



BD GeneOhm™ StaphSR assay
Test BD GeneOhm™ StaphSR



REF 441253

200 Tests

IVD

REF 441252

48 Tests

Table of Contents / Table des matières

English	4-28
Intended use	4
Summary and explanation of the test	4
Principle of the procedure	5
Reagents	5
Precautions	6
Materials provided	7
Storage, handling and stability	7
Collected specimens	7
Reagents	7
Materials required but not provided	8
Instructions for use	9
Specimen collection – positive blood culture	9
Specimen collection – nasal swab	9
Specimen collection – wound swab	9
BD GeneOhm™ StaphSR assay specimen preparation	10
Cell suspension	10
Lysis	11
BD GeneOhm™ StaphSR assay procedure	11
Culturing of specimens – streak-plate method	12
Culturing of specimens – enrichment broth	13
Quality control	14
Positive and negative controls	14
Additional specimen processing, positive and negative controls	14
Interpretation of results	14
Invalid assay run	15
Unresolved specimen	15
Specimen not determined due to I-CORE® module failure	15
Limitations of the procedure	15
Performance characteristics	16
Analytical specificity	16
Analytical sensitivity	16
Clinical performance – positives blood cultures	17
Reproducibility – positive blood cultures	19
Clinical performance – nasal specimens	20
Reproducibility – nasal specimens	24
Clinical performance – wound specimens	24
Reproducibility – wound specimens	26
Français	29-54
Application	29
Résumé et explication du test	29
Principe de la procédure	30
Réactifs	31
Précautions	31
Matériel fourni	32
Conservation, manipulation et stabilité	32
Échantillons prélevés	32
Réactifs	33
Matériel nécessaire mais non fourni	33
Mode d'emploi	34
Prélèvement des échantillons – hémoculture positive	34
Prélèvement des échantillons – écouvillon nasal	34
Prélèvement des échantillons – écouvillon de plaie	35

Préparation de l'échantillon pour le test BD GeneOhm™ StaphSR	35
Suspension cellulaire	35
Lyse	36
Procédure du test BD GeneOhm™ StaphSR	37
Culture des échantillons – méthode par étalement	38
Culture des échantillons – bouillon d'enrichissement	39
Contrôle de qualité	39
Contrôles positifs et négatifs	39
Contrôles additionnels: contrôles positifs, négatifs et du traitement des échantillons	40
Interprétation des résultats	40
Série invalidée	41
Échantillons non résolus	41
Échantillons indéterminés en raison d'une défaillance du module I-CORE®	41
Limites du test	41
Caractéristiques de performance	42
Spécificité analytique	42
Sensibilité analytique	42
Performance clinique – hémocultures positives	43
Reproductibilité – hémocultures positives	46
Performance clinique – échantillons nasaux	47
Reproductibilité – échantillons nasaux	50
Performance clinique – échantillons de plaies	50
Reproductibilité – échantillons de plaies	53
References/Références	55
Index of Symbols/Table des symboles	56

English

Intended use

The BD GeneOhm™ StaphSR Assay is a qualitative *in vitro* diagnostic test for the rapid detection of *Staphylococcus aureus* (SA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) directly from positive blood culture, nasal, and wound specimens. The assay utilizes polymerase chain reaction (PCR) for the amplification of specific targets and fluorogenic target-specific hybridization probes for the real-time detection of MRSA and SA amplified DNA.

Positive blood culture specimens:

For positive blood culture specimens, the assay is used in conjunction with Gram stain to evaluate Gram positive cocci. Concomitant cultures are necessary only for recovery and identification of other organisms observed in the Gram stain, or for further susceptibility testing and/or epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* (SA) or methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Nasal specimens:

For nasal specimens, the assay is not intended to diagnose MRSA or SA infections nor to guide or monitor treatment for MRSA/SA infections. Concomitant cultures are necessary only to recover organisms for epidemiological typing or for susceptibility testing.

Wound specimens:

For wound specimens, the assay is used in conjunction with clinical signs of infection. Concomitant cultures are necessary only for recovery and identification of other organisms, or for further susceptibility testing and/or epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* (SA) or methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Summary and explanation of the test

The BD GeneOhm™ StaphSR Assay may be used with a nasal or wound swab or with an aliquot of a blood culture containing Gram positive cocci. The nasal or wound swab is collected and transported to the laboratory (a list of recommended swabs is given in the section entitled Materials required but not provided). For testing, the nasal or wound specimen is placed in sample buffer and lysed. If a positive blood culture is tested, an aliquot of the culture medium is transferred in a sample buffer tube and lysed. For all specimen types, an aliquot of the lysed specimen (lysate) is added to a mix of PCR reagents which contains the *S. aureus*- and MRSA-specific primers used to amplify the genetic targets, if present. The assay also includes an internal control (IC) to detect PCR inhibitory substances and to confirm the integrity of assay reagents. Amplified targets are detected with hybridization probes labeled with quenched fluorophores (molecular beacon probes). Amplification, detection, and result interpretation are done automatically by the Cepheid SmartCycler® software. The procedure takes about 60 to 75 minutes. Recovery of organisms for epidemiological typing or for further antibiotic susceptibility testing can be done by inoculating appropriate culture medium during specimen preparation.

S. aureus is a major cause of nosocomial infections with clinical manifestations ranging from pustules to sepsis and death¹. It is commonly found in the nose or on the skin of healthy individuals (asymptomatic carriers). In the laboratory, *S. aureus* is mainly isolated from nares, skin, wounds, and blood cultures. In hospital settings, *S. aureus* is usually transmitted from patient to patient through the contaminated hands of healthcare workers.

Treatment of *S. aureus* infections has become a real challenge with the emergence of strains resistant to previously effective antimicrobial agents. Methicillin-resistant strains of *S. aureus* are frequently encountered in health-care settings, and represent nearly 60% of isolates from hospital acquired *S. aureus* in some North American hospitals². Risk factors for infection with MRSA in healthcare settings include prolonged hospital stay, proximity to patients infected with MRSA, exposure to multiple and prolonged broad-spectrum antibiotic treatments, and MRSA carriage.

S. aureus Blood Stream Infections

S. aureus is responsible for up to 25% of bloodstream infections^{3,4}, among which 26 to 47% are caused by MRSA^{3,5}. Bacteremia due to *S. aureus* has been associated with mortality rates ranging from 25% to 35%^{4,6}, emphasizing the importance of reducing the time-to-result in order to help provide better patient management and decrease costs related to prolonged hospital stays.

S. aureus Surgical Site Infections

S. aureus infections are of huge concern for many hospital procedures. Up to 26% of patients undergoing surgery develop surgical site infections (SSI)^{2,7}. *S. aureus* has consistently been reported as the most frequent cause of SSI. Thus, this pathogen is responsible for 20 to 56% of SSI, among which MRSA could represent up to 57% of isolates⁷. The mortality rate associated with both pathogens varies from 5 to 22%^{7,8}. In most patients, the *S. aureus* isolate at the infection site is identical to the isolate from the nose of the patient^{7,9}.

S. aureus Skin and Soft Tissue Infections

S. aureus is emerging as a community-based pathogen most often involving infections of the skin and soft tissue (SSTI). These infections become aggressive if left untreated or when treatment is administered inappropriately. In some cases, these infections have led to sepsis and necrotizing pneumonia¹⁰. Recent data determined that *S. aureus* was isolated from 76% of patients with SSTIs. Of these SA isolates, 78% were MRSA¹⁰. Although more than 80% of patients with SSTIs associated with MRSA received empirical antimicrobial therapy for their infection, the infecting isolate was resistant to the agent prescribed for 57% of these patients¹⁰. Therefore, earlier identification of these organisms could enable clinicians to administer the appropriate antibiotic to reduce the risk of recurring or invasive SSTI infections.

Traditional techniques used for the detection of *S. aureus* and MRSA require culture steps and isolation of pure colonies, followed by agglutination testing to identify *S. aureus* and either oxacillin susceptibility testing, detection of the *mecA* gene, or detection of the penicillin binding protein (PBP 2a) to identify MRSA. A minimum of 16 hours are required to resolve the *S. aureus* and MRSA status, with a median time of more than 48 hours, when using these conventional methods.

With the increased morbidity and mortality associated with *S. aureus* infections, the ability to rapidly detect and differentiate *S. aureus* and MRSA within hours instead of day(s) represents a definite advantage over current practices and allows for more effective patient treatment and management.

Principle of the procedure

Following specimen lysis, amplification of the targets occurs if either or both are present [MRSA: sequence near the insertion site of the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (*SCCmec*); *S. aureus* (SA): a separate *S. aureus* specific sequence, unattached to the *SCCmec* cassette]. Amplification of the IC also takes place unless PCR inhibitory substances are present.

The amplified DNA targets are detected with molecular beacon probes, hairpin-forming single-stranded oligonucleotides labelled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the absence of target, the fluorescence is quenched. In the presence of target, the hairpin structure opens upon beacon/target hybridization, resulting in emission of fluorescence. For the detection of MRSA amplicon, the molecular beacon probe contains the fluorophore FAM at the 5' end and the non-fluorescent quencher moiety DABCYL at the opposite 3' end of the oligonucleotide. For the detection of *S. aureus* amplicon, the molecular beacon probe is labelled with the fluorophore TexasRed at the 5' end and the quencher DABCYL at the 3' end. For the detection of IC amplicon, the molecular beacon probe contains the fluorophore TET at the 5' end and the quencher DABCYL at the 3' end. Each beacon-target hybrid fluoresces at a wavelength characteristic of the fluorophore used in the particular molecular beacon probe. The amount of fluorescence at any given cycle, or following cycling, depends on the amount of specific amplicon present at that time. The SmartCycler software simultaneously monitors the fluorescence emitted by each molecular beacon probe, interprets all data, and provides a final result at the end of the cycling program (see Interpretation of Results).

Reagents

BD GeneOhm™ StaphSR Assay	48 Tests	200 Tests
Sample Buffer	60 X 1 mL	240 X 1 mL
Tris-EDTA buffer		
Lysis tube	50 tubes	200 tubes
Glass beads		
Master Mix (8 reactions each)	8 tubes	34 tubes
< 0.0005% DNA polymerase complex		
< 0.001% Internal control - non-infectious DNA containing MRSA-primer binding sequences and a unique sequence for probe hybridization		
< 0.002% primers		

< 0.002% molecular beacon probes

< 0.05% dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Bovine serum albumin

Carbohydrate

MgCl₂

< 0.001% non-infectious *Staphylococcus epidermidis* genomic DNA (ATCC 14990)

Control DNA **8 tubes** **34 tubes**

Tris-EDTA buffer

Carbohydrate

< 0.001% non-infectious genomic MRSA DNA (ATCC 43300)

Diluent **8 X 700 µL** **34 X 700 µL**

Tris-HCl buffer

MgCl₂

(NH₄)₂SO₄

KCl

Precautions

- Do not use the kit if the outer carton safety seal is broken.
- Do not use reagents if their protective pouches are open or torn upon arrival.
- Close protective pouches of Master Mix and Control DNA quickly with the zip seal after each use.
- Do not remove desiccant from Master Mix and Control DNA pouches.
- Do not use reagents if desiccant is not present inside Master Mix and Control DNA pouches.
- Reagents are not interchangeable between lots.
- Never pool reagents from different tubes even if they are from the same lot.
- Do not use reagents after their expiration date.
- Do not interchange caps among reagents as contamination may occur and compromise test results.
- Avoid microbial and deoxyribonuclease (DNAse) contamination of reagents when removing aliquots from tubes. The use of sterile DNAse-free disposable filter-blocked or positive displacement pipettor tips is recommended.
- To avoid environmental contamination with *S. aureus* and MRSA amplicons, do not open reaction tubes post-amplification.
- Use a new pipettor tip for each specimen or reagent.
- Performing the assay outside of the recommended time ranges can produce invalid results. Assays not completed within specified time ranges should be repeated.
- Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state, provincial and/or federal regulations or accrediting organizations.
- In cases where open-tube PCR tests are conducted in the same general area by the laboratory, separated and segregated working areas should be used for specimen preparation and amplification/detection activities. Supplies and equipment should be dedicated to each area and should not be moved from one area to another. Gloves must always be worn and must be changed before going from one area to another. Gloves must be changed before manipulating lyophilized reagents.
- Always handle specimens as if they are infectious and in accordance with safe laboratory procedures such as those described in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹¹ and in CLSI Document M29¹².
- Wear protective clothing and disposable gloves while handling kit reagents. Wash hands thoroughly after performing the test.
- Do not pipet by mouth.
- Do not smoke, drink, or eat in areas where specimens or kit reagents are being handled.
- Dispose of unused reagents and waste in accordance with country, federal, provincial, state and local regulations.

Materials provided

- Sample Buffer
- Lysis tube
- Master Mix
- Control DNA
- Diluent
- SmartCycler reaction tubes, 25 µL capacity
- Specimen identification labels

Storage, handling and stability

Collected specimens

Positive Blood Cultures

Positive blood culture specimens can be stored for up to 3 days at room temperature (15-25°C) before testing.

If positive blood cultures require shipment for secondary analysis, they should be kept between 2°C and 30°C during transport. Protect against freezing or exposure to excessive heat.

Positive blood culture specimens that can be tested within 18 hours can be kept at temperatures up to 35°C.

Nasal and Wound specimens

Specimens should be kept between 2°C and 25°C during transport. Protect against freezing or exposure to excessive heat.

Specimens should be tested within 36 hours.

Lysates (DNA extracts)

Internal storage studies demonstrate that lysates can be used for testing after two years when stored at -20°C.

Reagents

Note: Storage conditions must follow the specifications written on each pouch.

Kit Component		Master Mix and Control DNA (white and red strip labels)	Lysis tube (yellow cap)	Sample Buffer and Diluent (blue cap and black strip label respectively)
Sealed pouch	Temperature	2-25 °C	2-25 °C	2-25 °C
	Stability	Expiration date	Expiration date	Expiration date
Opened pouch	Temperature	2-8 °C ¹	2-25 °C ^{2,3}	2-25 °C ^{2,3}
	Stability	1 month ³	Expiration date ³	2 months ³

¹ Once the original seal on the pouch is broken, carefully close the pouch with the zip seal after each use and store at appropriate temperature.

² Although these reagents can be stored at room temperature, they should be kept with their accompanying reagents of the same lot at 2-8°C.

³ Provided that the pouch is properly closed with the zip seal after each use.

Kit Components outside of their protective pouches		Master Mix and Control DNA (white and red strip labels)	
Not reconstituted tubes	Temperature	15-25 °C	
	Stability	2 hours ¹	
Reconstituted tubes ¹	Original container	Temperature	2-8 °C
		Stability	3 hours ¹
	SmartCycler tube	Temperature	2-8 °C
		Stability	45 minutes ¹

¹ Discard unused tubes after expiration of indicated stability.

Materials required but not provided

Blood culture bottles:

- **Blood culture bottles for BACTEC™ System (BD Diagnostic Systems):**
 - **BD BACTEC™ Plus Aerobic/F catalog no 442192**
 - **BD BACTEC™ Plus Anaerobic/F catalog no 442193**
 - **BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F Culture Vials catalog no 442265**
 - **BD BACTEC™ PEDS PLUS/F Culture Vials catalog no 442194**
- **Or blood culture bottles for BacT/Alert® System (bioMérieux):**
 - **BacT/Alert® SA catalog no 259789**
 - **BacT/Alert® SN catalog no 259790**
 - **BacT/Alert® FA catalog no 259791**
 - **BacT/Alert® FN catalog no 259793**
 - **BacT/Alert® PF catalog no 259794**

Nasal and wound sample collection devices:

- **BBL™ CultureSwab™ Liquid Stuart** (Becton Dickinson catalog no. 220099), **Copan Transystem™ Liquid Stuart** (Copan Italia International catalog no. 141C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Liquid Stuart** (Copan Diagnostics Inc. catalog no. 141C.US), or
- **BBL™ CultureSwab™ Liquid Amies** (Becton Dickinson catalog no. 220093), **Copan Transystem™ Liquid Amies** (Copan Italia International catalog no. 140C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Liquid Amies** (Copan Diagnostics Inc. catalog no. 140C.US), or
- **BBL™ CultureSwab™ Plus Amies Gel without Charcoal** (Becton Dickinson catalog no. 220116), **Copan Transystem™ Amies Agar Gel without Charcoal** (Copan Italia International catalog no. 108C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Amies Agar Gel without Charcoal** (Copan Diagnostics Inc. catalog no. 108C.US), or
- **BBL™ CultureSwab™ Plus Amies Gel with Charcoal** (Becton Dickinson catalog no. 220121), **Copan Transystem™ Amies Agar Gel with Charcoal** (Copan Italia International catalog no. 114C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Amies Agar Gel with Charcoal** (Copan Diagnostics Inc. catalog no. 114C.US).

For all types of specimens:

- **Gram staining reagents**
- **BBL™ CHROMagar™ Staph aureus** catalog no. 214982, **Mannitol Salt Agar (MSA)** catalog no. 221173 or 221271 or equivalent media (optional),
- **5% sheep blood agar** (eg. **BBL™ Trypticase Soy Agar (TSA II)** with 5% Sheep Blood, BD catalog no. 221239 or 221261) (optional)
- **TSB** (tryptic soy broth) supplemented with 6.5% NaCl (optional)
- **Vortex** Genie 2 (Fisher) with 1.5 mL microtube holder or equivalent; for processing multiple samples, an adapter capable of holding multiple tubes can be used
- **Micropipettors** (accurate range between 1-10 µL, 10-100 µL and 100-1000 µL)
- **Sterile DNase-free** filter-blocked or positive displacement **micropipettor tips**
- **DNase free** microcentrifuge tubes
- Disposable **gloves**, powderless
- **Microcentrifuge** for high and low speed centrifugation
- **Dry heating block** specific for 1.5 mL tubes or water bath
- **Ice** or **cooling block** specific for 1.5 mL tubes
- **Cap removal tool** (e.g. **MATRIX** catalog no. 4469) (optional)
- **Stopwatch** or **timer**
- **SmartCycler starter system with Dx Software** (processing block, user manual, accessory kit, and computer)

Instructions for use

Specimen collection – positive blood culture

In order to obtain an adequate specimen, the procedure for specimen collection should be closely followed.

Using a recommended blood culture bottle (refer to “Materials required but not provided”):

1. Collect and process blood specimens following manufacturer instructions and hospital standard operating procedures.
2. Label and transport inoculated blood bottles according to manufacturer instructions and hospital standard operating procedures.
3. Incubate blood culture bottles using an appropriate automated blood culture system.
4. Upon positivity determination, remove blood culture bottles from incubation and refer to the section entitled “Storage, handling and stability – Collected specimens for storage and handling.”
5. Perform a Gram stain from the positive blood culture. If gram positive cocci are observed, go to “BD GeneOhm™ StaphSR assay specimen preparation” and to “Culturing of specimens” for other results.

Specimen collection – nasal swab

In order to obtain an adequate specimen, the procedure for specimen collection should be closely followed.

Using a recommended swab (refer to “Materials required but not provided”), nasal specimens should be collected according to the following procedure:

1. Moisten the swab with two drops (about 50 µL) of sterile physiological serum (saline) or use dry.
2. Carefully insert the swab into the patient’s nostril (**the swab tip must be inserted up to 2.5 cm (1 inch) from the edge of the nares**).
3. Roll the swab 5 times.
4. Insert the same swab into the second nostril and repeat steps 2 and 3.
5. Place the swab in the transport tube.
6. Label the transport tube.
7. Ship the swab to the laboratory according to hospital standard operating procedures.
8. Refer to the section entitled “Storage, handling and stability – Collected specimens for storage and handling”.

Specimen collection – wound swab

In order to obtain an adequate specimen, the procedure for specimen collection should be closely followed

Using a recommended swab (refer to “Materials required but not provided”), wound specimens should be collected according to the following procedure:

1. Remove excessive debris and all dressing tissue without unduly disturbing the wound surface using a gentle stream of normal saline.
2. Wait one to two minutes before using the swab. If the wound is fairly dry, moisten the swab with sterile normal saline. If the wound is moist, the swab can be used dry.
3. The wound swab should be taken from an area of tissue where clinical signs of infection are present. Do not swab yellow devitalized tissue, slough, or eschar.
4. Avoid surrounding skin.
5. Swab wound surface according to one of these techniques:
 - a) 10-point diagonal:
Start at one edge of the wound (“Point #1”); roll the swab diagonally over the surface of the wound to the opposite edge (“Point #2”); reverse direction and roll the swab diagonally back across the wound to the first edge (“Point #3”); repeat this process in a zig-zag pattern over the surface of the wound for a total of 10 “Points.” It is important to roll the swab over as much of the wound’s surface as possible.
 - b) one-point rotation:
In the center of the wound, apply pressure to the wound with enough force to produce a small amount of exudate or bleeding. Rotate the swab three times clockwise.

6. Collect fresh pus or wound fluid, if present.
7. Place the swab in the transport tube.
8. Label the transport tube.
9. Ship the swab to the laboratory according to hospital standard operating procedures.
10. Refer to the section entitled “Storage, handling and stability – Collected specimens” for storage and handling.

BD GeneOhm™ StaphSR assay specimen preparation

Note: One Sample Buffer tube (**blue cap**) and one Lysis tube (**yellow cap**) are required **for each specimen** to be tested. Remove the required number of tubes from their protective pouches, **remove the excess air, and close the pouches quickly with the zip seal.**

For culturing specimens prior to performing the BD GeneOhm™ StaphSR assay, refer to section “Culturing of specimens - streak-plate method” for details.

