado

Metodologia

O teste **GenoType® MRSA** é um teste baseado na tecnologia **DNA•STRIP®** e permite a identificação das estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Podem ser detectados, ao mesmo tempo, o gene *mecA* mediador da resistência à metilina, e o factor de virulência citotóxico PVL (Panton-Valentine leukocidin). O procedimento completo é dividido em 3 passos: extracção do ADN a partir de material cultivado (bactérias frescas cultivadas em placas de cultura; os reagentes necessários não são fornecidos), uma amplificação multiplex com primers biotinilados (a ADN polimerase termoestável não é fornecida), e uma hibridização reversa. A hibridização inclui os seguintes passos: desnaturação química dos produtos de amplificação, hibridização dos amplicons, em cadeia única e marcados com biotina, a sondas ligadas à membrana, lavagem adstringente, adição de um conjugado de streptavidina/fosfatase alcalina (AP), e uma reacção com produção de cor mediada pela AP. Um modelo assegura uma interpretação fácil e rápida do padrão de bandas obtido.

Armazenamento e Precauções

Após a chegada do kit, armazene a mistura Primer/Nucleótido (PNM) a 2-8°C, isolada de qualquer potencial fonte de ADN contaminante. Se for necessário um armazenamento longo (mais de 4 semanas), armazene a -20°C. Por forma a evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, faça alíquotas da PNM. Armazene todos os restantes componentes do kit a 2-8°C. Não use os reagentes para além do seu prazo de validade.

Os espécimes de pacientes e as culturas feitas a partir de espécimes de pacientes devem ser sempre considerados como potencialmente infecciosos. As amostras de pacientes de risco e as culturas feitas a partir dessas amostras devem ser sempre rotuladas e manuseadas sob condições adequadas de segurança. Observe todos os regulamentos ambientais e de segurança federais, estaduais e locais. Use sempre luvas e roupa protectora apropriada.

Observe as precauções habituais para preparar a amplificação. É essencial que todos os reagentes e todos os materiais usados para a extracção de ADN e para a preparação da amplificação estejam livres de DNases.

Ao manusear os reagentes do kit, devem ser aplicadas as seguintes medidas especiais de segurança:

A **Solução de Desnaturação** (DEN) contém <2% NaOH e é irritante para os olhos e para a pele (R 36/38 e S 26-37/39-45).

O **Substrato Concentrado** (SUB-C) contém Dimetil Sulfoxido e é irritante (R 36/37/38, S 23-26-36).

Para informação adicional, por favor consulte a ficha de dados de segurança dos materiais, podendo também obter-se por download a partir da morada:

www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Controlo da Qualidade

Por forma a validar o desempenho correcto do teste e o funcionamento apropriado dos reagentes, cada tira inclui 2 zonas de controlo:

- uma zona de Controlo do Conjugado, conferindo a ligação do conjugado na tira e uma reacção cromogénica correcta
- uma zona de Controlo Universal que detecta, tal como são conhecidas, todas as espécies bacterianas

Extracção de ADN

O material preferível para a extracção de ADN consiste em bactérias frescas cultivadas em placas de cultura. A área de trabalho tem que estar livre de ADN amplificado. Quando se usam bactérias cultivadas em meio líquido a probabilidade de se examinarem populações mistas é maior, o que complica a interpretação dos resultados. Poderá ser usado qualquer procedimento de extracção de ADN desde que produza ADN amplificável de bactérias. O seguinte protocolo rápido produz também, normalmente, ADN adequado para amplificação:

- 1a. Ao usar bactérias cultivadas em meio sólido, colher até 5 colónias com uma ansa de inoculação e suspender em 150 µl de água.

1b. Ao usar bactérias cultivadas em meio líquido, aplicar directamente 1 ml. Precipitar as bactérias centrifugando durante 5 min numa centrífuga de bancada normal a 5000-6000 x g (aprox. 7500-8000 rpm). Descartar o sobrenadante, re-suspender as bactérias em 1 ml de água, fazendo vortex, e centrifugar como acima descrito. Descartar o sobrenadante e resuspender as bactérias em 50 µl de água.

Usar demasiado material bacteriano para a extracção pode levar a uma inibição da PCR. Quando são usadas culturas densas, a quantidade de material inicial deve ser reduzida.

2. Incubar a solução do passo 1a ou 1b a 95°C durante 15 min.
3. Incubar durante 15 min num banho ultrasónico.
4. Centrifugar durante 5 min à velocidade máxima e usar 5 µl do sobrenadante para a PCR. No caso de a solução de ADN ser para armazenar durante um período longo, transferir o sobrenadante para um novo tubo.

Amplificação

Preparar a mistura de amplificação (45 µl) numa sala livre de ADN. A amostra de ADN deve ser adicionada numa área separada.

Mistura por tubo:

- 35 µl de PNM
- 5 µl de tampão de PCR 10x – não fornecido
- x µl de solução de $MgCl_2$ ¹⁾ – não fornecida
- 1-2 unidades de ADN polimerase termoestável (consultar o manual) – não fornecida
- y µl de água (“molecular biology grade”) para obter um volume de 45 µl (não considerando o volume de enzima) – não fornecida
- Adicione 5 µl de solução de um extracto fresco de ADN (20-100ng de ADN), levando a um volume final de 50 µl (não considerando o volume de enzima).

