

Voorwoord

In deze editie een bijdrage van Iris Geboers over het BD MAX systeem; een nieuw apparaat van de Moleculaire Biologie wat momenteel wordt gevalideerd.

De redactie.

Geautomatiseerde PCR met behulp van het BD MAX systeem

Door: Iris Geboers

Het LMMI heeft sinds enkele maanden een nieuw apparaat op het laboratorium staan: de BD MAX. De BD MAX wordt momenteel getest en gevalideerd voor automatische extractie, amplificatie en detectie van DNA/RNA-targets uit diverse monstertypes.^[1] Er zijn verschillende commerciële kits beschikbaar voor *in vitro* diagnostische testen op de BD MAX. Ook beschikt de BD MAX over een open kanaal, waar zelf User Defined Programs (UDP's) op uitgevoerd kunnen worden.

BD MAX StaphSR-assay: een MRSA sneltest

Een van de commerciële kits die gebruikt kan worden op de BD MAX is de BD MAX StaphSR-assay.^[2] Dit is een automatische, kwalitatieve *in vitro* sneltest voor de detectie en differentiatie van (meticilline-resistente) *Staphylococcus aureus*. De StaphSR assay omvat DNA-isolatie, amplificatie en detectie door middel van real-time PCR met specifieke primers en probes. Er worden vier targets aangetoond bij de StaphSR assay:

1. SCCmec right extremity junction (MREJ): dit is een DNA-sequentie aan het einde van de Staphylococcal cassette chromosoom (SCC), op de overgang naar het *orfX*-gen. Op de SCC ligt het antibiotica-resistentiegen van MRSA (*mecA* of *mecC*). Het *mecA*-gen komt echter ook voor bij andere bacteriën. Alleen bij MRSA wordt de SCC met *mecA/mecC* ingebouwd naast het *orfX*-gen. De overgang van SSC naar *orfX*-gen (MREJ) is dus specifiek voor MRSA.^[3,4,5]
2. *mecA/mecC*: meticilline-resistentiegenen. Deze genen zorgen bij *S. aureus*, maar ook bij andere bacteriën, voor resistentie voor verschillende bèta-lactam antibiotica (zoals meticilline en penicilline).^[5]
3. *Nuc*: dit is een specifiek *S. aureus*-gen dat codeert voor het Staphylococcal nuclease-enzym. Met dit target worden zowel MRSA als meticilline-sensitieve *S. aureus* aangetoond.^[6]
4. Sample processing controle (SPC): een interne controle om te testen of er geen remming tijdens DNA-isolatie of PCR heeft plaatsgevonden.^[2]

Startmateriaal voor de BD MAX StaphSR assay bestaat uit e-swabs van keel, neus, perineum en eventueel wonden van MRSA-verdachte patiënten. De StaphSR assay begint met het kapotmaken van aanwezige bacteriecellen met behulp van lytische enzymen.^[2] Hierdoor komt de inhoud van de cel, inclusief DNA, vrij beschikbaar. Het DNA wordt aangetrokken door magnetische affiniteitsbeads. De beads met daaraan gebonden DNA ondergaan enkele wasstappen om overige celcomponenten en storende factoren te verwijderen. Vervolgens wordt het DNA losgemaakt van de beads met behulp van een neutralisatiebuffer. Het DNA-eluaat wordt overgebracht naar een BD Master Mix tube, waar de gevriesdroogde mastermix met primers en probes in zitten. Na oplossen van de mastermix wordt het mengsel overgebracht naar een BD MAX PCR Cartridge. Hierin vindt de amplificatie en detectie van boven-





genoemde targets plaats. Het systeem genereert zelf een uitslag. Samples zijn *S. aureus* positief als het *Nuc*-gen en de SPC gedetecteerd worden. Samples zijn MRSA-positief als zowel het *Nuc*-gen, een *mecA* of *mecC*-gen, de MREJ én de SPC gedetecteerd worden.

Het LMMI heeft de StaphSR kit gevalideerd als MRSA-sneltest. De StaphSR kit is daartoe vergeleken met de "gouden standaard" voor detectie van MRSA: de bacteriekweek. Onderstaande tabel laat het resultaat van deze validatie zien (tabel 1).