Cell suspension

For positive blood cultures:

1. **Transfer 2 µL of homogeneous positive blood culture containing Gram positive cocci to a Sample Buffer tube (blue cap).**

Label the Sample Buffer tube with the appropriate sample ID on the cap and/or the tube label.

2. **Vortex at high speed for 15 seconds.**

For processing multiple samples, an adapter capable of holding multiple tubes can be used.

3. **Transfer 50 µL of cell suspension to a Lysis tube (yellow cap); close tightly.**

Use a new pipettor tip for each specimen.

4. **Refer to the section entitled “Lysis”.**

For nasal swabs:

1. **Place the swab in a Sample Buffer tube (blue cap).**

Label the Sample Buffer tube with the appropriate sample ID on the cap and/or the tube label.

2. **Break the swab stem and close the tube tightly.**

Hold the swab by the stem near the rim of the tube (use gauze to minimize risks of contamination). Lift the swab a few millimeters from the bottom and bend the stem against the edge of the tube to break it. Alternative method: use clean scissors to cut the stem. Make sure the cap will close tightly.

3. **Vortex at high speed for one minute.**

For processing multiple samples, an adapter capable of holding multiple tubes can be used.

4. **Transfer the entire cell suspension to a Lysis tube (yellow cap).**

Use a sterile fine tip transfer pipet or a P-1000 micropipettor with an extended-length tip.

For culturing specimens with the remaining swab, refer to section “Culturing of specimens - enrichment broth” for details.

5. **Centrifuge at high speed (between 14 000 x g and 21 000 x g) for 5 minutes at room temperature.**

6. **Remove the supernatant and discard it.**

Using a sterile fine tip transfer pipet; take care not to touch the pellet. Use a new transfer pipet for each specimen.

7. **Add 50 µL of Sample Buffer to the Lysis tube; close tightly.**

Use a new pipettor tip for each specimen. Up to 20 specimens can be prepared with one Sample Buffer tube. For more than 20 specimens, use as much sample buffer tubes as required (**keep the unused buffer for later steps of the “BD GeneOhm™ StaphSR assay procedure”**).

8. **Refer to the section entitled “Lysis”.**

For wound swabs:

1. **Place the swab in a Sample Buffer tube (blue cap).**

Label the Sample Buffer tube with the appropriate sample ID on the cap and/or the tube label.

2. Break the swab stem and close the tube tightly.

Hold the swab by the stem near the rim of the tube (use gauze to minimize risks of contamination). Lift the swab a few millimeters from the bottom and bend the stem against the edge of the tube to break it. Alternative method: use clean scissors to cut the stem. Make sure the cap will close tightly.

3. Vortex at high speed for 1 minute.

For processing multiple samples, an adapter capable of holding multiple tubes can be used.

4. Transfer 50 µL of cell suspension to a Lysis tube (yellow cap); close tightly.

Use a new pipettor tip for each specimen.

For culturing specimens with the remaining swab, refer to section “Culturing of specimens - enrichment broth” for details.

5. Refer to the section entitled “Lysis”.**Lysis****1. Vortex the Lysis tube containing the cell suspension for 5 minutes at high speed.**

For processing multiple samples, an adapter capable of holding multiple tubes can be used.

2. Centrifuge the Lysis tube briefly (quick spin).

At low speed for 2 to 5 seconds; to bring the contents to the bottom of the tube.

3. Heat at 95 ± 2 °C for two (2) minutes.

Use a dry heating block specific for 1.5 mL tubes, or a water bath.

4. Keep the Lysis tube on ice or on a cooling block.

If the lysates cannot be used for immediate testing, store them at -20 ± 5 °C for later use.

BD GeneOhm™ StaphSR assay procedure

Note: One reconstituted Master Mix tube (**white label**) will yield enough reagents **to run 8 reactions**. Allow one SmartCycler tube per specimen to be tested and 2 additional SmartCycler tubes for the positive and the negative controls. **One (1) positive and one (1) negative control must be included in each BD GeneOhm™ StaphSR assay run. One Control DNA (red strip label) is required per assay run. One Diluent tube (black strip label) is required for the preparation of up to 3 Master Mix tubes. Remove the required number of tubes from their protective pouches, remove the excess air, and close the pouches quickly with the zip seal.**

Prepare only enough SmartCycler tubes to fill available I-CORE® modules on the SmartCycler instrument.

1. Place the required number of Master Mix tube(s) on ice or on a cooling block specific for 1.5 mL tubes.**2. Add 225 µL of diluent (black strip label) to each Master Mix tube.**

Insert the micropipettor tip through the septum of the cap of the Master Mix tube. Do not insert the tip too deeply into the cap. Deliver the diluent. Discard the unused Diluent afterwards.

3. Vortex the tube(s) for 5-10 seconds.

Place the tube on ice or on a cooling block specific for 1.5 mL tubes until ready for use (reconstituted Master Mix tubes are stable for 3 hours on ice or on a cooling block).

4. Place a Control DNA tube (red strip label) on ice or on a cooling block specific for 1.5 mL tubes.**5. Add 225 µL of sample buffer (blue cap) to the Control DNA tube.**

Insert the micropipettor tip through the septum of the cap of the Control DNA tube. Do not insert the tip too deeply into the cap. Deliver the sample buffer.

6. Vortex the tube for 5-10 seconds.

Place the tube on ice or on a cooling block specific for 1.5 mL tubes until ready to use.

7. Place the required number of SmartCycler tubes on the SmartCycler cooling block.

Allow one SmartCycler tube per specimen and two more SmartCycler tubes for the controls. **Avoid touching the optical detection windows at the bottom edges of the tube as well as the lower diamond-shaped area.**

The following steps MUST be performed WITHIN FORTY-FIVE MINUTES:

- 8. Add 25 µL of reconstituted Master Mix to the SmartCycler tubes (appropriate pipetting technique required to ensure proper transfer of the solution).**

Remove the cap before pipetting the reagent. Deliver the liquid into the reservoir (upper part) of the SmartCycler tubes. Identify the SmartCycler tubes on the cap. Specimen identification labels can be used (provided with the kit). Discard the unused Master Mix.

- 9. Add 3.0 µL of each lysed specimen to a different SmartCycler tube previously filled with reconstituted Master Mix; close the tubes.**

Be careful not to aspirate beads when pipetting from the Lysis tube. After addition of the specimen, pipet up and down 2-3 times in the reservoir to ensure transfer of the complete volume. Use a new micropipettor tip for each specimen.

- 10. Add 3.0 µL of the reconstituted Control DNA to the next to last SmartCycler tube (Positive Control); close the tube.**

After addition of the DNA, pipet up and down 2-3 times in the reservoir to ensure transfer of the complete volume. Identify as the positive control. Discard the unused Control DNA.

- 11. Add 3.0 µL of sample buffer (blue cap) to the last SmartCycler tube (Negative Control); close the tube.**

Use the Sample Buffer tube from step 5. This will monitor for PCR contamination that might occur during manipulation of specimens. Identify as negative control. Discard the unused sample buffer afterward.

- 12. Centrifuge all reaction tubes for 5-10 seconds.**

Use the specially adapted microcentrifuge provided with the SmartCycler instrument.

- 13. Keep the tubes at 2-8 °C on the SmartCycler cooling block before loading on the instrument.**

The remaining lysates should be frozen at -20 ± 5 °C for later use, if necessary.

- 14. Create a run with the BD GeneOhm™ StaphSR assay protocol.**

Refer to the SmartCycler Dx Software Operator Manual if needed. Enter the identification parameters for the specimens before starting the run.

- 15. Insert each reaction tube into an I-CORE module of the SmartCycler and close the I-CORE lid.**

Place the positive and negative controls at their appropriate position (see the section entitled "Quality control"). Press all the tubes firmly down into place.

- 16. Start the run.**

Culturing of specimens - streak-plate method

To perform antimicrobial susceptibility testing or epidemiological typing, use the streak-plate method outlined below.

For positive blood cultures:

1. When Gram positive cocci are observed from positive blood culture, inoculate a blood agar plate or other appropriate solid media by transferring a few drops of the positive blood culture onto the first quadrant of the plate(s).
2. With a sterile inoculating loop or needle, streak the inoculum into the remaining quadrants of the plate(s).
3. Incubate the plate(s) for 24-48 hours at 35 °C.
4. Identify colonies and perform antimicrobial susceptibility testing according to standard methods.

For nasal swabs:

1. Remove the collection device (swab) from its container.
2. Inoculate a mannitol salt agar (MSA) plate or other appropriate solid media by streaking onto the first quadrant of the plate(s).
3. Return the swab in its container or break it in a Sample Buffer tube (blue cap) of BD GeneOhm™ StaphSR and continue according to instructions in section "Specimen preparation".
4. With a sterile inoculating loop or needle, streak the inoculum into the remaining quadrants of the plate(s).

5. Incubate the plate(s) for 24-48 hours at 35 °C.
6. Identify *S. aureus* colonies and test for methicillin resistance according to standard methods.

For wound swabs:

1. Remove the collection device (swab) from its container.
2. Inoculate a blood agar plate or other appropriate solid media by streaking onto the first quadrant of the plate(s).
3. Return the swab in its container or break it in a Sample Buffer tube (blue cap) of BD GeneOhm™ StaphSR and continue according to instructions in section “Specimen preparation”.
4. With a sterile inoculating loop or needle, streak the inoculum into the remaining quadrants of the plate(s).
5. Incubate the plate(s) for 24-48 hours at 35 °C.
6. Identify colonies and perform antimicrobial susceptibility testing according to standard methods.

Culturing of specimens - enrichment broth

This culture method can be performed with swabs left behind in the Sample Buffer tube following the transfer of the cell suspension into the lysis tube. Swabs can be stored at 2-8°C in closed Sample Buffer tubes for up to 24 hours before culturing; recovery may not be successful with specimens containing low amounts of MRSA or SA.

For nasal swabs:

1. Add 1.0 mL of enrichment broth to Sample Buffer tubes containing the swab. TSB (tryptic soy broth) supplemented with 6.5% NaCl is suggested.
2. Vortex for 2-5 seconds.
3. Incubate for 24 hours at 35 °C. If there is no growth, continue the incubation until 48 hours.
4. Subculture on an appropriate solid medium for 24-48 hours at 35 °C. 5% sheep blood agar plate or MSA plate is suggested.
5. Identify *S. aureus* colonies and test for methicillin resistance according to standard methods.

For wound swabs:

1. Transfer 300 µL of cell suspension left behind in the Sample Buffer tube to 5.0 mL of enrichment broth. TSB (tryptic soy broth) supplemented with 6.5% NaCl is suggested.
2. Vortex for 2-5 seconds.
3. Incubate for 24-48 hours at 35 °C.
4. Subculture on an appropriate solid medium for 24-48 hours at 35 °C. 5% sheep blood agar plate is suggested.
5. Identify colonies and perform antimicrobial susceptibility testing according to standard methods.

Quality control

Positive and negative controls

Quality control procedures are designed to monitor assay performance. The positive control is intended to monitor substantial reagent failure. The negative control is used to detect reagent or environmental contamination (or carry-over) by either *S. aureus* or MRSA DNA or amplicons. Positive and negative controls are assay controls (run controls). An invalid control invalidates the run. Finally, an internal control incorporated into each reaction mixture is intended to monitor PCR inhibition in each specimen as well as reagent integrity.

One positive control and one negative control must be included in each assay run on the SmartCycler. The software automatically assigns the position of the controls on the instrument (refer to the SmartCycler Dx Software Operator Manual). All specimens and controls should yield valid results (no invalid positive or negative control and no failed internal control).

Additional specimen processing, positive and negative controls

Control strains may be tested according to guidelines or requirements of local, state and/or federal regulations or accreditation organizations. A reference MRSA strain (e.g. American Type Culture Collection, ATCC 43300), a well characterized MRSA clinical isolate, a reference MSSA strain (e.g. ATCC 25923) or a well characterized clinical specimen may be used as a specimen processing control; MRSA MREJ (Mec Right Extremity Junction) type iii and vii strains, if available, may be used as additional positive controls, to monitor assay probes and primers not directly controlled in the assay; while any other non-*Staphylococcus aureus* (e.g. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990) may be used as an external negative control.

Positive blood cultures:

Resuspend isolated colonies from an 18- to 24-h 5% sheep blood agar plate in saline to a turbidity of 0.5 McFarland (~1.5 X 10⁸ CFU/mL). Process and test as a specimen (refer to the sections entitled "BD GeneOhm™ StaphSR assay specimen preparation" and "BD GeneOhm™ StaphSR assay procedure"). For general QC guidance, the user may wish to refer to CLSI MM3¹³ and C24¹⁴.

Nasal and Wound specimens:

Resuspend isolated colonies from an 18- to 24-h 5% sheep blood agar plate in saline to a turbidity of 0.5 McFarland (~1.5 X 10⁸ CFU/mL). Dilute with saline to obtain a suspension of ~10⁶ CFU/mL. Dip recommended swab (refer to "Materials required but not provided") into the bacterial suspension, press out excess fluid, place the swab in its container (to allow contact with transport medium), and let stand at room temperature for 5 minutes. Process and test as a specimen (refer to the sections entitled "BD GeneOhm™ StaphSR assay specimen preparation" and "BD GeneOhm™ StaphSR assay procedure"). For general QC guidance, the user may wish to refer to CLSI MM3¹³ and C24¹⁴.

Interpretation of results

The decisional algorithm for the BD GeneOhm™ StaphSR assay is embedded in the SmartCycler software. The interpretation of assay results is done according to the following criteria:

Assay result reported	IC result reported	Interpretation of result
NEG	PASS	No <i>S. aureus</i> DNA detected
POS	NA	MRSA DNA detected
Reactive	NA	<i>S. aureus</i> DNA detected, no MRSA DNA detected
Unresolved	FAIL	Unresolved—inhibitory specimen or reagent failure
ND	ND	Not determined due to I-CORE Module failure (with Warning or Error Codes ¹)

IC - Internal Control; NA – not applicable; ND – not determined

¹ Refer to the SmartCycler Dx Software Operator Manual for interpretation of warning and error codes.

An invalid positive or negative control invalidates the assay run. In such cases, assay results obtained for that run are invalid and must not be reported. Invalid assay runs, instrument error codes, and

instrument warnings are flagged on-screen and on reports. Before reporting results, always verify that the assay run is valid.

Refer to the SmartCycler Dx Software Operator Manual for printing of results.

Invalid assay run

Using each frozen specimen lysate, prepare new reaction tubes for all specimens within that assay run along with new control tubes.

Unresolved specimen

Repeat testing with the corresponding frozen specimen lysate. The effect of the freeze-thaw cycle has been shown to reduce PCR inhibitory substances.

Specimen not determined due to I-CORE module failure

Repeat testing with the corresponding frozen specimen lysate. For the interpretation of warning or error code messages, refer to the SmartCycler Dx Software Operator Manual.

Limitations of the procedure

- The performance characteristics of this assay have not been established with automated real-time PCR instruments other than the SmartCycler instrument.
- The use of blood culture media and swabs other than those listed in the “Materials required but not provided” section is not recommended. This test is for use only with positive blood culture bottle specimens, nasal specimens and wound specimens; performance characteristics of other clinical specimen types have not been established.
- Negative test results may occur from improper specimen collection, handling or storage, presence of inhibitor, technical error, sample mix-up or because the number of organisms in the specimen is below the analytical sensitivity of the test. Careful compliance with the instructions given in this insert and in the SmartCycler Dx Software Operator Manual is necessary to avoid erroneous results. Use of this test should be limited to personnel trained on the procedure and on the use of the SmartCycler.
- Although there is no need for reagent preparation and the main technical operation is pipetting, good laboratory technique is essential to the proper performance of this assay. Due to the high analytical sensitivity of this test, extreme care should be taken to preserve the purity of all reagents, especially in cases where multiple aliquots are taken from a tube.
- BD GeneOhm™ StaphSR assay results may sometimes be unresolved, not determined (due to I-CORE module failure) or invalidated by an invalid control. Retesting will be required which can lead to delays in obtaining assay results.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. It is however presumptive for the presence of *Staphylococcus aureus* or MRSA. For MRSA detection, the BD GeneOhm™ StaphSR assay simultaneously targets the SCC_{mec} cassette (carrying the *mecA* gene) and a *S. aureus* specific sequence located within the *orfX* gene. The BD GeneOhm™ StaphSR assay does not detect the *mecA* gene directly nor the penicillin binding protein (PBP 2a) encoded by this gene. For *S. aureus* detection, the BD GeneOhm™ StaphSR assay directly targets a sequence specific to *S. aureus*.
- Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown *S. aureus* variants resulting in a false negative result with the BD GeneOhm™ StaphSR assay.
- In a mixed culture containing both MRSA and MSSA, the LoD of MRSA can be variable (up to 30 copies/reaction) when extremely high concentrations of MSSA are present (e.g. a ratio of MRSA:MSSA of 1:500 or 1:1000).
- Preparation of Master Mix and positive and negative controls must be done in an environment that does not exceed 25°C.
- Potentially interfering substances include, but are not limited to the following: blood, nasal secretion, decongestant, and substances occasionally used to relieve nasal dryness and/or irritation. The presence of nasal secretion and blood may inhibit PCR and give unresolved results.

Performance characteristics

Analytical specificity

Genomic DNA from 66 non-Staphylococcal strains (representing 64 species), along with genomic DNA from 33 coagulase-negative *Staphylococcus* strains (representing 25 species) were tested. All species were either phylogenetically related to *S. aureus* or commonly found associated with the human body. None of these samples tested positive, hence the analytical specificity was 100%.

Analytical sensitivity

Limit of Detection (LoD) Determination Using Genomic DNA

The analytical sensitivity (limits of detection or LoDs) of the BD GeneOhm™ StaphSR Assay testing genomic DNA were determined using decreasing amount of quantified (copies/PCR reaction) genomic DNA from cultures of 6 MRSA strains that represent 6 MREJ genotypes (i, ii, iii, iv, v, and vii) and 4 SCC*mec* types (I, II, III, IV) and genomic DNA from 1 MSSA strain. Each strain was tested in replicates of at least 48 per concentration by 2 different operators using 3 different lots of BD GeneOhm™ StaphSR Assay Master Mix. Analytical sensitivity (LoD), defined as the lowest concentration at which ≥ 95% of all replicates are expected to be positive, ranged from 2 to 6 copies/PCR reaction for MRSA, with an average value of 4 DNA copies/PCR reaction, and from 13 to 17 copies/PCR reaction for MSSA, with a value of 15 DNA copies/PCR reaction.

	MREJ Genotype	SCC <i>mec</i> Type	LoD Concentration (Copies/PCR Reaction) (with 95% CI*)
MRSA	type i	I	3 (2-3)
	type ii	II	4 (3-5)
	type iii	III	5 (4-6)
	type iv	III	5 (4-6)
	type v	IV	3 (2-3)
	type vii	II	3 (3-4)
MSSA	NA	NA	15 (13-17)

NA: Not Applicable

*CI: Confidence Intervals

Limit of Detection (LoD) Determination Using Viable Bacteria

The analytical sensitivity (limits of detection or LoDs) of the BD GeneOhm™ StaphSR Assay testing viable MRSA and MSSA strains were determined using simulated positive swabs that were prepared by soaking swabs in a wide range of MRSA and MSSA bacterial suspensions prepared and quantified from cultures of 6 MRSA strains that represent 6 MREJ genotypes (i, ii, iii, iv, v, and vii) and 4 SCC*mec* types (I, II, III, IV) and from 1 MSSA strain, and then discharged/eluted in Sample Buffer. Each strain was tested in replicates of 24 per concentration by 4 different operators using 3 different lots of BD GeneOhm™ StaphSR Assay Master Mix. In nasal specimens, analytical sensitivity (LoD), defined as the lowest concentration at which ≥ 95% of all replicates are expected to be positive, ranged from 24 to 319 CFU/swab for MRSA, with an average of 109 CFU/swab, and from 198 to 1084 CFU/swab for MSSA, with a value of 641 CFU/swab. In wound specimens, analytical sensitivity (LoD) ranged from 95 to 770 CFU/swab for MRSA, with an average of 314 CFU/swab, and from 449 to 834 CFU/swab for MSSA, with a value of 642 CFU/swab. In positive blood culture specimens, analytical sensitivity (LoD) is 10 CFU per reaction; however, due to the enrichment process involved in blood cultures, all blood culture specimens contain very high bacterial loads resulting in DNA copy numbers per reaction well above the LoD of the assay.

Nasal Application

	MREJ Genotype	SCC _{mec} Type	LoD Concentration (CFU/swab) (with 95% CI*)
MRSA	type i	I	34 (24-44)
	type ii	II	104 (74-134)
	type iii	III	45 (32-58)
	type iv	III	167 (113-221)
	type v	IV	67 (50-84)
	type vii	II	236 (153-319)
MSSA	NA	NA	641 (198-1084)

NA: Not Applicable

*CI: Confidence Intervals

Wound Application

	MREJ Genotype	SCC _{mec} Type	LoD Concentration (CFU/swab) (with 95% CI*)
MRSA	type i	I	340 (243-436)
	type ii	II	135 (95-175)
	type iii	III	448 (125-770)
	type iv	III	582 (420-744)
	type v	IV	216 (146-286)
	type vii	II	165 (103-226)
MSSA	NA	NA	642 (449-834)

NA: Not Applicable

*CI: Confidence Intervals

Clinical performance – positive blood cultures

Performance characteristics of the BD GeneOhm™ StaphSR assay for positive blood cultures were determined in a multi-site prospective investigational study. Five medical centers, two in Canada and three in the U.S., participated in the study. To be included in the study, positive blood cultures obtained with BD BACTEC™ or BacT/Alert® blood culture bottles, had to be eligible for testing according to hospital policies, and show evidence of Gram positive cocci when evaluated by Gram stain.