¹⁾ Dependendo do sistema enzima/tampão usado, a concentração óptima de $MgCl_2$ pode variar entre 1,5 e 2,5 mM. Note, por favor, que alguns tampões de incubação já possuem $MgCl_2$.

Determine o número de amostras a ser amplificadas (número de amostras a ser analisadas mais as amostras controlo). Uma amostra de controlo negativo, por exemplo, contém 5 µl de água em vez da solução de ADN. Prepare uma "master mix" contendo todos os reagentes excepto a solução de ADN e misture bem (não use o vortex). Faça alíquotas de 45 µl para tubos de PCR.

Programa de amplificação:

15 min²⁾ 95°C 1 ciclo

20 sec 95°C }
30 sec 60°C } 22 ciclos

²⁾ Com algumas ADN polimerases do tipo "hot start", este passo tem que ser reduzido (consultar, por favor, o manual da enzima).

Os produtos de amplificação poderão ser armazenados de +4 a -20°C.

Para verificar a reacção de amplificação, 5 µl de cada amostra poderão ser directamente aplicados num gel sem adição de "loading buffer". Os amplicons tem um tamanho de 63 pb (fragmento de controlo universal), 71 pb (fragmento do gene *mecA*), 77 pb (fragmento PVL), 85 pb (fragmento específico de *S. aureus*), e 125 pb (fragmento específico de *S. epidermidis*).

Hibridização

Preparação

Pré-aqueça o banho de água com agitação/**TwinCubator**[®] a **45°C**; o desvio máximo tolerado em relação à temperatura alvo é de $\pm 1^\circ\text{C}$. Pré-aqueça as soluções HYB e STR a $37\text{-}45^\circ\text{C}$ antes de as usar. Os reagentes têm que estar livres de precipitados (note, no entanto, que a solução CON-D é opaca). Misture se necessário. Aqueça os restantes reagentes, com excepção do CON-C e do SUB-C, à temperatura ambiente. Usando um tubo adequado, dilua 1:100 o Conjugado Concentrado (CON-C, laranja) e o Substrato Concentrado (SUB-C, amarelo) com as quantidades necessárias dos respectivos tampões (**CON-C com CON-D, SUB-C com SUB-D**). Agite bem e deixe estabilizar à temperatura ambiente. Para cada tira, adicione 10 μl de concentrado a 1 ml do tampão respectivo. Dilua o CON-C antes de cada utilização. O SUB-C diluído é estável durante 4 semanas se armazenado à temperatura ambiente e protegido da luz.

Note: Este teste pode também ser executado usando um protocolo mais curto, podendo obter-se por download a partir da morada:

www.hain-lifescience.de/pdf/mrsa_short.pdf

1. **Dispense 20 μl da Solução de Desnaturação (DEN, azul) num canto de cada um dos poços usados.**
2. **Adicione à solução 5-20 μl da amostra amplificada, com a pipeta aspire e dispense para misturar bem e incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.** Entretanto, retire as tiras do tubo, usando uma pinça, e marque-as com um lápis abaixo do marcador colorido. Use sempre luvas quando está a manusear as tiras.
3. **Cuidadosamente, adicione a cada poço 1 ml de Tampão de Hibridização (HYB, verde) pré aquecido. Agite suavemente a tina até que a solução adquira uma cor homogénea.**
Tenha cuidado para não salpicar solução para os poços vizinhos.
4. **Coloque uma tira em cada poço.**

As tiras têm que ficar completamente imersas na solução e com o lado revestido pelas sondas (identificável pela marcador colorido. perto da extremidade inferior) virado para cima. Usando pinças, volte as tiras que poderão ter ficado com a face referida voltada para baixo aquando da imersão na solução. Limpe cuidadosamente as pinças depois de cada utilização para evitar contaminação. O mesmo se aplica aos passos seguintes.

- 5. Coloque a tina num banho de água com agitação/TwinCubator® e incube durante 30 minutos a 45°C.**

Ajuste a frequência da agitação de maneira a obter uma mistura constante e completa da solução. Para permitir uma transferência de calor adequada, a tina tem que ser imersa na água até, pelo menos, 1/3 da sua altura.

- 6. Aspire completamente o Tampão de Hibridização.**
Use, por exemplo, uma pipeta Pasteur ligada a uma bomba de vácuo.
- 7. Adicione 1 ml de Solução de Lavagem Adstringente (STR, vermelho) a cada tira e incube durante 15 minutos a 45°C num banho de água com agitação/TwinCubator®.**

- 8. A partir deste passo, trabalhe à temperatura ambiente.**

Remova completamente a Solução de Lavagem Adstringente.

Rejeite a Solução de Lavagem para um contentor e remova todos os fluidos remanescentes, voltando ao contrário a tina e colocando-a sobre papel absorvente. Este procedimento também se aplica a todos os outros passos de lavagem.