Tabel 1. Validatie van de BD MAX StaphSR assay (MRSA sneltest). In totaal zijn 131 samples getest, waarvan er 50 MRSA-positief en 81 MRSA-negatief gekweekt waren.

	MRSA kweek*		Totaal
	Positief	Negatief	
BD MAX MRSA			
Positief	43	1	44
Negatief	7	80	87
Totaal	50	81	131

*Keel n=40; Neus N=41; Perineum N=40; overig N=10

In totaal zijn 131 samples getest, waarvan 50 MRSA-positief gekweekt en 81 MRSA-negatief. Van de 50 MRSA-positieven, detecteerde de BD MAX StaphSR assay er 43 als positief. Dit geeft een sensitiviteit van 0,86 (43/50). Mogelijk was de hoeveelheid MRSA bij de 7 gemiste positieve samples te laag om te kunnen detecteren met deze sneltest. Van de 81 MRSA-negatieven detecteerde de BD MAX er één als positief. Dit geeft een specificiteit van 0,99 (80/81). De BD MAX StaphSR-kit kan dus gebruikt worden als sneltest voor het aantonen van MRSA-dragerschap, waarbij rekening gehouden moet worden dat een deel van de MRSA-positieven niet gedetecteerd wordt.

Open kanaal

De BD MAX heeft ook de mogelijkheid om zelf testen op te zetten in het open kanaal.^[1] Er kunnen zelfontworpen primers of PCR-reagentia van andere fabrikanten gebruikt worden. BD heeft zelf een aantal reagentia ontwikkeld die gecombineerd kunnen worden met eigen primers en probes. Zo zijn er extractiekits om DNA/RNA te isoleren uit verschillende materialen, of Master Mix kits die met eigen DNA-eluaat of primers gebruikt kunnen worden. Het open kanaal kan op vier manieren gebruikt worden: alleen DNA-extractie, alleen PCR, alleen een smeltcurve-analyse of een combinatie van deze processen.

Het LMMI heeft het gebruik van het open kanaal getest met een in-house multiplex PCR voor Carbapenemase-resistentiegenen. De ervaring hiermee is dat het wel mogelijk is om zelf een PCR voor de BD MAX op te zetten maar de technische gevoeligheid was lager dan de multiplex PCR met dezelfde targets zoals deze op de Qiasymphony/Rotorgenes wordt uitgevoerd. Bovendien blijkt dat het BD MAX systeem vooral ontworpen is voor het gebruik van commerciële kits van BD en dat daarom het gebruiksgemak van het open kanaal tegenvalt.

Bronnenlijst

1. **Becton, Dickinson and Company** (2015). BD MAX™ System. User's Manual. 8089570(03). Catalog Number 441916/441926
2. **Becton, Dickinson and Company** (2013). BD MAX™ StaphSR. Brochure. P0153(01). Catalog number 442999
3. **Boundy, S. et. al.** (2012). Characterization of the *Staphylococcus aureus* rRNA Methyltransferase Encoded by *orfX*, the Gene Containing Staphylococcal Chromosome Cassette *mec* (SSC*mec*) Insertion Site. *Journal of Biological Chemistry*, 288(1): 132-140
4. **Hiramatsu, K. et. al.** (2013). Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infection & Chemotherapy Journal*, 45(2): 117-136





5. **Shore, A. & Coleman, D.** (2013). Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insights. *International Journal of Medical Microbiology*, 303: 350-359
6. **Pichon, B. et. al.** (2012). Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of *nuc*, Pantone-Valentine leucocidin (PVL), *mecA* and homologue *mecA*_{LGA251}. *Journal of Antimicrobial Therapy*, 67: 2338-2341

Kopij voor onze nieuwsbrief!!!

WANTED

Heb je ideeën voor een artikel voor de inhoudelijke nieuwsbrief, wij ontvangen ze graag.

Laat de redactie niet alles alleen doen, de nieuwsbrief is van en voor ons allen!!

Deadline kwartaaleditie: **19 augustus 2016**

Graag mailen naar SecImm@elisabeth.nl