The reference culture method was performed on positive blood bottles presenting growth of Gram positive cocci bacteria within 36 hours of being declared positive by the instrument. The reference method consisted of an initial analysis on a blood agar plate after an overnight incubation. Presumptive colonies of *S. aureus* were confirmed with either a latex agglutination assay, tube coagulase testing, or an automated identification system. Confirmed colonies were tested for methicillin resistance using the oxacillin screen agar, PBP2' latex agglutination latex, or an automated antimicrobial susceptibility testing system using appropriate panels. An MRSA and/or *S. aureus* culture-positive specimen was defined as a specimen positive for MRSA and/or *S. aureus* by the culture technique. An MRSA or *S. aureus* culture-negative specimen was defined as a specimen negative for MRSA and *S. aureus* by the culture technique.

In total, 1183 positive blood bottles were found compliant and produced reportable results when tested for *S. aureus* and MRSA with the culture method of reference described above and the BD GeneOhm™ StaphSR assay (Table 1). In comparison to the reference culture methods, the BD GeneOhm™ StaphSR assay identified 100% of the MRSA positive specimens and 98.8 to 100% of the *S. aureus* positive specimens (Tables 2 and 3).

Table 1. Results obtained with the BD GeneOhm™ StaphSR assay for MRSA and *S. aureus* in comparison to the reference method for blood positive cultures

	MRSA	<i>S. aureus</i>																																
Site 1	Culture/ID-AST System 1	Culture/ID-AST System 1																																
	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">61 5</td> <td style="text-align: center;">66</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">0 380</td> <td style="text-align: center;">380</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">61 385</td> <td style="text-align: center;">446</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	61 5	66		-	0 380	380			61 385	446	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">99 0</td> <td style="text-align: center;">99</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">0 347</td> <td style="text-align: center;">347</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">99 347</td> <td style="text-align: center;">446</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	99 0	99		-	0 347	347			99 347	446
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	61 5	66																															
	-	0 380	380																															
		61 385	446																															
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	99 0	99																															
	-	0 347	347																															
		99 347	446																															
Site 2	Culture/ID-AST System 2	Culture/ID-AST System 2																																
	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">24 2</td> <td style="text-align: center;">26</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">0 107</td> <td style="text-align: center;">107</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">24 109</td> <td style="text-align: center;">133</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	24 2	26		-	0 107	107			24 109	133	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">40 1</td> <td style="text-align: center;">41</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">0 92</td> <td style="text-align: center;">92</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">40 93</td> <td style="text-align: center;">133</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	40 1	41		-	0 92	92			40 93	133
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	24 2	26																															
	-	0 107	107																															
		24 109	133																															
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	40 1	41																															
	-	0 92	92																															
		40 93	133																															
Site 3	Culture/Oxacillin Screen Agar	Culture/Oxacillin Screen Agar																																
	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">21 0</td> <td style="text-align: center;">21</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">0 211</td> <td style="text-align: center;">211</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">21 211</td> <td style="text-align: center;">232</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	21 0	21		-	0 211	211			21 211	232	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">83 0</td> <td style="text-align: center;">83</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">0 149</td> <td style="text-align: center;">149</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">83 149</td> <td style="text-align: center;">232</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	83 0	83		-	0 149	149			83 149	232
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	21 0	21																															
	-	0 211	211																															
		21 211	232																															
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	83 0	83																															
	-	0 149	149																															
		83 149	232																															
Site 4	Culture/ID-AST System 3	Culture/ ID-AST System 3																																
	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">48 4</td> <td style="text-align: center;">52</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">0 234</td> <td style="text-align: center;">234</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">48 238</td> <td style="text-align: center;">286</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	48 4	52		-	0 234	234			48 238	286	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">84 7</td> <td style="text-align: center;">91</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">1 194</td> <td style="text-align: center;">195</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">85 201</td> <td style="text-align: center;">286</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	84 7	91		-	1 194	195			85 201	286
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	48 4	52																															
	-	0 234	234																															
		48 238	286																															
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	84 7	91																															
	-	1 194	195																															
		85 201	286																															
Site 5	Culture/ Oxacillin Screen Agar and PBP2' Latex	Culture/ Oxacillin Screen Agar and PBP2' Latex																																
	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">2 0</td> <td style="text-align: center;">2</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">0 84</td> <td style="text-align: center;">84</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">2 84</td> <td style="text-align: center;">86</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	2 0	2		-	0 84	84			2 84	86	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">8 0</td> <td style="text-align: center;">8</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">0 78</td> <td style="text-align: center;">78</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">8 78</td> <td style="text-align: center;">86</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	8 0	8		-	0 78	78			8 78	86
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	2 0	2																															
	-	0 84	84																															
		2 84	86																															
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	8 0	8																															
	-	0 78	78																															
		8 78	86																															

Table 2. Performance obtained with the BD GeneOhm™ StaphSR assay for MRSA (by investigational site) in comparison to the reference method for positive blood cultures.

Site	MRSA prevalence	MRSA Positive % Agreement (95% CI) ¹	MRSA Negative % Agreement (95% CI) ¹	Overall % Agreement
Site 1	13.7% (61/446)	100%(61/61) (94.1%-100%)	98.7% (380/385) (97.0% - 99.6%)	98.9% (441/446) (97.4%-99.6%)
Site 2	18.0% (24/133)	100%(24/24) (85.8%-100%)	98.2% (107/109) (93.5% - 99.8%)	98.5% (131/133) (94.7%-99.8%)
Site 3	9.1% (21/232)	100%(21/21) (83.9%-100%)	100% (211/211) (98.3% - 100.0%)	100% (232/232) (98.4%-100.0%)
Site 4	16.8% (48/286)	100% (48/48)(92.6%-100%)	98.3% (234/238) (95.8% - 99.5%)	98.6% (282/286) (96.5%-99.6%)
Site 5	2.3% (2/86)	100%(2/2) (15.8%-100%)	100% (84/84) (95.7% - 100.0%)	100% (86/86) (95.8%-100.0%)

¹ Binomial 95% exact confidence intervals.

Table 3. Performance obtained with the BD GeneOhm™ StaphSR assay for *S. aureus* (by investigational site) in comparison to the reference method for positive blood cultures.

Site	<i>S. aureus</i> prevalence	<i>S. aureus</i> Positive % Agreement (95% CI) ¹	<i>S. aureus</i> Negative % Agreement (95% CI) ¹	Overall % Agreement
Site 1	22.2% (99/446)	100.0% (99/99) (96.3%-100%)	100% (347/347)(98.9%-100%)	100% (446/446) (99.2%-100.0%)
Site 2	30.1% (40/133)	100% (40/40)(91.2%-100%)	98.9% (92/93) (94.2%-100%)	99.2% (132/133) (95.9%-100.0%)
Site 3	35.8% (83/232)	100% (83/83)(95.7%-100%)	100% (149/149) (97.6%-100%)	100% (232/232) (98.4%-100.0%)
Site 4	29.7% (85/286)	98.8% (84/85) (93.6% - 100%)	96.5% (194/201) (93.0% - 98.6%)	97.2% (278/286) (94.6%-98.8%)
Site 5	9.3% (8/86)	100% (8/8) (63.1% - 100%)	100% (78/78) (95.4%-100%)	100% (86/86) (95.8%-100.0%)

¹ Binomial 95% exact confidence intervals.

Table 4. Unresolved results for positive blood cultures

Site	% Initial Unresolved with 95% exact confidence intervals		% Repeat Unresolved with 95% exact confidence intervals	
Site 1	0.0% (0/446)	(0.0% - 0.8%)	0.0% (0/446)	(0.0% - 0.8%)
Site 2	0.0% (0/133)	(0.0% - 2.7%)	0.0% (0/133)	(0.0% - 2.7%)
Site 3	0.0% (0/232)	(0.0% - 1.6%)	0.0% (0/232)	(0.0% - 1.6%)
Site 4	0.3% (1/286)	(0.0% - 1.9%)	0.0% (0/286)	(0.0% - 1.3%)
Site 5	0.0% (0/86)	(0.0% - 4.2%)	0.0% (0/86)	(0.0% - 4.2%)
Overall	0.1% (1/1183)	(0.0%-0.5%)	0.0% (0/1183)	(0.0%-0.3%)

Table 5. Invalid assays for positive blood cultures

Site	% Initial invalid runs with 95% exact confidence intervals		% Invalid repeat runs with 95% exact confidence intervals	
Site 1	1.8% (2/113)	(0.2% - 6.2%)	0.0% (0/113)	(0.0% - 3.2%)
Site 2	8.9% (5/56)	(3.0% - 19.6%)	0.0% (0/56)	(0.0% - 6.4%)
Site 3	2.9% (2/69)	(0.4% - 10.1%)	0.0% (0/69)	(0.0% - 5.2%)
Site 4	2.4% (2/84)	(0.3% - 8.3%)	0.0% (0/84)	(0.0% - 4.3%)
Site 5	7.7% (5/65)	(2.5% - 17.0%)	0.0% (0/65)	(0.0% - 5.5%)
Overall	4.1% (16/387)	(2.4%-6.6%)	0.0% (0/387)	(0.0%-0.9%)

Reproducibility – positive blood cultures

The reproducibility panel consisted of 12 simulated specimens containing 50 µL of a positive blood culture inoculated with either *Staphylococcus epidermidis*, MRSA or *S. aureus*; additionally, two controls (positive and negative) were included. The specimens were tested in triplicate on three different days at three different sites (12 specimens plus two controls tested X 3 X 3 days X 3 sites). This was repeated with three lots of reagents.

The reproducibility panel members were prepared by inoculating separate blood culture bottles with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), or *Staphylococcus epidermidis*. The inoculated bottles were incubated until positive, after which aliquots of the positive media were used to prepare serial dilutions to obtain different concentrations of bacteria for each specimen (Table 6).

Typically, blood culture specimens contain very high bacterial loads compared to the LoD of the assay. Therefore the panel was not created based on the LoD but simply by dilution of a declared positive bottle. Thus, the panel aims to mimic potential calibration issues with automated blood culture systems, which may lead to early positivity determination (i.e. lower bacterial loads than expected).

Table 6. Cumulative data of the positive blood culture reproducibility study

Specimen ID	Dilution	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Total agreement	Total % agreement
Negative	N/A	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Negative	N/A	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
MRSA	1.0	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
MRSA	1.0 E-01	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
MRSA	5.0E-02	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
MRSA	1.0 E-02	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
MRSA	1.0 E-03	27/27	27/27	26/26	80/80	100%
SA*	1.0	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
SA*	1.0 E-01	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
SA*	5.0E-02	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
SA*	1.0 E-02	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
SA*	1.0 E-03	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positive control	N/A	26/27	27/27	26/27	79/81	97.5%
Negative control	N/A	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Total agreement		377/378	378/378	376/377	1131/1133	99.8%
% of agreement		99.7%	100%	99.7%	99.8%	

* SA in this panel represents a methicillin susceptible strain

Clinical performance – nasal specimens

Performance characteristics of the BD GeneOhm™ StaphSR assay for nasal swabs were determined in a multi-site prospective investigational study. Four medical centers, three in Canada and one in the U.S., participated in the study. To be enrolled in the study, patients had to be eligible for testing according to hospital policies. Patients were excluded if they had received therapy for eradication of MRSA or *S. aureus* within 14 days prior to sample collection.

A retrospective study was performed using repository frozen nasal samples to supplement the BD GeneOhm™ StaphSR assay prospective study in order to increase the pool of positive samples of *S. aureus* and MRSA. The study involved three (3) sites; members for three (3) panels of 50 samples each were prepared and selected from BD's collection. The composition of the each panel was unknown to the sites.

The reference method consisted of an initial analysis on a selective mannitol salt agar medium followed by an overnight incubation. Presumptive colonies of *S. aureus* were confirmed with either an agglutination assay for *S. aureus* or with a tube coagulase test. Confirmed colonies were tested for methicillin resistance using the oxacillin screen agar or the PBP2' agglutination assay for MRSA. Specimens negative for MRSA were subjected to an additional analysis consisting of an enrichment step in trypticase soy broth (TSB) containing 6.5% NaCl, followed by a methicillin resistance test if required. An MRSA and/or *S. aureus* culture-positive specimen was defined as a specimen positive for MRSA and/or *S. aureus* by either culture technique. An MRSA or *S. aureus* culture-negative specimen was defined as a specimen negative for MRSA and *S. aureus* by both culture techniques.

In total, 1745 specimens were found compliant and produced reportable results when screened for *S. aureus* and MRSA with the culture method described above and the BD GeneOhm™ StaphSR assay (Tables 7 and 12). In comparison to the reference culture method, the BD GeneOhm™ StaphSR assay identified 73.3% to 100% of the MRSA positive specimens and 86.4% to 94.6% of the *S. aureus* positive specimens (Tables 8, 9,13 and 14).

Table 7. Results obtained in the prospective study with the BD GeneOhm™ StaphSR assay for MRSA and *S. aureus* in comparison to the reference method with nasal specimens

	MRSA	<i>S. aureus</i>																																																								
Site 1	Culture/Oxacillin Screen Agar <table border="0" style="margin: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">57</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">17</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">2</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">576</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">59</td> <td style="text-align: center;">593</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">74</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">578</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">652</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	57	17			2	576			59	593				74				578				652	Culture/Oxacillin Screen Agar <table border="0" style="margin: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">183</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">24</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">14</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">431</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">197</td> <td style="text-align: center;">455</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">207</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">445</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">652</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	183	24		-	14	431			197	455				207				445				652
	+	-																																																								
BD GeneOhm™ StaphSR	+	57	17																																																							
		2	576																																																							
		59	593																																																							
			74																																																							
			578																																																							
			652																																																							
	+	-																																																								
BD GeneOhm™ StaphSR	+	183	24																																																							
	-	14	431																																																							
		197	455																																																							
			207																																																							
			445																																																							
			652																																																							
Site 2	Culture/PBP2' Latex <table border="0" style="margin: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">22</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">6</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">4</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">301</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">26</td> <td style="text-align: center;">307</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">28</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">305</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">333</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	22	6		-	4	301			26	307				28				305				333	Culture/PBP2' Latex <table border="0" style="margin: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">93</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">11</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">224</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">104</td> <td style="text-align: center;">229</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">98</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">235</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">333</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	93	5		-	11	224			104	229				98				235				333
	+	-																																																								
BD GeneOhm™ StaphSR	+	22	6																																																							
	-	4	301																																																							
		26	307																																																							
			28																																																							
			305																																																							
			333																																																							
	+	-																																																								
BD GeneOhm™ StaphSR	+	93	5																																																							
	-	11	224																																																							
		104	229																																																							
			98																																																							
			235																																																							
			333																																																							
Site 3	Culture/Oxacillin Screen Agar and PBP2' Latex <table border="0" style="margin: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">4</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">1</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">0</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">279</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">280</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">279</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">284</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	4	1		-	0	279			4	280				5				279				284	Culture/Oxacillin Screen Agar and PBP2' Latex <table border="0" style="margin: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">53</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">6</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">3</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">222</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">56</td> <td style="text-align: center;">228</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">59</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">225</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">284</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	53	6		-	3	222			56	228				59				225				284
	+	-																																																								
BD GeneOhm™ StaphSR	+	4	1																																																							
	-	0	279																																																							
		4	280																																																							
			5																																																							
			279																																																							
			284																																																							
	+	-																																																								
BD GeneOhm™ StaphSR	+	53	6																																																							
	-	3	222																																																							
		56	228																																																							
			59																																																							
			225																																																							
			284																																																							
Site 4	Culture/Oxacillin Screen Agar and PBP2' Latex <table border="0" style="margin: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">11</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">8</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">4</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">305</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">15</td> <td style="text-align: center;">313</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">19</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">309</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">328</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	11	8		-	4	305			15	313				19				309				328	Culture/Oxacillin Screen Agar and PBP2' Latex <table border="0" style="margin: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">76</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">9</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">12</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">231</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">88</td> <td style="text-align: center;">240</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">85</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">243</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">328</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	76	9		-	12	231			88	240				85				243				328
	+	-																																																								
BD GeneOhm™ StaphSR	+	11	8																																																							
	-	4	305																																																							
		15	313																																																							
			19																																																							
			309																																																							
			328																																																							
	+	-																																																								
BD GeneOhm™ StaphSR	+	76	9																																																							
	-	12	231																																																							
		88	240																																																							
			85																																																							
			243																																																							
			328																																																							

Table 8. Performance obtained in the prospective study with the BD GeneOhm™ StaphSR assay for MRSA (by investigational site) in comparison to the reference method for nasal specimens.

Site	MRSA prevalence	MRSA Positive % Agreement (95% CI) ¹	MRSA Negative % Agreement (95% CI) ¹	Overall % Agreement
Site 1	9.0% (60/665)	96.6%(57/59) (88.3%-99.6%)	97.1% (576/593) (95.4% - 98.3%)	97.1% (633/652) (95.5%-98.2%)
Site 2	7.8% (26/333)	84.6%(22/26) (65.1%-95.6%)	98.0% (301/307) (95.8% - 99.3%)	97.0% (323/333) (94.5%-98.6%)
Site 3	1.4% (4/289)	100%(4/4) (39.8%- 100%)	99.6% (279/280) (98.0% - 100.0%)	99.6% (283/284) (98.1%-100.0%)
Site 4	4.5% (15/331)	73.3% (11/15) (44.9%-92.2%)	97.4% (305/313) (95.0% - 98.9%)	96.3% (316/328) (93.7%-98.1%)

¹ Binomial 95% exact confidence intervals.

Table 9. Performance obtained in the prospective study with the BD GeneOhm™ StaphSR assay for *S. aureus* (by investigational site) in comparison to the reference method for nasal specimens.

Site	<i>S. aureus</i> prevalence	<i>S. aureus</i> Positive % Agreement (95% CI) ¹	<i>S. aureus</i> Negative % Agreement (95% CI) ¹	Overall % Agreement
Site 1	30.2% (201/665)	92.9% (183/197) (88.4%-96.1%)	94.7% (431/455) (92.3%-96.6%)	94.2% (614/652) (92.1%-95.8%)
Site 2	31.2% (104/333)	89.4% (93/104) (81.9%-94.6%)	97.8% (224/229) (95.0%-99.3%)	95.2% (317/333) (92.3%-97.2%)
Site 3	19.4% (56/289)	94.6% (53/56) (85.1%-98.9%)	97.4% (222/228) (94.4%-99.0%)	96.8% (275/284) (94.1%-98.5%)
Site 4	26.6% (88/331)	86.4% (76/88) (77.4% - 92.8%)	96.3% (231/240) (93.0% - 98.3%)	93.6% (307/328) (90.4%-96.0%)

¹ Binomial 95% exact confidence intervals.

Table 10. Unresolved results with nasal specimens¹

Site	% Initial Unresolved with 95% exact confidence intervals		% Repeat Unresolved with 95% exact confidence intervals	
Site 1	2.3% (15/665)	(1.3% - 3.7%)	0.2% (1/665)	(0.0% - 0.8%)
Site 2	0.3% (1/333)	(0.0% - 1.7%)	0.0% (0/333)	(0.0% - 1.1%)
Site 3	1.0% (3/289)	(0.2% - 3.0%)	0.0% (0/289)	(0.0% - 1.3%)
Site 4	1.5% (5/331)	(0.5% - 3.5%)	0.3% (1/331)	(0.0% - 1.7%)
Overall study	1.5% (24/1618)	(1.0% - 2.2%)	0.1% (2/1618)	(0.0% - 0.4%)

¹ Only fresh specimens were considered in the calculation

Table 11. Invalid assays with nasal specimens

Site	% Initial invalid runs with 95% exact confidence intervals		% Invalid repeat runs with 95% exact confidence intervals	
Site 1	2.9% (2/69)	(0.4% - 10.1%)	0.0% (0/69)	(0.0% - 5.2%)
Site 2	4.5% (3/67)	(0.9% - 12.5%)	0.0% (0/67)	(0.0% - 5.4%)
Site 3	6.5% (3/46)	(1.4% - 17.9%)	2.2% (1/46)	(0.1% - 11.5%)
Site 4	10.0% (3/30)	(2.1% - 26.5%)	3.3% (1/30)	(0.1% - 17.2%)
Overall Study	5.2% (11/212)	(2.6% - 9.1%)	0.9% (2/212)	(0.1% - 3.4%)

Table 12. Results obtained in the retrospective study with the BD GeneOhm™ StaphSR assay for MRSA and *S. aureus* in comparison to the reference method with nasal specimens

	MRSA			<i>S. aureus</i>				
Site 1								
	Culture/Oxacillin Screen Agar			Culture/Oxacillin Screen Agar				
		+	-		+	-		
BD GeneOhm™ StaphSR	+	30	0	30	+	39	0	39
	-	0	20	20	-	1	10	11
		30	20	50		40	10	50
Site 2								
	Culture/Oxacillin Screen Agar			Culture/Oxacillin Screen Agar				
		+	-		+	-		
BD GeneOhm™ StaphSR	+	30	0	30	+	40	0	40
	-	0	20	20	-	0	10	10
		30	20	50		40	10	50
Site 3								
	Culture/Oxacillin Screen Agar			Culture/Oxacillin Screen Agar				
		+	-		+	-		
BD GeneOhm™ StaphSR	+	29	1	30	+	39	2	41
	-	0	18	18	-	0	7	7
		29	19	48		39	9	48

Table 13. Performance obtained in the retrospective study with the BD GeneOhm™ StaphSR assay for MRSA (by investigational site) in comparison to the reference method for nasal specimens.