- 9. Lave cada tira uma vez com 1 ml de Solução Rinse (RIN) durante 1 minuto numa plataforma de agitação/TwinCubator® (rejeite o RIN depois da incubação).**
- 10. Adicione 1 ml do conjugado diluído (ver acima) a cada tira e incube durante 30 minutos numa plataforma de agitação/TwinCubator® (rejeite o RIN depois da incubação).**
- 11. Remova a solução e lave cada tira duas vezes, durante 1 minuto, com 1 ml de Solução Rinse (RIN) e uma vez, durante 1 minuto, com aproximadamente 1 ml de água destilada (ex., use uma garrafa de lavagem) numa plataforma de agitação/TwinCubator® (rejeite a solução em cada lavagem).**

Assegure-se que remove quaisquer vestígios de água depois da última lavagem.

- 12. Adicione 1 ml de substrato diluído (ver acima) a cada tira e incube no escuro sem agitação.**

Dependendo das condições do teste (por ex., temperatura ambiente), o tempo de incubação do substrato pode variar entre 3 e 20 minutos. Um alongamento dos tempos de incubação do substrato pode levar a um aumento do ruído da coloração de fundo, o que pode impossibilitar a interpretação dos resultados.

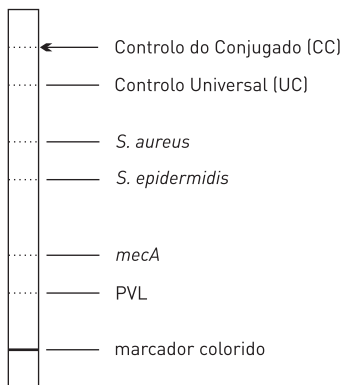
- 13. Pare a reacção enxaguando brevemente por duas vezes com água destilada.**
- 14. Usando pinças, remova as tiras da tina e seque-as entre duas camadas de papel absorvente.**

Avaliação e Interpretação dos Resultados

Cole as tiras e armazene-as protegidas da luz. Uma ficha de avaliação é fornecida com o kit, podendo também ser obtida por download em:

www.hain-lifescience.de/pdf/mrsa_evaluation.pdf

O modelo fornecido serve como ajuda para a avaliação e deve ser alinhado com a banda do Controlo do Conjugado da tira. Cada tira possui um total de 6 zonas de reacção (ver a figura).



Nota: A tira não é exibida no tamanho original e não deve ser usada para interpretação.

Controlo do Conjugado (CC)

Tem que haver desenvolvimento de uma linha nesta zona, documentando a eficiência da ligação do conjugado e da reacção do substrato.

Controlo Universal (UC)

Esta sonda é dirigida contra uma região de ADN altamente conservada que aparece em todas as espécies bacterianas testadas até agora. Indica a presença de ADN bacteriano e a implementação correcta da extracção e amplificação de ADN. Porque a fonte de material para este teste é uma cultura bacteriana, nesta zona de reacção

deve haver desenvolvimento. A amplificação da sequência de controlo pode, no entanto, ser suprimida pela amplificação da sequência específica(s).

Ter em conta que o Controlo Universal não é um controlo de PCR, i. e. ao implementar um controlo de contaminação (água em vez de solução de ADN na preparação da PCR) esta zona permanece negativa.

Outras bandas

Bandas específicas; para avaliação ver figura/molde.

No caso de nenhuma das outras bandas mostrarem um sinal positivo, as zonas de controlo devem desenvolver coloração positiva. Se não for este o caso, ocorreu uma reacção falsa positiva e o teste tem que ser repetido.

As bandas de uma tira não têm que mostrar todas a mesma intensidade de sinal.

Limitações

Antes da amplificação, o ADN tem que ser isolado a partir de bactérias cultivadas por um método adequado. Deve-se assegurar que o ADN modelo é eficientemente amplificado durante a reacção de amplificação.

O teste funciona apenas dentro dos limites das regiões genómicas para que foram escolhidos as sondas. Uma potencial análise de sequência permanece reservada para o prosseguimento das investigações.

A presença de múltiplas espécies bacterianas na amostra a ser analisada pode impedir a interpretação do teste.

Tal como qualquer sistema de detecção baseado na hibridização este sistema comporta a possibilidade de que variações de sequência das regiões genómicas para que as primers e sondas foram escolhidas, para as quais a detecção do teste não foi desenhada, possam levar a resultados falsos. Devido à alta variabilidade dos genomas bacterianos é possível que alguns sub-tipos não sejam detectados. O teste reflecte o estado de conhecimento da Hain Lifescience.

Este teste deve ser executado por pessoal bem treinado no procedimento de teste e familiarizado com métodos de biologia molecular.

O desempenho da avaliação deste sistema de teste foi realizado utilizando a HotStarTaq polymerase da Qiagen (Hilden, Germany).

Resolução de Problemas

Sinais globalmente fracos ou inexistência de sinais (incluindo a zona do Controlo do Conjugado)

- Temperatura ambiente demasiado baixa ou reagentes não equilibrados com a temperatura ambiente.
- Ausência de, ou utilização de quantidade demasiado pequena de CON-C e/ou SUB-C.