Site	MRSA Positive % Agreement (95% CI) ¹	MRSA Negative % Agreement (95% CI) ¹	Overall % Agreement
Site 1	100.0%(30/30) (88.4% - 100.0%)	100.0% (20/20) (83.2% - 100.0%)	100% (50/50) (92.9%-100%)
Site 2	100.0%(30/30) (88.4% - 100.0%)	100.0% (20/20) (83.2% - 100.0%)	100% (50/50) (92.9%-100%)
Site 3	100.0% (29/29) (88.1% - 100.0%)	94.7% (18/19) (74.0% - 99.9%)	97.9 % (47/48) (88.9%-99.9%)

¹ Binomial 95% exact confidence intervals.

Table 14. Performance obtained in the retrospective study with the BD GeneOhm™ StaphSR assay for *S. aureus* (by investigational site) in comparison to the reference method for nasal specimens.

Site	<i>S. aureus</i> Positive % Agreement (95% CI) ¹	<i>S. aureus</i> Negative % Agreement (95% CI) ¹	Overall % Agreement
Site 1	97.5% (39/40) (86.8% - 99.9%)	100.0% (10/10) (69.2% - 100.0%)	98.0% (49/50) (89.4%-99.9%)
Site 2	100.0% (40/40) (91.2% - 100.0%)	100.0% (10/10) (69.2% - 100.0%)	100.0% (50/50) (92.9%-100%)
Site 3	100.0% (39/39) (91.0% - 100.0%)	77.8% (7/9) (40.0% - 97.2%)	95.8% (46/48) (85.7%-99.5%)

¹ Binomial 95% exact confidence intervals.

Reproducibility – nasal specimens

The reproducibility panel consisted of 14 simulated specimens containing 100 µL of MRSA, *S. aureus* or *S. epidermidis* (negative specimens). Additionally, two controls (positive and negative) were included. The specimens were tested in triplicate on three different days at two different sites (14 specimens plus two controls tested X 3 X 3 days X 2 sites). This was repeated with three lots of reagents.

Two (2) negative specimens were inoculated with *Staphylococcus epidermidis*. Two (2) positive specimens inoculated with MRSA and two positive specimens inoculated with *S. aureus* were prepared with a bacterial load near the LoD (low MRSA/*S.aureus* in Table 15). Four (4) positive specimens inoculated with MRSA and four (4) positive specimens inoculated with *S. aureus* were prepared with varying amounts of bacteria above the LoD (high MRSA/*S. aureus* in Table 15).

Table 15. Cumulative data of the nasal specimen reproducibility study

Specimen ID	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Total agreement	Total % agreement
Negative	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
Negative	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
Low positive MRSA	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
Low positive MRSA	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
Low positive SA*	18/18	17/18	16/18	51/54	94.4%
Low positive SA*	17/18	18/18	15/18	50/54	92.6%
High positive MRSA	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
High positive MRSA	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
High positive MRSA	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
High positive MRSA	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
High positive SA*	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
High positive SA*	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
High positive SA*	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
High positive SA*	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
Positive control	18/18	17/18	17/18	52/54	96.3%
Negative control	18/18	17/18	18/18	53/54	98.1%
Total agreement	287/288	285/288	282/288	854/864	98.8%
% of agreement	99.7%	99.0%	97.9%	98.8%	

* SA in this panel represents a methicillin susceptible *S. aureus* strain

Clinical performance – wound specimens

Performance characteristics of the BD GeneOhm™ StaphSR assay for wound swabs were determined in a multi-site prospective investigational study. Four medical centers, two in Canada and two in the U.S., participated in the study. To be enrolled in the study, patients had to carry infected wound(s) to be eligible for testing according to hospital policies. Patients were excluded if they had received therapy for eradication of MRSA or *S. aureus* within 14 days prior to sample collection, used antiseptic solution prior to sampling or used local anesthetic prior to sampling.

The reference method consisted of an initial analysis on a blood agar plate followed by an overnight incubation. Presumptive colonies of *S. aureus* were confirmed with either an agglutination assay for *S. aureus* or with a tube coagulase test. Confirmed colonies were tested for methicillin resistance using the oxacillin screen agar, the PBP2' agglutination assay for MRSA, or an automated system. Specimens negative for MRSA were subjected to an additional analysis consisting of an enrichment step in trypticase soy broth (TSB) containing 6.5% NaCl, followed by a methicillin resistance test if required. An MRSA and/or *S. aureus* culture-positive specimen was defined as a specimen positive for MRSA and/or *S. aureus* by either culture technique. An MRSA or *S. aureus* culture-negative specimen was defined as a specimen negative for MRSA and *S. aureus* by both culture techniques.

In total, 748 specimens were found compliant and produced reportable results when tested for *S. aureus* and MRSA with the culture method of reference described above and the BD GeneOhm™ StaphSR assay (Table 16). In comparison to the reference culture method, the BD GeneOhm™ StaphSR assay identified 96.0% to 100% of the MRSA positive specimens and 83.3% to 100% of the *S. aureus* positive specimens (Tables 17 and 18).

Table 16. Results obtained with the BD GeneOhm™ StaphSR assay for MRSA and *S. aureus* in comparison to the reference method with wound specimens

	MRSA	<i>S. aureus</i>																																
Site 1	Culture/Oxacillin Screen Agar	Culture/Oxacillin Screen Agar																																
	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">48 17</td> <td style="text-align: center;">65</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">2 375</td> <td style="text-align: center;">377</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">50 392</td> <td style="text-align: center;">442</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	48 17	65		-	2 375	377			50 392	442	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">124 20</td> <td style="text-align: center;">144</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">10 288</td> <td style="text-align: center;">298</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">134 308</td> <td style="text-align: center;">442</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	124 20	144		-	10 288	298			134 308	442
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	48 17	65																															
	-	2 375	377																															
		50 392	442																															
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	124 20	144																															
	-	10 288	298																															
		134 308	442																															
Site 2	Culture/PBP2' Latex	Culture/PBP2' Latex																																
	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">3 0</td> <td style="text-align: center;">3</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">0 8</td> <td style="text-align: center;">8</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">3 8</td> <td style="text-align: center;">11</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	3 0	3		-	0 8	8			3 8	11	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">5 0</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">1 5</td> <td style="text-align: center;">6</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">6 5</td> <td style="text-align: center;">11</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	5 0	5		-	1 5	6			6 5	11
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	3 0	3																															
	-	0 8	8																															
		3 8	11																															
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	5 0	5																															
	-	1 5	6																															
		6 5	11																															
Site 3	Culture/Oxacillin Screen Agar and PBP2' Latex	Culture/Oxacillin Screen Agar and PBP2' Latex																																
	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">2 0</td> <td style="text-align: center;">2</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">0 13</td> <td style="text-align: center;">13</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">2 13</td> <td style="text-align: center;">15</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	2 0	2		-	0 13	13			2 13	15	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">7 0</td> <td style="text-align: center;">7</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">0 8</td> <td style="text-align: center;">8</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">7 8</td> <td style="text-align: center;">15</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	7 0	7		-	0 8	8			7 8	15
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	2 0	2																															
	-	0 13	13																															
		2 13	15																															
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	7 0	7																															
	-	0 8	8																															
		7 8	15																															
Site 4	Culture/ID-AST System	Culture/ ID-AST System																																
	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">137 2</td> <td style="text-align: center;">139</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">2 139</td> <td style="text-align: center;">141</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">139 141</td> <td style="text-align: center;">280</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	137 2	139		-	2 139	141			139 141	280	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">BD GeneOhm™ StaphSR</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">183 2</td> <td style="text-align: center;">185</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">4 91</td> <td style="text-align: center;">95</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">187 93</td> <td style="text-align: center;">280</td> </tr> </table>		+	-		BD GeneOhm™ StaphSR	+	183 2	185		-	4 91	95			187 93	280
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	137 2	139																															
	-	2 139	141																															
		139 141	280																															
	+	-																																
BD GeneOhm™ StaphSR	+	183 2	185																															
	-	4 91	95																															
		187 93	280																															

Table 17. Performance obtained with the BD GeneOhm™ StaphSR assay for MRSA (by investigational site) in comparison to the reference method for wound specimens.

Site	MRSA prevalence	MRSA Positive % Agreement (95% CI) ¹	MRSA Negative % Agreement (95% CI) ¹	Overall % Agreement
Site 1	11.3% (50/443)	96.0%(48/50) (86.3%-99.5%)	95.7% (375/392) (93.1% - 97.5%)	95.7% (423/442) (93.4%-97.4%)
Site 2	25.0% (3/12)	100.0%(3/3) (29.2%-100.0%)	100.0% (8/8) (63.1% - 100.0%)	100.0% (11/11) (71.5%-100.0%)
Site 3	13.3% (2/15)	100.0%(2/2) (15.8%-100.0%)	100.0% (13/13) (75.3% - 100.0%)	100.0% (15/15) (78.2%-100.0%)
Site 4	49.3% (139/282)	98.6% (137/139)(94.9%-99.8%)	98.6% (139/141) (95.0% - 99.8%)	98.6%(276/280) (96.4%-99.6%)

¹ Binomial 95% exact confidence intervals.

Table 18. Performance obtained with the BD GeneOhm™ StaphSR assay for *S. aureus* (by investigational site) in comparison to the reference method for wound specimens.

Site	<i>S. aureus</i> prevalence	<i>S. aureus</i> Positive % Agreement (95% CI) ¹	<i>S. aureus</i> Negative % Agreement (95% CI) ¹	Overall % Agreement
Site 1	30.2% (134/443)	92.5% (124/134) (86.7%-96.4%)	93.5% (288/308)(90.1%-96.0%)	93.2% (412/442) (90.5%-95.4%)
Site 2	50.0% (6/12)	83.3% (5/6)(35.9%-99.6%)	100.0% (5/5) (47.8%-100.0%)	90.9%(10/11) (58.7%-99.8%)
Site 3	46.7% (7/15)	100.0% (7/7)(59.0%-100.0%)	100.0% (8/8) (63.1%-100.0%)	100.0% (15/15) (78.2%-100.0%)
Site 4	66.3% (187/282)	97.9% (183/187) (94.6% - 99.4%)	97.8% (91/93) (92.4% - 99.7%)	97.9% (274/280) (95.4%-99.2%)

¹ Binomial 95% exact confidence intervals.

Table 19. Unresolved results with wound specimens

Site	% Initial Unresolved with 95% exact confidence intervals		% Repeat Unresolved with 95% exact confidence intervals	
Site 1	2.7% (12/443)	(1.4% - 4.7%)	0.2% (1/443)	(0.0% - 1.3%)
Site 2	8.3% (1/12)	(0.2% - 38.5%)	8.3% (1/12)	(0.2% - 38.5%)
Site 3	6.7% (1/15)	(0.2% - 31.9%)	0.0% (0/15)	(0.0% - 21.8%)
Site 4	2.5% (7/282)	(1.0% - 5.0%)	0.7% (2/282)	(0.1% - 2.5%)
Overall study	2.8% (21/752)	(1.7% - 4.2%)	0.5% (4/752)	(0.1% - 1.4%)

Table 20. Invalid assays with wound specimens

Investigational site	% Initial invalid runs with 95% exact confidence intervals		% Invalid repeat runs with 95% exact confidence intervals	
Site 1	3.3% (2/61)	(0.4% - 11.3%)	0.0% (0/61)	(0.0% - 5.9%)
Site 2	0.0% (0/11)	(0.0% - 28.5%)	0.0% (0/11)	(0.0% - 28.5%)
Site 3	23.1% (3/13)	(5.0% - 53.8%)	0.0% (0/13)	(0.0% - 24.7%)
Site 4	6.3% (4/63)	(1.8% - 15.5%)	0.0% (0/63)	(0.0% - 5.7%)
Overall study	6.1% (9/148)	(2.8% - 11.2%)	0.0% (0/148)	(0.0% - 2.5%)

Reproducibility – wound specimens

The reproducibility panel consisted of 14 simulated specimens containing 100 µL of MRSA, *S. aureus* or *S. epidermidis* (negative specimens) Additionally, two controls (positive and negative) were included. The specimens were tested in triplicate on three different days at three different sites (14 specimens plus two controls tested X 3 X 3 days X 3 sites). This was repeated with three lots of reagents.

Two (2) negative specimens were inoculated with *Staphylococcus epidermidis*. Three positive specimens inoculated with MRSA and four positive specimens inoculated with *S. aureus* were prepared with a bacterial load near the LoD (low MRSA/SA in Table 21). Three positive specimens inoculated with MRSA and two positive specimens inoculated with *S. aureus* were prepared with varying amounts of bacteria above the LoD (high MRSA/SA in Table 21).

Table 21. Cumulative data of the wound specimen reproducibility study

Specimen ID	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Total agreement	Total % agreement
Negative	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Negative	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Low positive MRSA	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Low positive MRSA	27/27	27/27	25/27	79/81	98.8%
Low positive SA*	27/27	27/27	26/27	80/81	98.8%
Low positive SA*	26/26	27/27	27/27	80/80	100.0%
Low positive MRSA	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
High positive MRSA	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
High positive MRSA	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
High positive MRSA	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Low positive SA*	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Low positive SA*	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
High positive SA*	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
High positive SA*	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Positive control	27/27	27/27	26/27	80/81	98.8%
Negative control	26/27	27/27	27/27	80/81	98.8%
Total agreement	430/431	432/432	428/432	1290/1295	99.6%
% of agreement	99.8%	100.0%	99.1%	99.6%	

* SA in this panel represents a methicillin susceptible *S. aureus* strain

Français

Application

Le test BD GeneOhm™ StaphSR est un test qualitatif de diagnostic *in vitro* pour la détection rapide de *Staphylococcus aureus* (SA) et de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) directement à partir d'échantillons nasaux et de plaies et d'hémocultures. Le test utilise une réaction de polymérase en chaîne (ou polymerase chain reaction- PCR) pour l'amplification des cibles spécifiques ainsi que des sondes fluorogéniques spécifiques d'hybridation pour la détection en temps réel de l'ADN amplifié de SARM et de SA.

Hémocultures positives

Pour les hémocultures positives, le test est utilisé conjointement avec la technique de coloration de Gram pour évaluer les cocci à Gram positif. Des cultures concomitantes sont nécessaires uniquement pour récupérer et identifier d'autres organismes observés par la coloration de Gram, ou pour d'autres tests de sensibilité et/ou pour faire la caractérisation épidémiologique de *Staphylococcus aureus* (SA) ou de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM).

Échantillons nasaux

Pour les échantillons nasaux, le test n'est pas destiné au diagnostic des infections au SARM ou SA ni à guider le traitement pour les infections au SARM/SA. Des cultures concomitantes sont nécessaires uniquement dans le but d'obtenir des micro-organismes pour en faire la caractérisation épidémiologique, ou pour des études complémentaires de sensibilité aux antibiotiques.

Échantillons de plaies

Pour les échantillons de plaies, l'essai est utilisé lors de signes cliniques d'infection. Des cultures concomitantes sont nécessaires uniquement pour récupérer et identifier d'autres organismes, ou pour d'autres tests de sensibilité et/ou pour faire la caractérisation épidémiologique de *Staphylococcus aureus* (SA) ou de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM).

Résumé et explication du test

Le test BD GeneOhm™ StaphSR peut être utilisé à partir d'un écouvillon nasal ou de plaie ou à partir d'une aliquote d'hémoculture contenant des cocci à Gram positif. Un échantillon nasal ou de plaie est prélevé et acheminé au laboratoire (une liste des écouvillons recommandés est fournie dans la section intitulée Matériel nécessaire mais non fourni). Pour l'analyse, l'écouvillon nasal ou de plaie est placé dans le tampon d'échantillon et lysé. Pour tester une hémoculture positive, une aliquote du milieu de culture est transférée dans un tube de tampon d'échantillon et lysée. Pour tous les types d'échantillons, une aliquote du lysat est ajoutée à un mélange de réactifs de PCR qui contient les amorces spécifiques au *S. aureus* et au SARM utilisées pour amplifier les cibles génétiques, si elles sont présentes. Le test comprend aussi un contrôle interne (CI) pour détecter des substances inhibitrices de la PCR et pour confirmer l'intégrité des réactifs servant au test. Les cibles amplifiées sont détectées au moyen de sondes moléculaires marquées avec des fluorophores (sondes moléculaires de type *beacon*). L'amplification, la détection et l'interprétation des signaux sont effectuées automatiquement par le logiciel de l'instrument Cepheid SmartCycler®. La procédure dure de 60 à 75 minutes. La récupération des organismes pour le typage épidémiologique ou pour d'autres tests de sensibilité aux antibiotiques peut être réalisée en inoculant un milieu de culture approprié pendant la préparation des échantillons.

S. aureus est une cause majeure d'infections nosocomiales avec des manifestations cliniques allant de pustules à la septicémie pouvant entraîner la mort¹. Il se retrouve souvent dans le nez ou sur la peau d'individus en bonne santé (porteurs sains). Au laboratoire, *S. aureus* est surtout isolé à partir des narines, de la peau, des plaies et des hémocultures. Dans les hôpitaux, *S. aureus* est transmis habituellement d'un patient à l'autre par les mains contaminées du personnel soignant.

Le traitement des infections causées par *S. aureus* est devenu un défi majeur avec l'apparition de souches résistantes aux agents antimicrobiens qui étaient efficaces auparavant. Les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline sont fréquemment rencontrées dans les établissements de santé et représentent près de 60 % des isolats de *S. aureus* acquis à l'hôpital dans certains établissements d'Amérique du Nord². Les facteurs de risque en rapport avec l'infection causée par le SARM dans les établissements de santé comprennent : séjour prolongé à l'hôpital, proximité des patients infectés par le SARM, exposition aux traitements multiples et prolongés à des antibiotiques à large spectre, et être porteur de SARM.

Infections sanguines à *S. aureus*

Jusqu'à 25 % des infections du sang sont causées par *S. aureus*^{3,4}, dont 26 à 47 % sont causées par le SARM^{3,5}. Les bactériémies provoquées par *S. aureus* sont liées à des taux de mortalité allant de 25 % à 35 %^{4,6}, ce qui souligne l'importance de réduire le temps d'obtention des résultats afin de contribuer à la prévention de la mortalité des patients et à la réduction des coûts liés aux séjours prolongés dans les hôpitaux.

Infections à *S. aureus* aux sites de chirurgie

Les infections à *S. aureus* sont très préoccupantes pour beaucoup de procédures hospitalières. Jusqu'à 26% de patients qui subissent une chirurgie développent des infections aux sites de chirurgie (ISC)^{2,7}. *S. aureus* a été régulièrement rapporté comme la cause la plus fréquente des ISC. Ainsi, ce pathogène est responsable de 20 à 56% des ISC, parmi lesquelles le SARM pourrait représenter jusqu'à 57% des isolats⁷. Le taux de mortalité associé aux deux pathogènes varie de 5 à 22%^{7,8}. Pour la plupart des patients, l'isolat de *S.aureus* au site d'infection est identique à l'isolat du nez du patient^{7,9}.

Infections à *S. aureus* de la peau et des tissus mous

S. aureus est un pathogène émergent dans la communauté souvent impliqué dans les infections de la peau et des tissus mous. Ces infections deviennent agressives si non traitées ou quand le traitement est administré de façon inappropriée. Dans certains cas, ces infections ont mené à la septicémie et la pneumonie nécrosante¹⁰. Des données récentes ont montré que *S. aureus* était isolé de 76% des patients avec infection de la peau et des tissus mous. De ces isolats, 78% étaient des SARM¹⁰. Bien que plus de 80% des patients avec infection de la peau et des tissus mous associées au SARM aient reçu une antibiothérapie empirique pour cette infection, l'isolat infectieux était résistant à l'agent prescrit dans 57% des cas¹⁰. Par conséquent, l'identification précoce de ces organismes aiderait le clinicien à administrer l'antibiotique approprié pour réduire le risque de récurrence des infections invasives de la peau et des tissus mous.

Les techniques traditionnelles utilisées pour la détection de *S. aureus* et de SARM exigent une étape de culture et l'isolement des colonies pures, suivie de tests d'agglutination pour identifier *S. aureus* et de tests de sensibilité à l'oxacilline, de détection du gène *mecA* ou de tests de détection de la protéine fixatrice de la pénicilline (PBP 2a) pour identifier le SARM. Il faut un minimum de 16 heures pour identifier le statut de *S. aureus* et de SARM, soit une durée moyenne de plus de 48 heures en utilisant ces méthodes traditionnelles.

Considérant la croissance rapide de la morbidité et de la mortalité associées aux infections à *S. aureus*, la capacité de détecter et différencier *S. aureus* et SARM de façon rapide, soit en quelques heures plutôt que quelques jours, représente un avantage certain sur les pratiques courantes et permet un traitement et une gestion de patients plus efficaces.