Sinais fracos ou inexistência de sinais excepto na zona do Controlo do Conjugado

- A qualidade e/ou quantidade do ADN isolado não permite uma amplificação eficiente. Verificar o amplicon num gel. No caso do amplicon não ser visível, repetir a extracção e a amplificação do ADN. Se necessário, experimentar um método diferente para a extracção (ver capítulo Extracção de ADN). Notar que a amplificação pode também ser inibida pelo uso de demasiado material bacteriano.
- Temperatura de incubação demasiado alta.

Coloração não homogénea

- As tiras não foram completamente imersas durante os passos de incubação.
- A tina não foi agitada de forma apropriada.

Alto ruído de fundo na coloração

- CON-C e/ou SUB-C usados demasiado concentrados.
- Os passos de lavagem não foram executados com o cuidado necessário.
- Soluções de lavagem demasiado frias.

Resultados inesperados

- Temperatura de incubação errada.
- Tampão de Hibridização e/ou Solução de Lavagem Adstringente não pré aquecidas ou misturadas de forma apropriada.
- Contaminação do ADN isolado e/ou dos agentes de amplificação com ADN isolado e/ou amplificado. Quando os reagentes de amplificação estão contaminados, uma amostra de controlo negativa vai mostrar também o respectivo padrão de bandas.
- Contaminação de poços vizinhos por salpicos durante a adição de Tampão de Hibridização.

- Dependendo da quantidade usada de ADN amplificado e das condições específicas de reacção, pode ocorrer um desenvolvimento de cor forte e rápido. Em tais casos, pare a incubação do substrato logo que os sinais sejam claramente visíveis, de maneira a prevenir o desenvolvimento de bandas de hibridização cruzada.
- Cultura impura como material inicial.
- A espécie bacteriana isolada não pode ser detectada por este teste.

Materiais Necessários mas não Fornecidos

- ADN polimerase termoestável com tampão (recomendação: enzima "hot start", taxa de extensão: 2-4 kb/min a 72°C, meia-vida: 10 min a 97°C, 60 min a 94°C, eficiência de amplificação:>10⁵ vezes)
- Água ("molecular biology grade")
- Banho de água com agitação/**TwinCubator**[®]
- Cilindro graduado
- Cronómetro
- Luvas descartáveis
- Papel absorvente
- Pinças
- Pipetas ajustáveis para 10, 20, 200, e 1000 µl
- Plataforma de agitação/**TwinCubator**[®] Termómetro calibrado
- Pontas de pipeta descartáveis, estéreis e com filtro
- Reagentes de extracção de ADN para amplificação, bem como o equipamento necessário
- Termociclador (taxa de aquecimento 3°C/sec, taxa de arrefecimento 2°C/sec, precisão +/- 0,2°C)
- Tubos para termociclador; livres de DNases e RNases

Conteúdo do Kit

	Fornecido	
Tiras de membrana cobertas com sondas específicas (STRIPS)	12	96
Mistura Primer/Nucleótido (PNM)		
Contém primers específicos, nucleótidos, corante	0,5 ml	4 ml
Solução de Desnaturação (DEN) pronto a usar		
Contém <2% NaOH, corante	0,3 ml	2,4 ml
Tampão de Hibridização (HYB) pronto a usar		
Contém 8-10% de tensoactivos aniónicos, corante	20 ml	120 ml
Solução de Lavagem Adstringente (STR) pronto a usar		
Contém >25% de um composto de amónio quaternário, <1% de tensoactivos aniónicos, corante	20 ml	120 ml
Solução Rinse (RIN) pronto a usar		
Contém tampão, <1% NaCl, <1% tensoactivos aniónicos	50 ml	360 ml
Conjugado Concentrado (CON-C) concentrado		
Contém o conjugado streptavidina – fosfatase alcalina, corante	0,2 ml	1,2 ml
Tampão do Conjugado (CON-D)		
Contém tampão, 1% de reagente bloqueador, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Substrato Concentrado (SUB-C) concentrado		
Contém Dimetil Sulfoxido, solução do substrato	0,2 ml	1,2 ml
Tampão do Substrato (SUB-D)		
Contém tampão, <1% NaCl, <1% MgCl ₂	20 ml	120 ml
Tina, ficha de avaliação	1 de cada	4 de cada
Manual de instruções, modelo	1 de cada	1 de cada

GenoType® MRSA

Molekulární genetická analýza pro rychlou identifikaci methicilin rezistentních stafylokoků z kultivačního materiálu.

Metodika

Test **GenoType® MRSA** je založen na **DNA•STRIP®** technologii a umožňuje identifikaci kmenů *S. aureus* a *S. epidermidis*. Současně je možné detekovat gen methicilinové rezistence *mecA* a dvousložkový cytotoxický virulenční faktor PVL (Panton-Va-lentine leukocidin). Celý postup je rozdělen do tří kroků: izolace DNA z kultivačního materiálu (bakterie čerstvě narostlé na kultivační misce; potřebné reagentie nejsou poskytovány), multiplex PCR s biotinylovanými primery (nezbytná termostabilní DNA polymeráza není součástí poskytované sady) a reverzní hybridizace. Hybridizace zahrnuje následující kroky: chemická denaturace amplifikovaných produktů, hybridizace jednořetězcových, biotinem značených, amplikonů se sondami fixovanými na proužku nitrocelulóзовé membrány, promytí, přidání konjugátu streptavidin/alkalická fosfatáza [AP], která vede k vizualizaci barevných proužků na stripech nitrocelulóзовé membrány. Snadné a rychlé vyhodnocení výsledků podle přiložené šablony a formuláře pro vyhodnocení (Tabulky).