Principe de la procédure

À la suite de la lyse des échantillons, l'amplification des cibles a lieu si l'une ou les deux séquences sont présentes [SARM : séquence près du site d'insertion du chromosome *mec* de la cassette staphylococcique (SCC*mec*) ; *S. aureus* (SA) : autre séquence spécifique à *S. aureus*, non attachée à la cassette SCC*mec*]. L'amplification du CI se produit également, à moins que des substances inhibitrices de PCR ne soient présentes.

Les cibles d'ADN amplifiées sont détectées au moyen de sondes moléculaires *beacon* qui sont de courts oligonucléotides simple brin adoptant une conformation en épingle à cheveux et marqués par une molécule absorbante (*quencher*) à une extrémité et par une molécule fluorescente (fluorophore) à l'autre. En absence de cible, la fluorescence est réprimée. En présence de cible, la structure en épingle à cheveux s'ouvre suite à l'appariement du *beacon* avec la cible, provoquant l'émission de fluorescence par le fluorophore. Pour la détection de l'amplicon SARM, la sonde moléculaire *beacon* est marquée par le fluorophore FAM à l'extrémité 5' et par le DABCYL, une molécule absorbante non fluorescente, à l'extrémité opposée 3' de l'oligonucléotide. Pour la détection de l'amplicon *S. aureus*, la sonde moléculaire *beacon* est marquée par le fluorophore TexasRed à l'extrémité 5' et par le DABCYL à l'extrémité 3'. Les amplicons du contrôle interne sont détectés par une sonde moléculaire *beacon* marquée avec le fluorophore TET à l'extrémité 5' et le DABCYL à l'extrémité 3'. Chaque hybride *beacon*-cible émet une fluorescence à une longueur d'onde caractéristique du fluorophore utilisé pour marquer le *beacon*. La quantité de fluorescence émise à un cycle donné, ou à la fin du PCR, dépend de la quantité d'amplicons spécifiques présents à ce moment. Le logiciel SmartCycler mesure simultanément la fluorescence émise par chaque *beacon* et interprète les données générées afin de fournir un résultat final à la fin du programme PCR (voir Interprétation des résultats).

Réactifs

Test BD GeneOhm™ StaphSR	48 tests	200 tests
Tampon d'échantillon (Sample Buffer)	60 X 1 mL	240 X 1 mL
Tampon Tris-EDTA		
Tube de lyse (Lysis tube)	50 tubes	200 tubes
Billes de verre		
Mélange réactionnel (Master mix) (8 réactions chacun)	8 tubes	34 tubes
< 0,0005 % complexe ADN polymérase		
< 0,001 % contrôle interne - ADN non infectieux contenant les séquences complémentaires des amorces de SARM et une séquence unique pour la sonde d'hybridation		
< 0,002 % amorces		
< 0,002 % sondes d'hybridation de type <i>beacon</i>		
< 0,05 % dATP, dCTP, dGTP, dTTP		
Albumine bovine sérique		
Hydrate de carbone		
MgCl ₂		
< 0,001 % ADN génomique de <i>Staphylococcus epidermidis</i> non infectieux (ATCC 14990)		
ADN contrôle (Control DNA)	8 tubes	34 tubes
Tampon Tris-EDTA		
Hydrate de carbone		
< 0,001 % ADN génomique non infectieux de SARM (ATCC 43300)		
Diluant (Diluent)	8 X 700 µL	34 X 700 µL
Tampon Tris-HCl		
MgCl ₂		
(NH ₄) ₂ SO ₄		
KCl		

Précautions

- Ne pas utiliser la trousse si le sceau de sécurité sur la boîte extérieure est brisé.
- Ne pas utiliser les réactifs si leurs sachets de protection sont ouverts ou endommagés à l'arrivée.
- Refermer rapidement, après chaque utilisation, les sachets de protection du mélange réactionnel et de l'ADN contrôle au moyen de la fermeture à glissière.
- Ne pas retirer les dessiccants des pochettes de mélange réactionnel et d'ADN contrôle.
- Ne pas utiliser le mélange réactionnel ou l'ADN contrôle si les pochettes ne contiennent pas de dessiccant .
- Les réactifs ne sont pas interchangeables entre les lots.
- Ne jamais mélanger les réactifs provenant de différents tubes, même s'ils proviennent du même lot.
- Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption.
- Ne pas interchanger les capuchons entre les réactifs pour ne pas risquer de les contaminer et fausser ainsi les résultats.
- Éviter la contamination microbienne des réactifs ou la contamination par la désoxyribonucléase (DNase) lors du prélèvement d'aliqotes dans les tubes. Il est recommandé d'utiliser des micropipettes munies d'embouts à filtre à déplacement direct, ou des embouts stériles, jetables, exempts de DNase.
- Pour éviter la contamination de l'environnement avec les amplicons *S. aureus* et SARM, ne pas ouvrir les tubes de réaction après amplification.
- Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque échantillon ou réactif.
- La réalisation du test en dehors des délais recommandés peut se solder par des résultats invalides. Les tests qui n'ont pas été réalisés dans les intervalles de temps spécifiés doivent être répétés.

- Des contrôles supplémentaires peuvent être testés suivant les directives ou les exigences des organismes réglementaires nationaux, fédéraux, provinciaux ou locaux ou des organismes d'accréditation.
- Dans les cas où des tests de PCR en tubes ouverts sont également réalisés par le laboratoire, utiliser des zones de travail complètement isolées pour la préparation des échantillons et pour les activités d'amplification et de détection. Les fournitures et l'équipement doivent être dédiés à chaque zone et ne doivent pas être déplacés d'une zone à l'autre. Le port de gants est obligatoire et les gants doivent être changés pour aller d'une zone à l'autre. Les gants doivent être changés avant de manipuler les réactifs lyophilisés.
- Toujours manipuler les échantillons comme s'ils étaient infectieux et selon les procédures de laboratoire sécuritaires telles que celles décrites dans Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹¹ et dans le document CLSI M2912.
- Porter des vêtements de protection et des gants jetables pour manipuler les réactifs. Se laver soigneusement les mains après l'exécution du test.
- Ne pas pipeter à la bouche.
- Ne pas fumer, boire ni manger dans les endroits où les échantillons et les réactifs sont manipulés.
- Jeter les réactifs non utilisés et les déchets conformément à la réglementation nationale, fédérale, provinciale ou locale.

Matériel fourni

- Tampon d'échantillon (Sample Buffer)
- Tube de lyse (Lysis tube)
- Mélange réactionnel (Master Mix)
- ADN contrôle (Control DNA)
- Diluant (Diluent)
- Tubes de réaction SmartCycler, capacité de 25 µL
- Étiquettes pour identifier les échantillons

Conservation, manipulation et stabilité

Échantillons prélevés

Hémocultures positives

Les échantillons d'hémocultures positives peuvent être conservés pendant 3 jours au maximum à température ambiante (de 15 à 25 °C) avant le test.

Si les hémocultures positives doivent être expédiées pour exécuter une deuxième analyse, les conserver entre 2 et 30 °C pendant le transport. Les protéger contre le gel ou l'exposition à une température élevée.

Les échantillons d'hémocultures positives pouvant être testés dans les 18 heures peuvent être conservés à une température allant jusqu'à 35 °C.

Échantillons nasaux et de plaies

Les échantillons doivent être conservés entre 2°C et 25°C pendant le transport. Protéger contre la congélation ou l'exposition à la chaleur excessive.

Les échantillons doivent être testés dans les 36 heures.

Lysats (extraits d'ADN)

Des études internes ont montré que les lysats peuvent être utilisés pour les tests après deux ans s'ils sont conservés à -20 °C.

Réactifs

Remarque : Les conditions de conservation doivent être conformes aux spécifications figurant sur chaque sachet.

Composante de la trousse		<i>Master Mix et Control DNA</i> (étiquette blanche et étiquette à bande rouge respectivement)	<i>Lysis tube</i> (capuchon jaune)	<i>Sample Buffer et Diluent</i> (capuchon bleu et étiquette à bande noire respectivement)
Sachet scellé	Température	2 à 25 °C	2 à 25 °C	2 à 25 °C
	Stabilité	Date de péremption	Date de péremption	Date de péremption
Sachet ouvert	Température	2 à 8 °C ¹	2 à 25 °C ^{2,3}	2 à 25 °C ^{2,3}
	Stabilité	1 mois ³	Date de péremption ³	2 mois ³

¹ Lorsque le sceau original est brisé, refermer soigneusement le sachet avec la fermeture à glissière après chaque utilisation et conserver à la température appropriée.

² Bien que ces réactifs puissent être conservés à température ambiante, ils devraient être gardés avec les autres réactifs du même lot entre 2 et 8 °C.

³ À condition que le sachet soit bien fermé avec la fermeture à glissière après chaque utilisation.

Composantes de la trousse à l'extérieur de leur sachet de protection		<i>Master Mix et Control DNA</i> (étiquette blanche et à bande rouge respectivement)	
Tubes non reconstitués		Température	15 à 25 °C
		Stabilité	2 heures ¹
Tubes reconstitués ¹	Contenant d'origine	Température	2 à 8 °C
		Stabilité	3 heures ¹
	Tube SmartCycler	Température	2 à 8 °C
		Stabilité	45 minutes ¹

¹ Jeter les tubes inutilisés après la période de stabilité indiquée.

Matériel nécessaire mais non fourni

Flacons pour les hémocultures positives:

- Flacons d'hémoculture pour le système BACTEC™ (BD Diagnostic Systems) :
 - BD BACTEC™ Plus Aerobic/F n° de catalogue 442192
 - BD BACTEC™ Plus Anaerobic/F n° de catalogue no 442193
 - BD BACTEC™ Lytic/10 Aerobic/F n° de catalogue 442265
 - BD BACTEC™ PEDS PLUS/F Culture Vials n° de catalogue 442194
- Ou flacons d'hémoculture pour le système BacT/Alert® (bioMérieux) :
 - BacT/Alert® SA n° de catalogue 259789
 - BacT/Alert® SN n° de catalogue 259790
 - BacT/Alert® FA n° de catalogue 259791
 - BacT/Alert® FN n° de catalogue 259793
 - BacT/Alert® PF n° de catalogue 259794

Écouvillons pour échantillons nasaux et de plaies:

- BBL™ CultureSwab™ Liquid Stuart (Becton Dickinson n° de catalogue 220099), Copan Transystem™ Liquid Stuart (Copan Italia International n° de catalogue 141C.USE), Copan Venturi Transystem™ Liquid Stuart (Copan Diagnostics Inc. n° de catalogue 141C.US), ou
- BBL™ CultureSwab™ Liquid Amies (Becton Dickinson n° de catalogue 220093), Copan Transystem™ Liquid Amies (Copan Italia International n° de catalogue 140C.USE), Copan Venturi Transystem™ Liquid Amies (Copan Diagnostics Inc. n° de catalogue 140C.US), ou

- **BBL™ CultureSwab™ Plus Amies Gel without Charcoal** (Becton Dickinson n° de catalogue 220116), **Copan Transystem™ Amies Agar Gel without Charcoal** (Copan Italia International n° de catalogue 108C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Amies Agar Gel without Charcoal** (Copan Diagnostics Inc. n° de catalogue 108C.US), ou
- **BBL™ CultureSwab™ Plus Amies Gel with Charcoal** (Becton Dickinson n° de catalogue 220121), **Copan Transystem™ Amies Agar Gel with Charcoal** (Copan Italia International n° de catalogue 114C.USE), **Copan Venturi Transystem™ Amies Agar Gel with Charcoal** (Copan Diagnostics Inc. n° de catalogue 114C.US).

Pour tous les types d'échantillons:

- **Réactifs pour la coloration de Gram**
- BBL™ CHROMagar™ Staph aureus, n° de catalogue 214982, Mannitol Salt Agar (MSA), n° de catalogue 221173 ou 221271 ou milieu équivalent (facultatif)
- Gélose à 5 % de sang de mouton (ex. BBL™ Trypticase Soy Agar (TSA II) avec 5 % de sang de mouton, n° de catalogue BD 221239 ou 221261) (facultatif)
- Bouillon tryptone soya (TSB) supplémenté avec 6,5% de NaCl
- **Vortex** Genie 2 (Fisher) muni d'un portoir pour microtubes de 1,5 mL ou équivalent; pour le traitement de plusieurs échantillons, un adaptateur à positions multiples peut être utilisé
- **Micropipettes** (plage exacte entre 1 à 10 µL, 10 à 100 µL et 100 à 1 000 µL)
- **Embouts de micropipettes stériles exempts de DNase** munis d'un filtre ou à déplacement positif
- Microtubes exempts de DNase
- **Gants** jetables, sans poudre
- **Microcentrifugeuse** pour centrifugation à vitesse faible et élevée
- **Bloc chauffant à sec** pour tubes de 1,5 mL ou bain-marie
- Glace ou **bloc réfrigérant** pour tubes de 1,5 mL
- **Outil pour enlever les capuchons** (ex. MATRIX, n° de catalogue 4469) (facultatif)
- **Chronomètre** ou minuterie
- **Système SmartCycler de démarrage** (starter system) **avec logiciel Dx** (Diagnostic) (bloc analyseur, manuel d'utilisation, trousse d'accessoires et ordinateur)

Mode d'emploi

Prélèvement des échantillons – hémoculture positive

Pour obtenir un échantillon adéquat, suivre soigneusement la procédure de prélèvement d'échantillon.

À l'aide d'un flacon d'hémoculture recommandé (voir Matériel nécessaire mais non fourni):

1. Prélever et traiter les échantillons sanguins conformément aux indications du fabricant et aux modes opératoires standards de l'hôpital.
2. Étiqueter et transporter les flacons d'hémocultures inoculés conformément aux indications du fabricant et aux modes opératoires standards de l'hôpital.
3. Incuber les flacons d'hémocultures en utilisant un système d'hémoculture automatisé approprié.
4. Après la détermination de la positivité, retirer les flacons d'hémocultures de l'incubateur et voir la section intitulée Conservation, manipulation et stabilité – Échantillons prélevés.
5. Exécuter une coloration de Gram pour l'hémoculture positive. Si des cocci à Gram positif sont observés, aller à « Préparation de l'échantillon pour le test BD GeneOhm™ StaphSR » et à « Culture des échantillons » pour les autres résultats.

Prélèvement des échantillons – écouvillon nasal

Pour obtenir un échantillon adéquat, suivre soigneusement la procédure de prélèvement d'échantillon.

En se servant d'un écouvillon recommandé (voir Matériel nécessaire mais non fourni), procéder au prélèvement d'échantillon nasal comme suit:

1. Humidifier l'écouvillon avec deux gouttes (environ 50 µL) de sérum physiologique stérile (saline) ou l'utiliser sec.
2. Introduire soigneusement l'écouvillon dans une narine du patient (le bout de l'écouvillon doit être inséré jusqu'à 2,5 cm (1 pouce) à partir du bord des narines).

3. Faire tourner la tige de l'écouvillon 5 fois.
4. Introduire le même écouvillon dans la seconde narine et répéter les étapes 2 et 3.
5. Placer l'écouvillon dans son tube de transport.
6. Etiqueter le tube de transport.
7. Acheminer les échantillons au laboratoire suivant les modes opératoires normaux de l'hôpital.
8. Se référer à la section intitulée « Conservation, manipulation et stabilité – Échantillons prélevés » pour l'entreposage et la manutention.

Prélèvement des échantillons – écouvillon de plaie

Pour obtenir un échantillon adéquat, suivre soigneusement la procédure de prélèvement d'échantillon.

En se servant d'un écouvillon recommandé (voir Matériel nécessaire mais non fourni), procéder au prélèvement d'échantillon de plaie comme suit:

1. Enlever l'excès de débris ou de pansements sans affecter indûment la surface de la plaie en utilisant un jet doux de solution saline normale.
2. Attendre une ou deux minutes avant de prélever l'échantillon. Si la plaie est plutôt sèche, humidifier l'écouvillon avec une solution saline stérile normale. Si la plaie est humide, l'écouvillon peut être utilisé sec.
3. La plaie doit être écouvillonnée dans un endroit où des signes cliniques d'infection sont présents. Ne pas écouvillonner un tissu dévitalisé ou avec escarre.
4. Éviter d'écouvillonner la peau environnante.
5. Écouvillonner la surface de la plaie selon une de ces techniques.
 - a. Diagonale de 10-points : Rouler l'écouvillon à la surface de la blessure, en tournant doucement le bout. Joignez 10 points fictifs répartis sur la blessure.
 - b. Rotation autour d'un point : Au centre de la plaie, avec l'écouvillon, appliquer une pression sur la plaie avec assez de force pour produire un peu d'exudat ou de sang. Tourner l'écouvillon trois fois dans le sens des aiguilles d'une montre.
6. Prélever le pus frais ou l'exudat de la plaie si présent.
7. Placer l'écouvillon dans son tube de transport.
8. Etiqueter le tube de transport.
9. Acheminer les échantillons au laboratoire suivant les modes opératoires normaux de l'hôpital.
10. Se référer à la section intitulée Conservation, manipulation et stabilité – Échantillons prélevés pour l'entreposage et la manutention.

Préparation de l'échantillon pour le test BD GeneOhm™ StaphSR

Remarque : Un tube de *Sample Buffer* (tampon d'échantillon, **capuchon bleu**) et un *Lysis tube* (tube de lyse, **capuchon jaune**) sont nécessaires **pour chaque échantillon** à tester. Retirer le nombre de tubes requis de leurs pochettes de protection, **retirer l'excès d'air et refermer les pochettes rapidement avec la fermeture à glissière.**

Pour la culture des échantillons avant d'exécuter le test BD GeneOhm™ StaphSR, voir la section « Culture des échantillons – méthode par étalement » pour les détails.

Suspension cellulaire

Pour les hémocultures:

1. **Transférer 2 µL d'hémoculture positive homogène contenant des cocci à Gram positif dans un tube de tampon d'échantillon (capuchon bleu).**

Identifier le tube de tampon d'échantillon sur le capuchon et/ou l'étiquette.

2. **Vortexer à grande vitesse pendant 15 secondes.**

Pour traiter plusieurs échantillons, un adaptateur à positions multiples peut être utilisé.

3. **Transférer 50 µL de suspension cellulaire au tube de lyse (capuchon jaune); bien refermer le tube.**

Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque échantillon.

4. **Se référer à la section intitulée « Lyse ».**

Pour les écouvillons nasaux :**1. Placer l'écouvillon dans un tube de tampon d'échantillon (capuchon bleu).**

Identifier le tube de tampon d'échantillon sur le capuchon et/ou l'étiquette.

2. Casser la tige de l'écouvillon et bien fermer le tube.

Tenir la tige de l'écouvillon près du bord du tube (une gaze peut être utilisée pour minimiser les risques potentiels de contamination). Soulever l'écouvillon de quelques millimètres (mm) par rapport au fond du tube et plier la tige contre le bord du tube pour la casser. Méthode alternative : utiliser des ciseaux propres pour couper la tige. S'assurer que le capuchon se refermera complètement.

3. Vortexer à grande vitesse pendant une minute.

Pour traiter plusieurs échantillons, un adaptateur à positions multiples peut être utilisé.

4. Transférer tout le volume de suspension cellulaire au tube de lyse (capuchon jaune).

Utiliser une pipette de transfert stérile à pointe fine ou une micropipette P-1000 avec un embout à pointe allongée.

Pour la culture d'échantillons à partir de l'écouvillon restant, se référer à la section «Culture des échantillons – bouillon d'enrichissement» pour plus de détails.

5. Centrifuger à haute vitesse (entre 14 000 x g et 21 000 x g) pendant 5 minutes à la température ambiante.

6. Retirer le surnageant et le jeter.

Utiliser une pipette de transfert stérile à pointe fine pour retirer le surnageant du *Lysis tube*, en prenant soin de ne pas toucher au culot. Utiliser une nouvelle pipette de transfert pour chaque échantillon.

7. Ajouter 50 µL de tampon d'échantillon au tube de lyse. Bien refermer le tube.

Utiliser un nouvel embout pour chaque échantillon. Un tube de tampon d'échantillon est suffisant pour préparer jusqu'à 20 échantillons. Pour plus de 20 échantillons, utiliser autant de tubes de tampon d'échantillon que nécessaire (**conserver le tampon non utilisé pour la suite de la procédure du test BD GeneOhm™ StaphSR**).

8. Se référer à la section intitulée « Lyse ».

Pour les écouvillons de plaies :**1. Placer l'écouvillon dans un tube de tampon d'échantillon (capuchon bleu).**

Identifier le tube de tampon d'échantillon sur le capuchon et/ou l'étiquette.

2. Casser la tige de l'écouvillon et bien fermer le tube.

Tenir la tige de l'écouvillon près du bord du tube (une gaze peut être utilisée pour minimiser les risques potentiels de contamination). Soulever l'écouvillon de quelques millimètres (mm) par rapport au fond du tube et plier la tige contre le bord du tube pour la casser. Méthode alternative : utiliser des ciseaux propres pour couper la tige. S'assurer que le capuchon se refermera complètement.

3. Vortexer à grande vitesse pendant une minute.

Pour le traitement de plusieurs échantillons, un adaptateur à positions multiples peut être utilisé.

4. Transférer 50 µL de suspension cellulaire au tube de lyse (capuchon jaune); bien refermer le tube.

Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque échantillon.