Uskladnění a bezpečnostní opatření

Ihned po dodání uskladněte Primer/Nukleotidovou směs (PNM) při teplotě 2-8°C odděleně od jakýchkoli potencionálních zdrojů kontaminace DNA. Pokud je nutná delší doba uskladnění (více než 4 týdny), doporučuje se skladovat při teplotě -20°C. Abyste se vyhnuli opakovanému zmrazování a rozmrazování, rozdělte PNM na menší díly. Všechny ostatní komponenty kitu skladujte při teplotě 2-8°C. Nepoužívejte reagentie po uplynutí expirační doby.

Vzorky pacientů a kultury narostlé z těchto vzorků je třeba vždy považovat za potenciálně infekční. Vzorky od rizikových pacientů a kultury narostlé z těchto vzorků je vždy třeba označit a manipulovat s nimi za náležitých bezpečnostních podmínek. Dodržujte veškeré federální, státní, místní a ekologické předpisy. Vždy pracujte v ochranném oblečení a v rukavicích.

Dodržujte běžná bezpečnostní opatření pro provozy a zařízení, kde se provádí amplifikace. Je nezbytné, aby činidla a materiály používané pro izolaci DNA a amplifikaci neobsahovaly DNázy.

Při zacházení s činidly, která jsou součástí dodávané soupravy, je třeba dodržovat následující bezpečnostní opatření:

Denaturační roztok (DEN) obsahuje < 2% NaOH a dráždí oči a pokožku (R 36/38 a S 26-37/39-45).

Substrátový koncentrát (SUB-C) obsahuje dráždivý dimethylsulfoxid (R 36/37/38, S 23-26-36).

Další informace lze stáhnout z adresy:

www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Kontrola kvality

Z důvodů ověření správnosti provedeného testu a správné funkce reagensů obsahuje každý proužek 2 kontrolní zóny:

- zónu kontroly konjugátu ověřující vazbu konjugátu ke stripu a náležitou chromogenní reakci
- zónu univerzální kontroly, která detekuje veškeré známé bakteriální druhy

Izolace DNA

Pro izolaci DNA je jako výchozí materiál upřednostňována bakteriální kultura čerstvě narostlá na pevném médiu (v kultivační misce). Pracovní prostředí nesmí obsahovat amplifikovanou DNA. Jestliže jsou použity bakterie narostlé v tekutém mediu, je větší pravděpodobnost vyšetření smíšené populace a tedy i komplikované interpretace výsledků. Lze využít jakýkoli postup pro izolaci amplifikovatelné DNA z bakterií.

Následujícím rychlým postupem lze obvykle získat DNA vhodnou pro amplifikaci:

- 1a. Použijete-li bakterie kultivované na pevném médiu, odeberte inokulační kličkou 5 kolonií a ve 150 µl vody vytvořte suspenzi.
- 1b. Použijete-li bakterie kultivované v tekutém médiu, vezměte přímo 1 ml tohoto média. Stočením po dobu 5 min ve standardní stolní centrifuzě při 5000-6000 x g (7500-8000 ot/min) sedimentujte bakterie. Supernatant slijte, resuspendujte bakterie v 1 ml vody, vortexujte a krátce stočte jako v předcházejícím kroku. Su-

- pernatant slijte a resuspendujte bakterie v 50 μ l vody. Použití příliš velkého množství bakteriální hmoty pro izolaci může vést k inhibici PCR. U hustě narostlých kultur by se měl snížit obsah vstupního materiálu naředěním.
2. Inkubujte roztok získaný podle 1a nebo 1b při teplotě 95°C po dobu 15 minut.
 3. Vložte na 15 minut do sonikační lázně.
 4. Centrifugujte po dobu 5 minut při plné rychlosti a přímo použijte 5 μ l supernatantu pro PCR. V případě, že se má roztok DNA uskladňovat po delší dobu, přeneste supernatant do čisté a označené zkumavky.

Amplifikace

V místnosti bez přítomnosti DNA si připravte amplifikační směs (45 μ l). Vzorek DNA by se měl přidávat v oddělené místnosti.

Na jeden vzorek smíchejte:

- 35 μ l PNM
- 5 μ l 10x polymerační inkubační pufr – nedodává se
- x μ l $MgCl_2$ roztoku¹¹ – nedodává se
- 1-2 jednotka/ky termostabilní DNA polymerázy (odkaz na manuál) – nedodává se
- y μ l vody k doplnění do celkového objemu 45 μ l (nehledě na objem enzymu) – nedodává se
- Přidejte 5 μ l roztoku čerstvě izolované DNA (20-100 ng DNA), čímž celkově dosáhnete objemu 50 μ l (nehledě na objem enzymu).