Pour la culture d'échantillons à partir de l'écouvillon restant, se référer à la section «Culture des échantillons – bouillon d'enrichissement» pour plus de détails.

5. Se référer à la section intitulée « Lyse ».

Lyse**1. Vortexer le tube de lyse contenant la suspension de cellules pendant 5 minutes à haute vitesse.**

Pour traiter plusieurs échantillons, un adaptateur à positions multiples peut être utilisé.

2. Centrifuger brièvement le tube de lyse (centrifugation rapide).

À faible vitesse pendant 2 à 5 secondes pour faire déposer le contenu au fond du tube.

3. Chauffer à 95 ± 2 °C pendant deux (2) minutes.

Utiliser un bloc chauffant à sec pour tubes de 1,5 mL ou un bain-marie.

4. Placer le tube de lyse sur la glace ou sur un bloc réfrigérant.

Si les lysats ne sont pas utilisés immédiatement pour les tests, les garder à -20 ± 5 °C pour utilisation ultérieure.

Procédure du test BD GeneOhm™ StaphSR

Remarque : Un tube de *Master mix* reconstitué (mélange réactionnel, **étiquette blanche**) fournit suffisamment de réactifs **pour réaliser 8 réactions**. Prévoir un tube SmartCycler par échantillon à tester et 2 tubes SmartCycler supplémentaires pour les contrôles positif et négatif. **Un (1) contrôle positif et un (1) contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série de tests BD GeneOhm™ StaphSR.** Un tube de *Control DNA* (ADN contrôle, **étiquette à bande rouge**) est requis par analyse. Un tube de *Diluent* (diluant, **étiquette à bande noire**) est requis pour la reconstitution d'un maximum de 3 tubes de *Master mix*. Retirer le nombre de tubes requis de leurs sachets de protection, **retirer l'excès d'air et refermer les sachets rapidement avec la fermeture à glissière.**

Le nombre de tubes SmartCycler préparés ne doit pas excéder le nombre de modules I-CORE® disponibles sur l'instrument SmartCycler.

1. Placer le nombre requis de tubes de mélange réactionnel dans la glace ou dans un bloc réfrigérant spécifique pour les tubes de 1,5 mL.

2. Ajouter 225 µL de Diluent (étiquette à bande noire) à chaque tube de mélange réactionnel.

Introduire l'embout de la micropipette à travers la membrane du capuchon du tube de mélange réactionnel. Ne pas introduire l'embout trop profondément dans le capuchon. Délivrer le diluant. Jeter ensuite le diluant non utilisé.

3. Vortexer le ou les tubes pendant 5 à 10 secondes.

Placer le tube dans de la glace ou dans un bloc réfrigérant pour les tubes de 1,5 mL jusqu'à ce qu'il soit prêt à être utilisé (les tubes de mélange réactionnel reconstitué sont stables pendant 3 heures dans la glace ou dans un bloc réfrigérant).

4. Placer un tube d'ADN contrôle (étiquette à bande rouge) dans de la glace ou dans un bloc réfrigérant pour les tubes de 1,5 mL.

5. Ajouter 225 µL du tampon d'échantillon (capuchon bleu) au tube d'ADN contrôle.

Introduire l'embout de la micropipette à travers la membrane du capuchon du tube d'ADN contrôle. Ne pas introduire l'embout trop profondément dans le capuchon. Délivrer le tampon d'échantillon.

6. Vortexer le tube pendant 5 à 10 secondes.

Placer les tubes de 1,5 mL dans de la glace ou sur un bloc de refroidissement jusqu'à ce qu'ils soient prêts à être utilisés.

7. Placer le nombre requis de tubes SmartCycler sur le bloc réfrigérant SmartCycler.

Prévoir un tube SmartCycler par échantillon et deux tubes SmartCycler en plus pour les contrôles. **Éviter de toucher aux fenêtres de détection optique au bas du tube et à la zone inférieure en forme de losange.**

Les étapes suivantes DOIVENT être exécutées EN 45 MINUTES :

8. Ajouter 25 µL de mélange réactionnel reconstitué aux tubes SmartCycler (utiliser une technique de pipettage appropriée pour assurer le transfert adéquat de la solution).

Retirer le capuchon avant de pipetter le réactif. Délivrer le liquide dans le réservoir (partie supérieure) des tubes SmartCycler. Identifier les tubes SmartCycler sur le capuchon. Les étiquettes d'identification fournies avec la trousse peuvent être utilisées. Jeter le mélange réactionnel non utilisé.

9. Ajouter 3,0 µL de chaque échantillon lysé à un tube SmartCycler différent rempli précédemment avec le mélange réactionnel reconstitué; refermer les tubes.

Prendre soin de ne pas aspirer les billes en pipettant le tube de lyse. Après avoir ajouté l'échantillon, pipetter en aspirant et en relâchant 2 à 3 fois dans le réservoir pour assurer le transfert du volume entier. Utiliser un nouvel embout de micropipette pour chaque échantillon.

10. Ajouter 3,0 µL d'ADN contrôle reconstitué à l'avant-dernier tube SmartCycler (contrôle positif); refermer le tube.

Après l'addition d'ADN, pipetter en aspirant et en relâchant 2 à 3 fois dans le réservoir pour assurer le transfert du volume entier. Identifier comme contrôle positif. Jeter l'ADN contrôle non utilisé.

11. Ajouter 3,0 µL de tampon d'échantillon (capuchon bleu) au dernier tube SmartCycler (contrôle négatif); refermer le tube.

Utiliser le tube de tampon d'échantillon de l'étape 5. Ceci permettra de surveiller la contamination par PCR pouvant avoir eu lieu pendant la manipulation des échantillons. Identifier comme contrôle négatif. Jeter ensuite le tampon d'échantillon non utilisé.

12. Centrifuger tous les tubes de réaction pendant 5 à 10 secondes.

Utiliser la microcentrifugeuse spécialement adaptée fournie avec l'instrument SmartCycler.

13. Garder les tubes entre 2 et 8 °C dans le bloc réfrigérant SmartCycler avant de les charger dans l'instrument.

Les lysats restant doivent être congelés à -20 ± 5 °C pour utilisation ultérieure, au besoin.

14. Créer un essai avec le protocole du test BD GeneOhm™ StaphSR.

Se référer au manuel d'utilisation du logiciel SmartCycler Dx au besoin. Entrer les paramètres d'identification pour les échantillons avant de commencer l'essai.

15. Introduire chaque tube de réaction dans un module I-CORE du SmartCycler et refermer le couvercle du module I-CORE.

Placer les contrôles positif et négatif à leur position appropriée (voir la section intitulée « Contrôle de qualité »). Appuyer fermement sur les tubes pour les mettre en place.

16. Démarrer l'essai.

Culture des échantillons – méthode par étalement

Pour réaliser les tests de sensibilité antimicrobienne ou le typage épidémiologique, utiliser la méthode par étalement décrite ci-dessous.

Pour les hémocultures positives :

1. Lorsque des cocci à Gram positif apparaissent dans une hémoculture positive, inoculer une gélose sang ou tout autre milieu solide approprié en transférant quelques gouttes de l'hémoculture positive sur le premier quadrant de la plaque.
2. Avec une anse stérile, faire l'étalement de l'inoculum en striant les autres quadrants de la gélose sang.
3. Incuber la gélose pendant 24-48 heures à 35 °C.
4. Identifier les colonies et réaliser des tests de sensibilité antimicrobienne conformément aux méthodes standard.

Pour les écouvillons nasaux:

1. Retirer l'écouvillon de son tube de transport
2. Inoculer une gélose mannitol-sel (MSA-mannitol salt agar) ou tout autre milieu solide approprié en striant le premier quadrant de la gélose.
3. Replacer l'écouvillon dans son tube de transport ou en casser la tige dans un tube de tampon d'échantillon (capuchon bleu) du test BD GeneOhm™ StaphSR et continuer la procédure décrite dans la section « Préparation des échantillons ».
4. Avec une anse stérile, strier l'inoculum dans les quadrants restants de la gélose mannitol-sel.
5. Incuber la gélose de MSA ou la gélose sang pendant 24 à 48 heures à 35°C.
6. Identifier les colonies de *S. aureus* et/ou tester pour la résistance à la méthicilline selon les méthodes standard.

Pour les écouvillons de plaies:

1. Retirer l'écouvillon de son tube de transport
2. Inoculer une gélose sang ou tout autre milieu solide approprié en striant le premier quadrant de la gélose.

3. Remplacer l'écouvillon dans son tube de transport ou en casser la tige dans un tube de tampon d'échantillon (capuchon bleu) du test BD GeneOhm™ StaphSR et continuer la procédure décrite dans la section « Préparation des échantillons ».
4. Avec une anse stérile, strier l'inoculum dans les quadrants restants de la gélose.
5. Incuber la gélose pendant 24 à 48 heures à 35°C.
6. Identifier les colonies et tester pour la résistance aux antibiotiques selon les méthodes standard.

Culture des échantillons – bouillon d'enrichissement

Cette méthode de culture peut être exécutée avec les écouvillons conservés dans le tampon d'échantillon après le transfert de la suspension cellulaire dans le tube de lyse. Les écouvillons peuvent être conservés à 2-8°C dans des tubes de tampon d'échantillon jusqu'à 24 heures avant la culture; les échantillons à faible charge de SARM ou SA pourraient ne pas être récupérés.

Pour les écouvillons nasaux:

1. Ajouter 1,0 mL de bouillon d'enrichissement aux tubes de tampon d'échantillon contenant l'écouvillon.
Le bouillon tryptone soya (TSB) supplémenté avec 6,5% de NaCl est suggéré.
2. Vortexer pendant 2 à 5 secondes.
3. Incuber pendant 24 à 48 heures à 35°C. S'il n'y a pas de croissance, continuer l'incubation jusqu'à 48 heures.
4. Repiquer sur un milieu solide approprié et faire croître pendant 24 à 48 heures à 35°C.
Une gélose contenant 5% de sang de mouton ou une gélose mannitol-sel (MSA-mannitol salt agar) sont suggérées.
5. Identifier les colonies de *S. aureus* et tester pour la résistance à la méthicilline selon les méthodes standard.

Pour les écouvillons de plaies:

1. Transférer 300 µL de suspension cellulaire du tube de tampon d'échantillon à 5 mL de bouillon d'enrichissement.
Le bouillon tryptone soya (TBS) supplémenté avec 6,5% de NaCl est suggéré.
2. Vortexer pendant 2 à 5 secondes.
3. Incuber pendant 24 à 48 heures à 35°C.
4. Repiquer sur un milieu solide approprié et faire croître pendant 24 à 48 heures à 35°C.
Une gélose contenant 5% de sang de mouton est suggérée.
5. Identifier les colonies et réaliser des tests de sensibilité antimicrobienne conformément aux méthodes standard.

Contrôle de qualité

Contrôles positifs et négatifs

Les procédures de contrôle qualité visent à vérifier l'efficacité du test. Le contrôle positif vérifie la fonctionnalité du réactif. Le contrôle négatif détecte la contamination du réactif ou de l'environnement (ou la contamination croisée) par l'ADN ou des amplicons de *S. aureus* ou de SARM. Les contrôles positif et négatif sont des contrôles de série. Un contrôle invalidé annule toute la série. Finalement, un contrôle interne intégré dans chaque mélange réactionnel détecte l'inhibition de la PCR dans chaque échantillon et valide l'intégrité des réactifs.

Chaque série de tests effectuée avec le SmartCycler doit comprendre un contrôle positif et un contrôle négatif. Le logiciel SmartCycler attribue la position des contrôles automatiquement (consulter le manuel d'utilisation du logiciel SmartCycler Dx). Tous les échantillons et les contrôles doivent fournir des résultats valides (il ne doit y avoir aucun contrôle positif ou négatif invalide et aucun contrôle interne rejeté).

Contrôles additionnels: contrôles positifs, négatifs et du traitement des échantillons

Des souches de contrôle peuvent être testées selon les recommandations ou les exigences des organismes réglementaires nationaux, fédéraux, provinciaux ou locaux ou selon des organismes d'accréditation. Une souche SARM de référence (ex. *American Type Culture Collection*, ATCC 43300), ainsi qu'un isolat clinique de SARM bien caractérisé, une souche MSSA de référence (ex. ATCC 25923) ou un échantillon clinique bien caractérisé peuvent être utilisés comme contrôle du traitement des échantillons: les souches MRSA MREJ (Mec Right Extremity Junction) de type iii et vii, si disponibles, peuvent être utilisées comme contrôles positifs additionnels, pour les sondes et les amorces qui ne sont pas directement contrôlées dans le test, tandis que toute souche autre que *Staphylococcus aureus* (ex. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990) peut être utilisée comme contrôle négatif externe.

Hémocultures positives:

Après culture sur gélose à 5 % de sang de mouton pendant 18 à 24 heures, remettre en suspension les colonies isolées dans une solution saline à une turbidité de 0,5 McFarland (~1,5 X 10⁸ CFU/mL). Traiter et tester comme un échantillon clinique (voir les sections « Préparation de l'échantillon pour le test BD GeneOhm™ StaphSR » et « Procédure du test BD GeneOhm™ StaphSR »). Pour les recommandations générales de CQ, l'utilisateur peut se référer à CLSI MM3¹³ et C24¹⁴.

Echantillons nasaux et de plaies :

Après culture sur gélose à 5 % de sang de mouton pendant 18 à 24 heures, remettre en suspension les colonies isolées dans une solution saline à une turbidité de 0,5 McFarland (~1,5 X 10⁸ CFU/mL). Diluer avec une solution saline pour obtenir une suspension à environ 10⁶ CFU/mL. Imbiber un écouvillon recommandé (se référer à la section « Matériel recommandé mais non fourni ») dans la suspension bactérienne, presser pour retirer le surplus de liquide, placer l'écouvillon dans son tube de transport (pour permettre le contact avec le médium de transport), et laisser reposer à température ambiante pendant 5 minutes. Traiter et tester comme un échantillon clinique (voir les sections « Préparation de l'échantillon pour le test BD GeneOhm™ StaphSR » et « Procédure du test BD GeneOhm™ StaphSR »). Pour les recommandations générales de CQ, l'utilisateur peut se référer à CLSI MM3¹³ et C24¹⁴.

Interprétation des résultats

L'algorithme de décision relatif au test BD GeneOhm™ StaphSR est intégré dans le logiciel SmartCycler. L'interprétation des résultats de l'analyse se fait selon les critères suivants :

Résultat de l'échantillon	Résultat du CI	Interprétation des résultats
NEG (Négatif)	PASS (Accepté)	Aucun ADN de <i>S. aureus</i> détecté
POS (Positif)	NA (Non applicable)	ADN de SARM détecté
Reactive (Réactif)	NA (Non applicable)	ADN de <i>S. aureus</i> détecté, aucun ADN de SARM détecté
Unresolved (Non résolu)	FAIL (Rejeté)	Non résolu – échantillon inhibiteur ou défaillance du réactif
ND (Indéterminé)	ND (Indéterminé)	Indéterminé en raison d'une défaillance du module I-CORE (Codes d'erreur ou d'avertissement affichés ¹)

CI – Contrôle interne

¹ Voir le manuel d'utilisation du logiciel SmartCycler Dx pour l'interprétation des codes d'avertissement et d'erreur.

Un contrôle positif ou négatif invalidé annule toute la série. Dans ces cas, les résultats de l'analyse obtenus pour ce test sont invalides et ne doivent pas être reportés. Les analyses invalides, les codes d'erreur d'instrument et les avertissements sont indiqués sur l'écran et sur les rapports. Avant de reporter les résultats, toujours vérifier que l'analyse est valide.

Se référer au manuel d'utilisation du logiciel SmartCycler Dx pour imprimer les résultats.

Série invalidée

En utilisant les lysats congelés, préparer de nouveaux tubes de réaction pour tous les échantillons cliniques de cette série. Préparer aussi de nouveaux contrôles.

Échantillons non résolus

Reprendre le test avec le lysat congelé de l'échantillon non résolu. Un cycle de congélation/décongélation diminue l'effet des substances inhibitrices de la PCR.

Échantillons indéterminés en raison d'une défaillance du module I-CORE

Reprendre le test avec les lysats congelés d'échantillon correspondants. Consulter le manuel d'utilisation du logiciel SmartCycler® Dx pour l'interprétation des codes d'erreur ou d'avertissement.

Limites du test

- Les caractéristiques de performance de cette analyse n'ont pas été établies avec des instruments de PCR en temps réel automatisés autres que l'instrument SmartCycler®.
- L'utilisation de milieux d'hémoculture et d'écouvillons différents de ceux indiqués à la section « Matériel nécessaire mais non fourni » n'est pas recommandée. Ce test ne doit être utilisé qu'avec des échantillons de flacon d'hémoculture positive, nasaux et de plaies; les caractéristiques de performance d'autres types d'échantillons cliniques n'ont pas été établies.
- Des techniques inadéquates de prélèvement d'échantillons, de manipulation et conservation, la présence de substances inhibitrices, des erreurs techniques, un mélange d'échantillons ou un nombre de micro-organismes dans l'échantillon inférieur à la sensibilité analytique du test peuvent donner lieu à des résultats négatifs. Pour éviter des résultats erronés, il est essentiel de respecter scrupuleusement les consignes données dans la présente notice et dans le manuel d'utilisation du logiciel SmartCycler Dx. Le test ne devrait être effectué que par du personnel formé à la technique ainsi qu'à l'analyse sur le SmartCycler.
- Bien qu'aucun réactif ne soit à préparer et que l'opération technique principale soit le pipetage, il est essentiel de suivre une bonne technique de laboratoire pour exécuter correctement cette analyse. La sensibilité analytique élevée de ce test exige de prendre un soin extrême pour préserver la pureté de tous les réactifs, spécialement lorsque plusieurs aliquotes sont prélevées d'un tube.
- Les résultats du test BD GeneOhm™ StaphSR peuvent parfois être non résolus, non déterminés (à cause d'une défaillance du module I-CORE) ou invalidés par contrôle invalide. Il sera alors nécessaire de tester à nouveau, ce qui pourra prolonger le temps nécessaire pour obtenir les résultats.
- Un résultat de test positif n'indique pas forcément la présence d'organismes viables. Il fait cependant présumer la présence de *Staphylococcus aureus* ou de SARM. Pour la détection de SARM, le test BD GeneOhm™ StaphSR cible simultanément la cassette *SCCmec* (porteuse du gène *mecA*) et une séquence spécifique de *S. aureus* située à l'intérieur du gène *orfX*. Le test BD GeneOhm™ StaphSR ne détecte pas directement le gène *mecA* ni la protéine fixatrice de la pénicilline (PBP 2a) encodée par ce gène. Pour la détection de *S. aureus*, l'analyse par BD GeneOhm™ StaphSR cible directement une séquence spécifique à *S. aureus*.
- La présence de mutations dans les régions d'hybridation des sondes ou des amorces peut affecter la détection de nouvelles variantes ou de variantes inconnues de *S. aureus* occasionnant un résultat faux négatif avec le test BD GeneOhm™ StaphSR.
- Dans une culture mixte contenant du SARM et du SASM (*S. aureus* sensible à la méthicilline), la limite de détection de SARM peut être variable (jusqu'à 30 copies / réaction) en présence de concentrations de SASM extrêmement élevées (ex. un rapport de SARM/SASM de 1/500 ou de 1/1 000).
- La préparation des mélanges réactionnels et des contrôles positifs et négatifs doit se faire dans un environnement qui n'excède pas 25 °C.
- Les substances interférentes potentielles incluent, mais ne se limitent pas aux suivantes: sang, sécrétions nasales, décongestionants, et substances utilisées à l'occasion pour soulager la sécheresse et/ou l'irritation nasale. La présence de sécrétions nasales et de sang peut inhiber la réaction PCR et donner des résultats non résolus.

Caractéristiques de performance

Spécificité analytique

L'ADN génomique de 66 souches non staphylococciques (représentant 64 espèces) et l'ADN génomique de 33 souches de *Staphylococcus* coagulase-négatives (représentant 25 espèces) ont été testés. Toutes les espèces étaient liées phylogénétiquement à *S. aureus* ou associées habituellement avec le corps humain. Aucun de ces échantillons n'a donné de résultats positifs, par conséquent la spécificité analytique était de 100 %.

Sensibilité analytique

Détermination de la limite de détection (LoD) en utilisant de l'ADN génomique

La sensibilité analytique (limites de détection ou LoD) du Test BD GeneOhm™ StaphSR utilisant de l'ADN génomique a été déterminée en utilisant une quantité décroissante d'ADN génomique quantifié (copies/réaction PCR) provenant de cultures de 6 souches de MRSA représentant 6 génotypes MREJ (i, ii, iii, iv, v et vii) et 4 types de SCC_{mec} (I, II, III, IV) et de l'ADN génomique provenant d'une souche de MSSA. Chaque souche a été testée en au moins 48 réplicats par concentration, par 2 opérateurs différents en utilisant 3 lots différents de mélange réactionnel du Test BD GeneOhm™ StaphSR. La sensibilité analytique (LoD), définie comme la concentration la plus faible à laquelle ≥ 95 % de tous les réplicats sont prévus être positifs, allait de 2 à 6 copies/réaction PCR pour MRSA, avec une valeur moyenne de 4 copies d'ADN/réaction PCR, et de 13 à 17 copies/réaction PCR pour MSSA, avec une valeur de 15 copies d'ADN/réaction PCR.

	Génotype MREJ	Type de SCC _{mec}	Concentration à la LoD (Copies/Réaction PCR) (avec 95 % CI*)
MRSA	type i	I	3 (2-3)
	type ii	II	4 (3-5)
	type iii	III	5 (4-6)
	type iv	III	5 (4-6)
	type v	IV	3 (2-3)
	type vii	II	3 (3-4)
MSSA	NA	NA	15 (13-17)

NA: Non applicable

*CI: Intervalles de confiance

Détermination de la limite de détection (LoD) en utilisant des bactéries viables

La sensibilité analytique (limites de détection ou LoD) du Test BD GeneOhm™ StaphSR utilisant des souches de MRSA et de MSSA viables a été déterminée en utilisant des écouvillons positifs simulés ayant été préparés en trempant des écouvillons dans une grande variété de suspensions bactériennes de MRSA et de MSSA préparées et quantifiées à partir de cultures de 6 souches de MRSA représentant 6 génotypes MREJ (i, ii, iii, iv, v et vii) et 4 types de SCC_{mec} (I, II, III, IV) ainsi que d'une souche de MSSA, puis déchargés/élués dans le tampon d'échantillon. Chaque souche a été testée en 24 réplicats par concentration, par 4 opérateurs différents en utilisant 3 lots différents de mélange réactionnel du Test BD GeneOhm™ StaphSR. Dans les échantillons nasaux, la sensibilité analytique (LoD), définie comme étant la concentration la plus faible à laquelle ≥ 95 % de tous les réplicats sont prévus être positifs, allait de 24 à 319 UFC/écouvillon pour MRSA, avec une moyenne de 109 UFC/écouvillon, et de 198 à 1084 UFC/écouvillon pour MSSA, avec une valeur de 641 UFC/écouvillon. Dans les échantillons de plaies, la sensibilité analytique (LoD) allait de 95 à 770 UFC/écouvillon pour MRSA, avec une valeur moyenne de 314 UFC/écouvillon, et de 449 à 834 UFC/écouvillon pour MSSA, avec une valeur de 642 UFC/écouvillon. Dans les hémocultures positives, la sensibilité analytique (LoD) est de 10 UFC par réaction; cependant, en raison du processus d'enrichissement accompagnant les hémocultures, toutes les hémocultures contiennent des charges bactériennes très élevées résultant en nombre de copies d'ADN par réaction bien au-dessus de la LoD de l'essai.

Application nasale

	Génotype MREJ	Type de SCC _{mec}	Concentration à la LoD (UFC/écouvillon) (avec 95 % CI*)
MRSA	type i	I	34 (24-44)
	type ii	II	104 (74-134)
	type iii	III	45 (32-58)
	type iv	III	167 (113-221)
	type v	IV	67 (50-84)
	type vii	II	236 (153-319)
MSSA	NA	NA	641 (198-1084)

NA: Non applicable

*CI: Intervalles de confiance

Application pour plaie

	Génotype MREJ	Type de SCC _{mec}	Concentration à la LoD (UFC/écouvillon) (avec 95 % CI*)
MRSA	type i	I	340 (243-436)
	type ii	II	135 (95-175)
	type iii	III	448 (125-770)
	type iv	III	582 (420-744)
	type v	IV	216 (146-286)
	type vii	II	165 (103-226)
MSSA	NA	NA	642 (449-834)

NA: Non applicable

*CI: Intervalles de confiance

Performance clinique – hémocultures positives

Les caractéristiques de performance du test BD GeneOhm™ StaphSR pour les hémocultures ont été déterminées dans une étude expérimentale prospective dans plusieurs sites. Cinq centres médicaux, deux au Canada et trois aux États-Unis, ont participé à l'étude. Pour participer à l'étude, les cultures positives obtenues à l'aide des flacons de culture BACTEC™ ou BacT/Alert® devaient être admissibles au test selon les politiques de l'hôpital, et obtenir un résultat cocci à Gram positif lorsque testé par coloration de Gram.

La méthode de culture de référence a été exécutée en utilisant des flacons de sang positifs présentant une croissance de bactéries cocci à Gram positif dans les 36 heures après avoir été déclarées positives par l'instrument. La méthode de référence a consisté en une analyse initiale sur gélose au sang après avoir été incubée pendant une nuit. Des colonies présumées de *S. aureus* ont été confirmées par une réaction au latex, un test de coagulase en tube ou par un système d'identification automatisé. Des colonies confirmées ont été testées pour la résistance à la méthicilline en utilisant le dépistage à l'oxacilline sur agar, le test d'agglutination de PBP2' au latex ou un système de test de sensibilité antimicrobienne automatisé utilisant des panels appropriés. Un échantillon de culture positif de SARM et/ou de *S. aureus* a été défini comme échantillon positif pour SARM et/ou *S. aureus* par la technique de culture. Un échantillon de culture négatif de SARM ou de *S. aureus* a été défini comme échantillon négatif pour SARM et *S. aureus* par la technique de culture.

Au total, 1 183 flacons de sang positif ont été conformes et ont produit des résultats reportables lorsque criblés pour *S. aureus* et SARM avec la méthode de culture de référence décrite ci-dessus et l'analyse par BD GeneOhm™ StaphSR (tableau 1). En comparaison avec les méthodes de culture de référence, l'analyse par BD GeneOhm™ StaphSR a identifié 100 % d'échantillons positifs de SARM et 98.8 % à 100% d'échantillons positifs de *S. aureus* (tableaux 2 et 3).

Tableau 1. Résultats obtenus avec le test BD GeneOhm™ StaphSR pour SARM et *S. aureus* en comparaison avec la méthode de référence pour les hémocultures positives

Site 1

		Culture/Système ID-AST 1		
		+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	61	5	66
	-	0	380	380
		61	385	446

		Culture/Système ID-AST 1		
		+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	99	0	99
	-	0	347	347
		99	347	446

Site 2

		Culture/Système ID-AST 2		
		+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	24	2	26
	-	0	107	107
		24	109	133

		Culture/Système ID-AST 2		
		+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	40	1	41
	-	0	92	92
		40	93	133

Site 3

		Culture/Agar de dépistage à l'oxacilline		
		+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	21	0	21
	-	0	211	211
		21	211	232

		Culture/ Agar de dépistage à l'oxacilline		
		+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	83	0	83
	-	0	149	149
		83	149	232

Site 4

		Culture/ Système ID-AST 3		
		+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	48	4	52
	-	0	234	234
		48	238	286

		Culture/ Système ID-AST 3		
		+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	84	7	91
	-	1	194	195
		85	201	286

Site 5

		Culture/ Agar de dépistage à l'oxacilline et PBP2' latex		
		+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	2	0	2
	-	0	84	84
		2	84	86

		Culture/ Agar de dépistage à l'oxacilline et PBP2' latex		
		+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	8	0	8
	-	0	78	78
		8	78	86

Tableau 2. Performance obtenue avec le test BD GeneOhm™ StaphSR pour SARM (au site expérimental) en comparaison avec la méthode de référence pour les hémocultures positives

Site	Prévalence de SARM	Concordance clinique SARM positif (95 % CI) ¹	Concordance clinique SARM négatif (95 % CI) ¹	Concordance globale par site
Site 1	13,7 % (61/446)	100%(61/61) (94,1 % - 100 %)	98,7% (380/385) (97,0 % - 99,6 %)	98.9% (441/446) (97.4%-99.6%)
Site 2	18,0 % (24/133)	100%(24/24) (85,8 % - 100 %)	98,2% (107/109) (93,5 % - 99,8 %)	98.5% (131/133) (94.7%-99.8%)
Site 3	9,1 % (21/232)	100%(21/21) (83,9 % - 100 %)	100,0% (211/211) (98,3 % - 100,0 %)	100% (232/232) (98.4%-100.0%)
Site 4	16,8 % (48/286)	100%(48/48) (92,6 % - 100 %)	98,3% (234/238) (95,8 % - 99,5 %)	98.6% (282/286) (96.5%-99.6%)
Site 5	2,3 % (2/86)	100%(2/2) (15,8 % - 100 %)	100,0% (84/84) (95,7 % - 100,0 %)	100% (86/86) (95.8%-100.0%)

¹ Intervalles de confiance binomiaux exacts de 95 %.

Tableau 3. Performance obtenue avec le test BD GeneOhm™ StaphSR pour *S. aureus* (par site expérimental) en comparaison avec la méthode de référence pour les hémocultures positives

Site	Prévalence de <i>S. aureus</i>	Concordance clinique <i>S. aureus</i> positif (95 % CI) ¹	Concordance clinique <i>S. aureus</i> négatif (95 % CI) ¹	Concordance globale par site
Site 1	22,2 % (99/446)	100.0% (99/99) (96.3%-100%)	100 % (347/347) (98,9 % - 100 %)	100% (446/446) (99.2-100.0%)
Site 2	30,1 % (40/133)	100% (40/40)(91.2%-100%)	98,9 % (92/93) (94,2 % - 100 %)	99.2% (132/133) (95.9%-100.0%)
Site 3	35,8 % (83/232)	100% (83/83)(95.7%-100%)	100 % (149/149) (97,6 % - 100 %)	100% (232/232) (98.4%-100.0%)
Site 4	29,7 % (85/286)	98.8%(84/85)(93.6% - 100.0%)	96,5 % (194/201) (93,0 % - 98,6 %)	97.2% (278/286) (94.6%-98.8%)
Site 5	9,3 % (8/86)	100% (8/8) (63.1% - 100.0%)	100 % (78/78) (95,4 % - 100 %)	100% (86/86) (95.8%-100.0%)

¹ Intervalles de confiance binomiaux exacts de 95 %.

Tableau 4. Résultats non résolus pour les hémocultures positives

Site	% initial non résolu avec 95 % d'intervalles de confiance exacts		% d'essais non résolus après répétition avec 95 % d'intervalles de confiance exacts	
Site 1	0.0% (0/446)	(0.0% - 0.8%)	0,0 % (0/446)	(0,0 % - 0,8 %)
Site 2	0.0% (0/133)	(0.0% - 2.7%)	0,0 % (0/133)	(0,0 % - 2,7 %)
Site 3	0.0% (0/232)	(0.0% - 1.6%)	0,0 % (0/232)	(0,0 % - 1,6 %)
Site 4	0.3% (1/286)	(0.0% - 1.9%)	0,0 % (0/286)	(0,0 % - 1,3 %)
Site 5	0.0% (0/86)	(0.0% - 4.2%)	0,0 % (0/86)	(0,0 % - 4,2 %)
Pourcentage global	0.1% (1/1183)	(0.0%-0.5%)	0.0% (0/1183)	(0.0%-0.3%)

Tableau 5. Analyses invalides pour les hémocultures positives

Site	% d'essais invalides initiaux avec 95 % d'intervalles de confiance exacts		% d'essais invalides résolus avec 95 % d'intervalles de confiance exacts	
Site 1	1,8 % (2/113)	(0,2 % - 6,2 %)	0,0 % (0/113)	(0,0 % - 3,2 %)
Site 2	8,9 % (5/56)	(3,0 % - 19,6 %)	0,0 % (0/56)	(0,0 % - 6,4 %)
Site 3	2,9 % (2/69)	(0,4 % - 10,1 %)	0,0 % (0/69)	(0,0 % - 5,2 %)
Site 4	2,4 % (2/84)	(0,3 % - 8,3 %)	0,0 % (0/84)	(0,0 % - 4,3 %)
Site 5	7,7 % (5/65)	(2,5 % - 17,0 %)	0,0 % (0/65)	(0,0 % - 5,5 %)
Pourcentage global	4.1% (16/387)	(2.4%-6.6%)	0.0% (0/387)	(0.0%-0.9%)

Reproductibilité – hémocultures positives

Le panel de reproductibilité consistait en 12 échantillons simulés contenant 50 µL d'une hémoculture positive inoculée avec *Staphylococcus epidermidis*, SARM ou *S. aureus* ; de plus, deux contrôles (positif et négatif) ont été inclus. Les échantillons ont été testés en triple à trois jours différents à 3 sites différents (12 échantillons plus deux contrôles testés X 3 X 3 jours X 3 sites). Ceci a été répété avec trois lots de réactifs.

Les membres du panel de reproductibilité ont été préparés par l'inoculation de flacons d'hémocultures avec *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline (SA) ou *Staphylococcus epidermidis*. Les flacons inoculés ont été incubés jusqu'à ce qu'ils soient positifs, après quoi des aliquotes de milieux positifs ont été utilisés pour préparer les dilutions sérielles et ainsi obtenir les différentes concentrations de micro-organismes pour chaque échantillon (tableau 21).

Tous les échantillons d'hémoculture contiennent des charges bactériennes très élevées en comparaison avec la limite de détection du test. Par conséquent, le panel n'a pas été créé selon la limite de détection mais simplement par dilution d'un flacon déclaré positif. Le panel vise donc à imiter des problèmes de calibrations potentiels avec les systèmes d'hémoculture automatisés pouvant conduire à des déterminations de positivité précoces (ex. charges bactériennes plus faibles que prévu).

Tableau 6. Données cumulées de l'étude de reproductibilité des hémocultures positives

ID de l'échantillon	Dilution	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Accord total	% Accord total
Négatif	NA	27/27	27/27	27/27	81/81	100 %
Négatif	NA	27/27	27/27	27/27	81/81	100 %
SARM	1,0	27/27	27/27	27/27	81/81	100 %
SARM	1,0 E-01	27/27	27/27	27/27	81/81	100 %
SARM	5,0 E-02	27/27	27/27	27/27	81/81	100 %
SARM	1,0 E-02	27/27	27/27	27/27	81/81	100 %
SARM	1,0 E-03	27/27	27/27	26/26	80/80	100 %
SA*	1,0	27/27	27/27	27/27	81/81	100 %
SA*	1,0 E-01	27/27	27/27	27/27	81/81	100 %
SA*	5,0 E-02	27/27	27/27	27/27	81/81	100 %
SA*	1,0 E-02	27/27	27/27	27/27	81/81	100 %
SA*	1,0 E-03	27/27	27/27	27/27	81/81	100 %
Contrôle positif	NA	26/27	27/27	26/27	79/81	97,5 %
Contrôle négatif	NA	27/27	27/27	27/27	81/81	100 %
Accord total		377/378	378/378	376/377	1 131/1 133	99,8 %
% d'accord		99,7 %	100 %	99,7 %	99,8 %	

*Ici, SA représente la souche sensible à la méthicilline

Performance clinique – échantillons nasaux

Les caractéristiques de performance du test BD GeneOhm™ StaphSR pour les échantillons nasaux ont été déterminées dans une étude expérimentale prospective dans plusieurs sites. Quatre centres médicaux, trois au Canada et un aux États-Unis ont participé à l'étude. Pour participer à l'étude, les patients devaient être admissibles pour un dépistage selon les politiques de l'hôpital. Les patients étaient exclus s'ils avaient subi une thérapie pour l'éradication du SARM ou de SA dans les 14 jours précédant l'échantillonnage.

Une étude rétrospective a été menée pour ajouter un supplément à l'étude prospective du test BD GeneOhm™ StaphSR en augmentant le nombre d'échantillons positifs de *S. aureus* et de SARM par l'utilisation d'un stock d'échantillons nasaux congelés. L'étude comprenait trois sites; les membres des trois panels de 50 échantillons chacun ont été préparés et sélectionnés à partir de la collection de BD. La composition de chaque panel était inconnue des sites.

La méthode de référence consistait en une analyse initiale sur milieu sélectif mannitol-sel suivie d'une incubation d'une nuit. Les colonies présomptives de *S. aureus* étaient confirmées soit par un test d'agglutination pour *S. aureus* ou par un test de coagulase en tube. Les colonies confirmées étaient testées pour la résistance à la méthicilline par le dépistage à l'oxacilline sur agar ou les test d'agglutination PBP2' pour le SARM. Les échantillons négatifs pour le SARM étaient soumis à une analyse supplémentaire consistant en une étape d'enrichissement en bouillon de soya tripticase contenant 6.5% de NaCl, suivi d'un test de résistance à la méthicilline si nécessaire. Un échantillon de culture était défini comme positif pour le SARM et/ou *S. aureus* s'il était positif pour le SARM et/ou *S. aureus* par toute technique de culture. Un échantillon de culture négatif de SARM ou de *S. aureus* a été défini comme échantillon négatif pour SARM et *S. aureus* par les deux techniques de culture.

Au total, 1745 échantillons ont été conformes et ont produit des résultats reportables lorsque dépistés pour *S. aureus* et pour SARM avec la méthode de culture décrite ci-dessus et l'analyse par BD GeneOhm™ StaphSR (tableaux 7 et 12). En comparaison avec les méthodes de culture de référence, l'analyse par BD GeneOhm™ StaphSR a identifié de 73.3% à 100% d'échantillons positifs de SARM et de 86.4% à 94.6% d'échantillons positifs de *S. aureus* (tableaux 8, 9, 13 et 14).

Tableau 7. Résultats obtenus de l'étude prospective du test BD GeneOhm™ StaphSR pour SARM et *S. aureus* en comparaison avec la méthode de référence pour les échantillons nasaux

	SARM				<i>S. aureus</i>				
Site 1									
	Culture/ Agar de dépistage à l'oxacilline				Culture/ Agar de dépistage à l'oxacilline				
		+	-			+	-		
BD GeneOhm™ StaphSR	+	57	17	74	BD GeneOhm™ StaphSR	+	183	24	207
	-	2	576	578		-	14	431	445
		59	593	652		197	455	652	
Site 2									
	Culture/PBP2' Latex				Culture/PBP2' Latex				
		+	-			+	-		
BD GeneOhm™ StaphSR	+	22	6	28	BD GeneOhm™ StaphSR	+	93	5	98
	-	4	301	305		-	11	224	235
		26	307	333		104	229	333	
Site 3									
	Culture/ Agar de dépistage à l'oxacilline et PBP2' Latex				Culture/ Agar de dépistage à l'oxacilline et PBP2' Latex				
		+	-			+	-		
BD GeneOhm™ StaphSR	+	4	1	5	BD GeneOhm™ StaphSR	+	53	6	59
	-	0	279	279		-	3	222	225
		4	280	284		56	228	284	

Site 4

		Culture/ Agar de dépistage à l'oxacilline et PBP2' Latex					Culture/ Agar de dépistage à l'oxacilline et PBP2' Latex		
		+	-				+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	11	8	19	BD GeneOhm™ StaphSR	+	76	9	85
	-	4	305	309		-	12	231	243
		15	313	328			88	240	328

Tableau 8. Performance obtenue dans l'étude prospective avec le test BD GeneOhm™ StaphSR pour le SARM (par site expérimental) en comparaison avec la méthode de référence pour les échantillons nasaux.

Site	Prévalence de SARM	Concordance clinique SARM positif (95% IC) ¹	Concordance clinique SARM négatif (95% IC) ¹	Concordance clinique totale
Site 1	9.0% (60/665)	96.6%(57/59) (88.3%-99.6%)	97.1% (576/593) (95.4% - 98.3%)	97.1% (633/652) (95.5%-98.2%)
Site 2	7.8% (26/333)	84.6%(22/26) (65.1%-95.6%)	98.0% (301/307) (95.8% - 99.3%)	97.0% (323/333) (94.5%-98.6%)
Site 3	1.4% (4/289)	100%(4/4) (39.8%-100%)	99.6% (279/280) (98.0% - 100.0%)	99.6% (283/284) (98.1%-100.0%)
Site 4	4.5% (15/331)	73.3% (11/15)(44.9%-92.2%)	97.4% (305/313) (95.0% - 98.9%)	96.3% (316/328) (93.7%-98.1%)

¹ Intervalles de confiance binomiaux exacts de 95%.

Tableau 9. Performance obtenue dans l'étude prospective avec le test BD GeneOhm™ StaphSR pour *S. aureus* (par site expérimental) en comparaison à la méthode de référence pour les échantillons nasaux.

Site	Prévalence de SA	Concordance clinique SA positif (95% IC) ¹	Concordance clinique SA négatif (95% IC) ¹	Concordance clinique totale
Site 1	30.2% (201/665)	92.9% (183/197) (88.4%-96.1%)	94.7% (431/455)(92.3%-96.6%)	94.2% (614/652) (92.1%-95.8%)
Site 2	31.2% (104/333)	89.4% (93/104)(81.9%-94.6%)	97.8% (224/229) (95.0%-99.3%)	95.2% (317/333) (92.3%-97.2%)
Site 3	19.4% (56/289)	94.6% (53/56)(85.1%-98.9%)	97.4% (222/228) (94.4%-99.0%)	96.8% (275/284) (94.1%-98.5%)
Site 4	26.6% (88/331)	86.4% (76/88) (77.4% - 92.8%)	96.3% (231/240) (93.0% - 98.3%)	93.6% (307/328) (90.4%-96.0%)

¹ Intervalles de confiance binomiaux exacts de 95%.