¹¹ V závislosti na použitých enzymových/pufrovacích systémech se může optimální koncentrace $MgCl_2$ pohybovat od 1,5 do 2,5 mM. Pověšimněte si, že některé inkubační pufrы již obsahují $MgCl_2$.

Určete počet vzorků, které se mají amplifikovat (počet vzorků k analýze a vzorky kontrol). Negativní kontrolní vzorek např. obsahuje 5 μ l vody namísto roztoku DNA. Připravte si „master mix“, který obsahuje všechna činidla s výjimkou roztoku DNA a dobře je promíchejte (nepoužívejte vortex). Alikvotujte mix v objemech 45 μ l do připravených PCR zkumavek.

Amplifikační profil:

15 min²⁾ 95°C 1 cyklus

20 s 95°C
30 s 60°C } 22 cyklů

²⁾ U některých z hot start DNA polymeráz je tento krok třeba zkrátit (prosím postupujte podle manuálu pro daný enzym).

Vzorky amplifikované DNA lze uskladňovat při teplotě od +4 do -20°C.

Pro ověření amplifikační reakce použijte elektroforézu: naneste 5 µl každého vzorku přímo do gelu, bez přidání nanášecího pufu. Amplikony mají délku 63 bp (fragment univerzální kontrola), 71 bp (*mecA* gen fragment), 77 bp (PVL fragment), 85 bp (specifický fragment *S. aureus*) a 125 bp (specifický fragment *S. epidermidis*).

Hybridizace

Příprava

Předehejte třepací vodní lázeň/**TwinCubator**[®] na teplotu **45°C**; maximální tolerovaná odchylka od cílové teploty činí +/-1°C. Před použitím předehejte také roztoky HYB a STR na teplotu 37-45°C. Činidla musí být bez sraženin (povšimněte si, že roztok CON-D je neprůhledný). Podle potřeby protřepejte. Činidla s výjimkou CON-C a SUB-C nechte ohřát na laboratorní teplotu. Ve vhodné zkumavce zředte koncentrát konjugátu (CON-C, oranžový) a koncentrát substrátu (SUB-C, žlutý) v poměru 1:100 odpovídajícím pufrem (**CON-C s CON-D, SUB-C s SUB-D**) v potřebných množstvích. Dobře promíchejte a zahřejte na laboratorní teplotu. Na jeden strip si připravte 10µl koncentrátu, který se zředí 1 ml příslušného pufu. CON-C rozředte vždy před každým použitím. Naředěný SUB-C zůstane stabilní po 4 týdny, je-li uchováván za pokojové teploty a je-li chráněn před světlem.

Poznámka: Tento test může být také prováděn s použitím kratšího protokolu, který si můžete stáhnout z: www.hain-lifescience.de/pdf/mrsa_short.pdf

1. Do rohu každého zvoleného žlábků plastové destičky napipetujte 20 µl denaturačního roztoku (DEN, modrý).

2. **Přidejte k roztoku 5-20 µl amplifikovaného vzorku, opakovaným stisknutím pipety nahoru a dolů dobře promíchejte a inkubujte při laboratorní teplotě po dobu 5 minut.**

Mezitím pomocí pinzety vyjměte ze zkumavky stripy a označte je tužkou pod barevný marker. Při manipulaci se stripy pracujte vždy v rukavicích.

3. **Do každého žlábků destičky opatrně přidejte 1 ml předem zahřátého hybridizačního pufru (HYB, zelený). Opatrně pohybuje plastovou destičkou tak dlouho, dokud roztok nemá homogenní zbarvení. Dávejte pozor, abyste roztok nepřelili do sousedních žlábků.**
4. **Do každého žlábků plastové destičky vložte strip.**

Stripy musí být v roztoku úplně ponořeny a část stripu (ta strana, na níž je barevný marker poblíž spodního okraje) musí být otočena vzhůru. Pomocí pinzety přetočte stripy, které se případně mohly obrátit během vkládání do roztoku. Abyste zabránili kontaminaci, po každém použití pinzetu pečlivě očistěte (nebo použijte jinou). Totéž platí i pro následující kroky.

5. **Umístěte plastovou destičku do třepací vodní lázně/TwinCubator® a inkubujte po dobu 30 minut při teplotě 45°C.**

Upravte frekvenci třepací vodní lázně tak, abyste dosáhli stabilního a důkladného promíchání roztoku. Kvůli adekvátnímu přenosu tepla musí být plastová destička ponořena do vody alespoň 1/3 své výšky.

6. **Úplně odsajte hybridizační pufr. (Například pomocí Pasteurovy pipety připojené k vývěvě.)**
7. **Na každý strip napipetujte 1 ml odmývacího roztoku (Stringent Wash Solution) (STR, červený) a inkubujte po dobu 15 minut při teplotě 45°C v třepací vodní lázni/TwinCubator®.**

8. **Od tohoto kroku pracujte již při laboratorní teplotě.**

Úplně odstraňte odmývací roztok (Stringent Wash Solution).

Vylijte promývací roztok (Wash Solution) do nádoby na odpad a odstraňte veškerou zbylou kapalinu tím, že přetočíte plastovou destičku i se stripy dnem vzhůru a jemně ji vyklepete na savý papír. Tento postup platí i pro všechny další kroky při oplachování.

9. **Omývejte 1x každý strip v 1 ml oplachovacího roztoku (Rinse solution) (RIN) po dobu 1 minuty na třepače/TwinCubator® (po inkubaci RIN slijte).**
10. **Nalijte na každý strip 1 ml naředěného konjugátu (viz výše) a inkubujte 30 minut na třepače/TwinCubator® (po době určené na reakci RIN opět slijte).**

- 11. Vylijte roztok a oplachujte každý strip dvakrát po dobu jedné minuty v 1 ml oplachovacího roztoku (RIN) a jednou po dobu 1 minuty přibližně v 1 ml destilované vody (použijte například stříčku) za použití třepačky/TwinCubator® (pokaždé roztok vylijte).**

Ověřte si, že jste po posledním propláchnutí odstranili veškerou zbylou vodu ze žlábků plastové destičky.

- 12. Přidejte 1 ml naředěného substrátu (viz výše) na každý strip a nechte reagovat bez přístupu světla a bez jakéhokoli protřepávání.**

V závislosti na podmínkách testování (např. na laboratorní teplotě) se může doba inkubace pohybovat v rozmezí 3 až 20 minut. Prodlužování času inkubace substrátu může vést k intenzivnějšímu zbarvení pozadí a může negativně ovlivnit interpretaci výsledků.

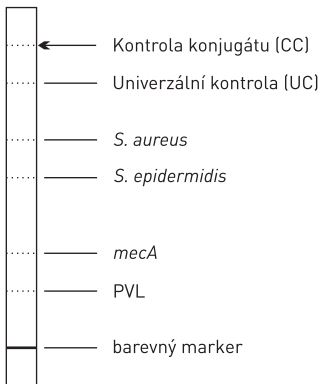
- 13. Reakci ukončete krátkým dvojnásobným propláchnutím destilovanou vodou.**
- 14. Pinzetou vyjměte stripy ze žlábků plastové destičky a usušte je mezi dvěma vrstvami savého papíru.**

Hodnocení a interpretace výsledků

Stripy nalepte a chraňte je před světlem. Formulář pro vyhodnocení (Tabulku), který tvoří součást kitu, lze stáhnout z adresy:

www.hain-lifescience.de/pdf/mrsa_evaluation.pdf

Dodávaná šablona slouží jako pomůcka pro vyhodnocení výsledků a příkládá se tak, aby proužek kontroly konjugátu na stripu odpovídal tomuto proužku (zóně) vyznačeném na šabloně. Každý strip má celkem 6 reakčních zón (proužků) (viz obrázek).



Pozn.: Membranový strip není zobrazen v originální velikosti a nesmí se používat pro interpretaci.

Kontrola konjugátu (CC)

V této oblasti se musí objevit barevný proužek (zóna), který dokládá účinnost vazby konjugátu a reakci substrátu.

Univerzální kontrola (UC)

Tato sonda je cílena proti vysoce konzervované oblasti DNA, vyskytující se u všech dosud testovaných bakteriálních druhů. Indikuje přítomnost bakteriální DNA a správné provedení izolace a amplifikace DNA. Jelikož je výchozím materiálem pro tento test bakteriální kultura, musí se tato reakční zóna vždy objevit. Amplifikace kontrolní sekvence však může být potlačena amplifikací specifických sekvencí.

Uvědomte si, prosím, že univerzální kontrola není kontrolou PCR, např. zařazením kontroly kontaminace (vody namísto roztoku DNA při přípravě PCR) zůstane zóna univerzální kontroly negativní.

Další vazebné proužky

Specifické sondy; viz obrázek/šablona.

V případě, že se nevyskytují žádné jiné pozitivní proužky, kontrolní zóny se musí barvit pozitivně. Pokud tomu tak není, jedná se o falešně negativní reakci a test musí být opakován.

Všechny proužky na membráně nemusejí vykazovat stejnou intenzitu signálu.

Omezení

Před amplifikací je třeba vhodnou metodou izolovat DNA z vykultivovaných bakterií. Je třeba zajistit, aby templátová DNA byla během amplifikační reakce dostatečně namnožena.

Test pracuje pouze v těch oblastech genomu, z nichž byly vybrány primery a sondy. Pro další vyšetření je možné použít sekvenaci.

Přítomnost různých bakteriálních druhů (smíšené bakteriální flóry) v analyzovaném vzorku by mohla komplikovat interpretaci tohoto testu.

Jako s každým detekčním systémem založeném na hybridizační bázi, lze tímto testovacím systémem detekovat velmi vzácné sekvenční variace v oblastech genomu, z nichž byly primery a sondy vybrány a detekce těchto oblastí, pro které nebyl test určen, může vést k chybným výsledkům. Vzhledem k vysoké variabilitě bakteriálních genomů je možné, že některé subtypy nebude možné tímto testem určit.

Test odráží stav znalostí firmy Hain Lifescience.

Tento test by měl být prováděn pouze kvalifikovaným a vyškoleným personálem, který je též seznámen s molekulárně biologickými metodami.