Tableau 10. Résultats non résolus avec les échantillons nasaux¹

Site	% Initial non résolu avec 95% d'intervalles de confiance exacts	% d'essais non résolus après répétition avec 95% d'intervalles de confiance exacts
Site 1	2.3% (15/665) (1.3% - 3.7%)	0.2% (1/665) (0.0% - 0.8%)
Site 2	0.3% (1/333) (0.0% - 1.7%)	0.0% (0/333) (0.0% - 1.1%)
Site 3	1.0% (3/289) (0.2% - 3.0%)	0.0% (0/289) (0.0% - 1.3%)
Site 4	1.5% (5/331) (0.5% - 3.5%)	0.3% (1/331) (0.0% - 1.7%)
Pourcentage global	1.5% (24/1618) (1.0% - 2.2%)	0.1% (2/1618) (0.0% - 0.4%)

¹ Seuls les échantillons frais ont été considérés dans ce calcul

Tableau 11. Analyses invalides avec les échantillons nasaux

Site	% Initial invalides avec 95% d'intervalles de confiance exacts	% d'essais invalides après répétition avec 95% d'intervalles de confiance exacts
Site 1	2.9% (2/69) (0.4% - 10.1%)	0.0% (0/69) (0.0% - 5.2%)
Site 2	4.5% (3/67) (0.9% - 12.5%)	0.0% (0/67) (0.0% - 5.4%)
Site 3	6.5% (3/46) (1.4% - 17.9%)	2.2% (1/46) (0.1% - 11.5%)
Site 4	10.0% (3/30) (2.1% - 26.5%)	3.3% (1/30) (0.1% - 17.2%)
Pourcentage global	5.2% (11/212) (2.6% - 9.1%)	0.9% (2/212) (0.1% - 3.4%)

Tableau 12. Résultats obtenus de l'étude rétrospective du test BD GeneOhm™ StaphSR pour SARM et *S. aureus* en comparaison avec la méthode de référence avec les échantillons nasaux

SARM				<i>S. aureus</i>					
Site 1				Site 1					
Culture/Oxacillin Screen Agar				Culture/Oxacillin Screen Agar					
BD GeneOhm™ StaphSR	+	30	0	30	BD GeneOhm™ StaphSR	+	39	0	39
	-	0	20	20		-	1	10	11
30 20 50				40 10 50					
Site 2				Site 2					
Culture/Oxacillin Screen Agar				Culture/Oxacillin Screen Agar					
BD GeneOhm™ StaphSR	+	30	0	30	BD GeneOhm™ StaphSR	+	40	0	40
	-	0	20	20		-	0	10	10
30 20 50				40 10 50					
Site 3				Site 3					
Culture/Oxacillin Screen Agar				Culture/Oxacillin Screen Agar					
BD GeneOhm™ StaphSR	+	29	1	30	BD GeneOhm™ StaphSR	+	39	2	41
	-	0	18	18		-	0	7	7
29 19 48				39 9 48					

Tableau 13. Performance obtenue dans l'étude rétrospective du test BD GeneOhm™ StaphSR pour SARM (par site expérimental) en comparaison à la méthode de référence pour les échantillons nasaux.

Site	Concordance clinique SARM positif (95% IC) ¹	Concordance clinique SARM négatif (95% IC) ¹	Concordance clinique totale
Site 1	100.0%(30/30) (88.4% - 100.0%)	100.0% (20/20) (83.2% - 100.0%)	100% (50/50) (92.9%-100%)
Site 2	100.0%(30/30) (88.4% - 100.0%)	100.0% (20/20) (83.2% - 100.0%)	100% (50/50) (92.9%-100%)
Site 3	100.0% (29/29) (88.1% - 100.0%)	94.7% (18/19) (74.0% - 99.9%)	97.9 % (47/48) (88.9%-99.9%)

¹ Intervalles de confiance binomiaux exacts de 95%.

Tableau 14. Performance obtenue dans l'étude rétrospective du test BD GeneOhm™ StaphSR pour *S. aureus* (par site expérimental) en comparaison à la méthode de référence pour les échantillons nasaux.

Site	Concordance clinique SA positif (95% IC) ¹	Concordance clinique SA négatif (95% IC) ¹	Concordance clinique totale
Site 1	97.5% (39/40) (86.8% - 99.9%)	100.0% (10/10) (69.2% - 100.0%)	98.0% (49/50) (89.4%-99.9%)
Site 2	100.0% (40/40) (91.2% - 100.0%)	100.0% (10/10) (69.2% - 100.0%)	100.0% (50/50) (92.9%-100%)
Site 3	100.0% (39/39) (91.0% - 100.0%)	77.8% (7/9) (40.0% - 97.2%)	95.8% (46/48) (85.7%-99.5%)

¹ Intervalles de confiance binomiaux exacts de 95%.

Reproductibilité – échantillons nasaux

Le panel de reproductibilité consistait en 14 échantillons simulés contenant 100 µL de SARM, *S. aureus* ou *S. epidermidis* (échantillons négatifs). De plus, deux contrôles (positif et négatif) ont été inclus. Les échantillons ont été testés en triple sur trois jours différents et dans deux sites différents (14 échantillons plus deux contrôles testés X 3 X 3 jours X 2 sites). Ceci a été répété avec trois lots de réactifs.

Deux échantillons négatifs ont été inoculés avec *Staphylococcus epidermidis*. Deux échantillons positifs pour SARM et deux échantillons positifs pour *S. aureus* ont été préparés avec une charge bactérienne similaire à la limite de détection (SARM/SA faible positif dans le tableau 15). Quatre échantillons positifs pour SARM et quatre échantillons positifs pour *S. aureus* ont été inoculés avec des quantités de bactéries variées supérieures à la limite de détection (SARM/SA fort positif dans le tableau 15).

Tableau 15. Données cumulatives de l'étude de reproductibilité des échantillons nasaux

ID de l'échantillon	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Accord total	% Accord total
Négatif	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
Négatif	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
SARM faible positif	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
SARM faible positif	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
SA faible positif *	18/18	17/18	16/18	51/54	94.4%
SA faible positif *	17/18	18/18	15/18	50/54	92.6%
SARM fort positif	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
SARM fort positif	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
SARM fort positif	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
SARM fort positif	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
SA fort positif *	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
SA fort positif *	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
SA fort positif *	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
SA fort positif *	18/18	18/18	18/18	54/54	100%
Contrôle Positif	18/18	17/18	17/18	52/54	96.3%
Contrôle Négatif	18/18	17/18	18/18	53/54	98.1%
Accord total	287/288	285/288	282/288	854/864	98.8%
% Accord total	99.7%	99.0%	97.9%	98.8%	

* Dans ce panel, SA représente une souche de *S. aureus* sensible à la méthicilline

Performance clinique – échantillons de plaies

Les caractéristiques de performance du test BD GeneOhm™ StaphSR pour les plaies ont été déterminées dans une étude expérimentale prospective dans plusieurs sites. Quatre centres médicaux, deux au Canada et deux aux Etats-Unis ont participé à l'étude. Pour participer à l'étude, les patients devaient présenter une ou des plaie(s) infectée(s) et être admissibles pour un dépistage selon les politiques de l'hôpital. Les patients étaient exclus s'ils avaient subi une thérapie pour l'éradication du SARM ou de *S. aureus* dans les 14 jours précédents l'échantillonnage, ou utilisé une solution antiseptique ou une anesthésie locale avant l'écouvillonnage.

La méthode de référence consistait en une analyse initiale sur gélose sang suivie d'une incubation d'une nuit. Les colonies présomptives de *S. aureus* étaient confirmées soit par un test d'agglutination pour *S. aureus* ou par un test de coagulase en tube. Les colonies confirmées étaient testées pour la résistance à la méthicilline par un dépistage à l'oxacilline sur agar, le test d'agglutination PBP2' pour le SARM ou un système automatisé. Les échantillons négatifs pour le SARM étaient soumis à une analyse supplémentaire consistant en une étape d'enrichissement en bouillon de soja tripticase contenant 6.5% de NaCl, suivi d'un test de résistance à la méthicilline si nécessaire. Un échantillon de culture était défini comme positif pour le SARM et/ou *S. aureus* s'il était positif pour le SARM et/ou *S. aureus* par toute technique de culture. Un échantillon de culture négatif de SARM ou de *S. aureus* a été défini comme échantillon négatif pour SARM et *S. aureus* par les deux techniques de culture.

Au total, 748 échantillons ont été conformes et ont produit des résultats reportables lorsque testés pour *S. aureus* et pour SARM avec la méthode de culture de référence décrite ci-dessus et l'analyse par BD

GeneOhm™ StaphSR (tableau 16). En comparaison avec les méthodes de culture de référence, l'analyse par BD GeneOhm™ StaphSR a identifié de 96.0% à 100% d'échantillons positifs de SARM et de 83.3% à 100% d'échantillons positifs de *S. aureus* (tableaux 17 et 18).

Tableau 16. Résultats obtenus avec le test BD GeneOhm™ StaphSR pour SARM et *S. aureus* en comparaison avec la méthode de référence avec les échantillons de plaies

	SARM			<i>S. aureus</i>			
Site 1							
	Culture/Agar de dépistage à l'oxacilline			Culture/ Agar de dépistage à l'oxacilline			
		+	-		+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	48	17	65	124	20	144
	-	2	375	377	10	288	298
		50	392	442	134	308	442
Site 2							
	Culture/PBP2' Latex			Culture/PBP2' Latex			
		+	-		+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	3	0	3	5	0	5
	-	0	8	8	1	5	6
		3	8	11	6	5	11
Site 3							
	Culture/ Agar de dépistage à l'oxacilline et PBP2' Latex			Culture/ Agar de dépistage à l'oxacilline et PBP2' Latex			
		+	-		+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	2	0	2	7	0	7
	-	0	13	13	0	8	8
		2	13	15	7	8	15
Site 4							
	Culture/ Système ID-AST			Culture/ Système ID-AST			
		+	-		+	-	
BD GeneOhm™ StaphSR	+	137	2	139	183	2	185
	-	2	139	141	4	91	95
		139	141	280	187	93	280

Tableau 17. Performance obtenue avec le test BD GeneOhm™ StaphSR pour SARM (par site expérimental) en comparaison à la méthode de référence pour les échantillons de plaies.

Site	Prévalence de SARM	Concordance clinique SARM positif (95% IC) ¹	Concordance clinique SARM négatif (95% IC) ¹	Concordance globale par site
Site 1	11.3% (50/443)	96.0%(48/50) (86.3%-99.5%)	95.7% (375/392) (93.1% - 97.5%)	95.7% (423/442) (93.4%-97.4%)
Site 2	25.0% (3/12)	100.0%(3/3) (29.2%-100.0%)	100.0% (8/8) (63.1% - 100.0%)	100.0% (11/11) (71.5%-100.0%)
Site 3	13.3% (2/15)	100.0%(2/2) (15.8%-100.0%)	100.0% (13/13) (75.3% - 100.0%)	100.0% (15/15) (78.2%-100.0%)
Site 4	49.3% (139/282)	98.6% (137/139) (94.9%-99.8%)	98.6% (139/141) (95.0% - 99.8%)	98.6%(276/280) (96.4%-99.6%)

¹ Intervalles de confiance binomiaux exacts de 95%.

Tableau 18. Performance obtenue avec le test BD GeneOhm™ StaphSR pour *S. aureus* (par site expérimental) en comparaison à la méthode de référence pour les échantillons de plaies.

Site	Prévalence de SA	Concordance clinique SA positif (95% IC) ¹	Concordance clinique SA négatif (95% IC) ¹	Concordance clinique totale
Site 1	30.2% (134/443)	92.5% (124/134) (86.7%-96.4%)	93.5% (288/308) (90.1%-96.0%)	93.2% (412/442) (90.5%-95.4%)
Site 2	50.0% (6/12)	83.3% (5/6) (35.9%-99.6%)	100.0% (5/5) (47.8%-100.0%)	90.9%(10/11) (58.7%-99.8%)
Site 3	46.7% (7/15)	100.0% (7/7) (59.0%-100.0%)	100.0% (8/8) (63.1%-100.0%)	100.0% (15/15) (78.2%-100.0%)
Site 4	66.3% (187/282)	97.9% (183/187) (94.6% - 99.4%)	97.8% (91/93) (92.4% - 99.7%)	97.9% (274/280) (95.4%-99.2%)

¹ Intervalles de confiance binomiaux exacts de 95%.

Tableau 19. Résultats non résolus avec les échantillons de plaies

Site	% Initial non résolu avec 95% d'intervalles de confiance exacts		% d'essais non résolus après répétition avec 95% d'intervalles de confiance exacts	
Site 1	2.7% (12/443)	(1.4% - 4.7%)	0.2% (1/443)	(0.0% - 1.3%)
Site 2	8.3% (1/12)	(0.2% - 38.5%)	8.3% (1/12)	(0.2% - 38.5%)
Site 3	6.7% (1/15)	(0.2% - 31.9%)	0.0% (0/15)	(0.0% - 21.8%)
Site 4	2.5% (7/282)	(1.0% - 5.0%)	0.7% (2/282)	(0.1% - 2.5%)
Pourcentage global	2.8% (21/752)	(1.7% - 4.2%)	0.5% (4/752)	(0.1% - 1.4%)

Tableau 20. Analyses invalides avec les échantillons de plaies

Site	% Initial invalides avec 95% d'intervalles de confiance exacts		% d'essais invalides après répétition avec 95% d'intervalles de confiance exacts	
Site 1	3.3% (2/61)	(0.4% - 11.3%)	0.0% (0/61)	(0.0% - 5.9%)
Site 2	0.0% (0/11)	(0.0% - 28.5%)	0.0% (0/11)	(0.0% - 28.5%)
Site 3	23.1% (3/13)	(5.0% - 53.8%)	0.0% (0/13)	(0.0% - 24.7%)
Site 4	6.3% (4/63)	(1.8% - 15.5%)	0.0% (0/63)	(0.0% - 5.7%)
Pourcentage global	6.1% (9/148)	(2.8% - 11.2%)	0.0% (0/148)	(0.0% - 2.5%)

Reproductibilité – échantillons de plaies

Le panel de reproductibilité consistait en 14 échantillons simulés contenant 100 µL de SARM, *S. aureus* ou *S. epidermidis* (échantillons négatifs), incluant deux contrôles (positif et négatif). Les échantillons ont été testés en triple à trois jours différents et à trois sites différents (14 échantillons plus deux contrôles testés X 3 X 3 jours X 3 sites), répété avec trois lots de réactifs.

Les deux échantillons négatifs ont été inoculés avec *Staphylococcus epidermidis*. Trois échantillons positifs pour SARM et quatre échantillons positifs pour *S. aureus* ont été préparés avec une charge bactérienne similaire à la limite de détection (SARM/SA faible positif dans le tableau 6). Trois échantillons positifs pour SARM et deux échantillons positifs pour *S. aureus* ont été inoculés avec des quantités de bactéries variées supérieures à la limite de détection (SARM/SA fort positif dans le tableau 21).

Tableau 21. Données cumulatives de l'étude de reproductibilité des échantillons de plaie

ID de l'échantillon	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Accord total	% Accord total
Négatif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Négatif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
SARM faible positif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
SARM faible positif	27/27	27/27	25/27	79/81	98.8%
SA* faible positif	27/27	27/27	26/27	80/81	98.8%
SA* faible positif	26/26	27/27	27/27	80/80	100%
SARM faible positif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
SARM fort positif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
SARM fort positif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
SARM fort positif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
SA* faible positif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
SA* faible positif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
SA* fort positif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
SA* fort positif	27/27	27/27	27/27	81/81	100%
Contrôle positif	27/27	27/27	26/27	80/81	98.8%
Contrôle négatif	26/27	27/27	27/27	80/81	98.8%
Accord total	430/431	432/432	428/432	1290/1295	99.6%
% Accord total	99.8%	100.0%	99.1%	99.6%	

* Dans ce panel, SA représente une souche de *S. aureus* sensible à la méthicilline

References / Références

- ¹ Centers for Disease Control and Prevention. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin or soft tissue infection in a state prison. Mississippi, 2000. MMWR 2001; 50:919-922.
- ² National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 to June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control. 2004; 32:470-485.
- ³ Collignon, P. *et al.*, *Staphylococcus aureus* bacteremia, Australia. Emerg. Infect. Dis., 2005; 11 (4): 554-561.
- ⁴ Wyllie, D., *et al.*, Mortality after *Staphylococcus aureus* bacteraemia in two hospitals in Oxfordshire, 1997-2003: cohort study. BMJ, 2006; doi:10.1136/bmj.38834.421713.2F.
- ⁵ *Staphylococcus aureus* bacteremia: England, Wales and Northern Ireland: January to December 2003. CDR Weekly, 2004; 14 (16): 1-5.
- ⁶ Cosgrove, S., *et al.*, Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis., 2003; 36 (1):53-9.
- ⁷ Jernigan, J., Is the burden of *Staphylococcus aureus* among patients with surgical-site infections growing? Infect. Control Hosp. Epidemiol., 2004; 25 (6): 457-460.
- ⁸ Mc Garry, S. *et al.*, Surgical-site infection due to *Staphylococcus aureus* among elderly patients: mortality, duration of hospitalization, and cost. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 2004; 25 (6): 461-467.
- ⁹ Kluytmans, J. and Wertheim H., Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. Infection, 2005; 33 (1): 93-99.
- ¹⁰ Moran, G.J., *et al.*, Methicillin-resistant *S. aureus* Infections among patients in the emergency department. New Engl J Med, 2006; 355 (7): 666-674.
- ¹¹ Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1999). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
- ¹² Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (current edition/édition en vigueur).
- ¹³ Clinical and Laboratory Standards Institute. *Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline, (current edition/édition en vigueur)*. CLSI document MM3-A2. Clinical Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.
- ¹⁴ Clinical and Laboratory Standards Institute. *Statistical Quality Control for Quantitative Measurements: Principles and Definitions; Approved Guideline, (current edition/édition en vigueur)*. CLSI document C24. Clinical Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.

This kit is sold under license from the Public Health Research Institute of the City of New York, Inc. and may be used under the PHRI patent rights only for human *in vitro* clinical diagnostics.

The purchase of this product allows the purchaser to use it for amplification and detection of nucleic acid sequences for providing human *in vitro* diagnostics. No general patent or other license of any kind other than this specific right of use from purchase is granted hereby.




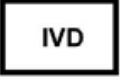







This product is subject to an agreement between Molecular Probes, Inc. and Geneohm Sciences, Inc., and the manufacture, use, sale or import of this product may be subject to one or more of U.S. patents, pending applications and corresponding foreign equivalents, owned by Molecular Probes, Inc. (a wholly owned subsidiary of Invitrogen Corporation). The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product, for use in assays for nucleic acid detection for the purpose of identifying microorganisms in human diagnostics. The buyer cannot use this product or its components for manufacturing or for therapeutic or prophylactic use, or sell or otherwise transfer this product or its components to any third party, or use for any use other than use in human diagnostics. For information on purchasing a license to this product for purposes other than use in human diagnostics, contact Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402, USA, Tel: (541) 465-8300. Fax: (541) 335-0504.

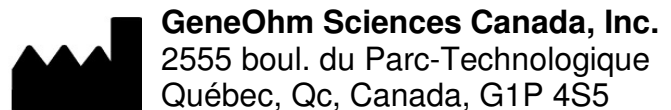
Cette trousse est vendue sous licence du « Public Health Research Institute of the City of New York, Inc. » et peut être utilisée uniquement pour du diagnostic clinique *in vitro* chez l'humain.

L'achat de ce produit permet à l'acheteur de l'utiliser pour procéder à une amplification et à une détection de séquences d'acides nucléiques lors de diagnostics cliniques *in vitro* chez l'humain. Aucun brevet général ou licence, autre que le droit d'utilisation spécifique conféré par l'achat, n'est octroyé par les présentes.

Ce produit est l'objet d'un accord entre Molecular Probes, Inc. et GeneOhm Sciences, Inc., et la fabrication, l'utilisation ou l'importation de ce produit peut être protégée par un ou plusieurs brevets américains, par des applications en cours et par des équivalents étrangers correspondants, appartenant à Molecular Probes, Inc. (filiale à cent pour cent d'Invitrogen Corporation). L'achat de ce produit confère à l'acheteur le droit non transférable d'utiliser la quantité achetée du produit et des composants du produit à des fins d'analyses destinées à la détection d'acides nucléiques pour identifier des micro-organismes dans les diagnostics humains. L'acheteur ne peut pas utiliser ce produit ou ses composants pour la fabrication ou pour un usage thérapeutique ou prophylactique et ne peut pas vendre ou transférer de manière quelconque ce produit ou ses composants à un tiers, ou utiliser ce produit ou ses composants d'une manière quelconque qui n'est pas destinée aux diagnostics humains. Pour tout renseignement au sujet de l'achat d'une licence de ce produit pour des buts autres que les diagnostics humains, veuillez vous adresser à : Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402, États-Unis, Tél. : +(541) 465-8300. Téléc. : +(541) 335-0504.

Index of symbols / Table des symboles

SYMBOL/SYMBOLE	MEANING/SIGNIFICATION	SYMBOL/SYMBOLE	MEANING/SIGNIFICATION
	Manufacturer / Fabricant		Batch code / Code de lot
REF	Catalog number / Référence du catalogue		Temperature limitation / Limites de température
	In Vitro Diagnostic Use / Aux fins de diagnostic <i>in vitro</i>		Protect from light and moisture / Conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité
	Authorized European Representative / Représentant européen autorisé		Reseal pouches after use / Refermer le sac après utilisation
	Use by / Utiliser avant		Consult instructions for use / Se référer aux instructions d'utilisation
	Contains sufficient for "n" tests / Contenu suffisant pour « n » tests		Box 1 of 3 / Boîte 1 de 3



Customer Service/Service à la Clientèle: 1.888.436.3646