K vyhodnocení tohoto testovacího systému byla použita HotStarTaq polymeráza od firmy Qiagen (Hilden, Německo).

Odstraňování závad

Celkově slabá nebo žádná výsledná reakce (včetně kontrolního proužku konjugátu)

- Příliš nízká laboratorní teplota resp. teplota činidel nebyla vyrovnána s laboratorní teplotou.
- Chybějící CON-C a/nebo SUB-C nebo i použití příliš malého množství těchto činidel.

Slabá nebo chybějící výsledná reakce kromě kontrolního proužku konjugátu

- Kvalita a/nebo kvantita izolované DNA neumožnila účinnou amplifikaci. Ověřte množství amplifikované DNA na gelu. V případě, že není vidět žádný amplikon opakujte izolaci i amplifikaci DNA. Lze vyzkoušet i jinou metodu izolace DNA (odkaz na „Izolace DNA“). Vezměte, prosím, na vědomí, že amplifikace může být též inhibována při použití velkého množství bakterií (husté inokulum – pozn. překladu).
- Příliš vysoká inkubační teplota.

Nehomogenní barvení

- Během provádění testu nebyly stripy úplně ponořeny.
- Plastová destička nebyla řádně protřepána.

Výrazná barva pozadí

- Bylo použito příliš vysoké koncentrace CON-C a/nebo SUB-C.
- Nedostatečné promývání.
- Příliš chladný promývací roztok.

Neočekávaný výsledek

- Nesprávná inkubační teplota.
- Hybridizační pufr a/nebo odmyvací roztok (Stringent Wash Solution) nebyly dostatečně předeřhřaty nebo promíchány.
- Kontaminace izolované DNA a/nebo amplifikačních činidel izolovanou a/nebo amplifikovanou DNA. Jsou-li amplifikační činidla kontaminována, negativní kontrola (do které byla použita pouze voda) vykáže rovněž pozitivní proužek.
- Došlo ke kontaminaci sousedních žlábků přelitím při přidávání hybridizačního pufru.
- V závislosti na specifických reakčních podmínkách a na objemu použité amplifikované DNA může dojít k rychlému a barevně výraznému vývoji proužků. V těchto

- případech je nutné ihned přerušit inkubaci se substrátem, aby se předešlo cross-hybridizaci.
- Jako výchozí materiál nebyla použita čistá kultura.
 - Testované bakteriální druhy nespádají do identifikačního spektra tohoto testu.

Nezbytný, avšak nedodávaný materiál

- činidla potřebná pro izolaci DNA za účelem její amplifikace a také nezbytná vybavení
- jednorázové rukavice
- jednorázové sterilní špičky s filtrem
- kalibrovaný teploměr
- odměrný válec
- pipety nastavitelné na objem 10, 20, 200 a 1000 μ l
- pinzety
- PCR zkumavky, bez obsahu DNÁz a RNÁz
- savý papír
- stopky
- termocyklér (rychlost ohřevu teploty: 3°C/s, rychlost ochlazování: 2°C/s, přesnost: +/- 0,2°C)
- termostabilní polymeráza DNA s pufrem (doporučení: „hot start“ enzym, rychlost syntézy: 2-4 kb/min při teplotě 72°C, poločas: 10 minut při teplotě 97°C, 60 min při teplotě 94°C, amplifikační účinnost: >10⁵ násobná)
- třepací vodní lázeň/**TwinCubator**[®]
- třepačka/**TwinCubator**[®]
- voda pro molekulární biologii

Obsah dodaného kitu

	setu	
Membránové stripy s fixovanými specifickými sondami (STRIPS)	12	96
Primery/Nukleotidová směs (PNM) obsahuje specifické primery, nukleotidy, barvivo	0,5 ml	4 ml
Denaturační roztok (DEN) přímo k použití obsahuje <2% NaOH, barvivo	0,3 ml	2,4 ml
Hybridizační pufr (HYB) přímo k použití obsahuje 8-10% aniontového tenzidu, barvivo	20 ml	120 ml
Odmývací roztok (STR) přímo k použití obsahuje >25% kvartérní amoniové sloučeniny, <1% aniontového tenzidu, barvivo	20 ml	120 ml
Oplachovací roztok (RIN) přímo k použití obsahuje blokovací činidlo, <1% NaCl, <1% aniontového tenzidu	50 ml	360 ml
Koncentrát konjugátu (CON-C) koncentrát Obsahuje konjugát alkalické fosfatázy se streptavidinem, barvivo	0,2 ml	1,2 ml
Konjugační pufr (CON-D) obsahuje pufr, 1% blokovacího činidla, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Koncentrát substrátu (SUB-C) koncentrát obsahuje dimethylsulfoxid, roztok substrátu	0,2 ml	1,2 ml
Substrátový pufr (SUB-D) obsahuje pufr, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	20 ml	120 ml
Plastová destička, formulář pro vyhodnocení (Tabulka)	po 1 kusu	po 4 kusech
Příbalová informace, šablona pro vyhodnocení výsledků	po 1 kusu	po 1 kusu

HAIN
LIFESCIENCE



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany

<http://www.hain-lifescience.de>

REF

30512

12

30596

96