

Instructions for use

MRSA/SA ELITe MGB® Kit

Reactivos para la PCR de ADN en tiempo real



REF M800351

UDI 08033891486556



HISTORIAL DE CAMBIOS

Rev.	Información del cambio	Fecha (dd/mm/aa)
10	Ampliación del uso del producto cuando se utiliza el instrumento ELITe BeGenius® (REF INT040) con matrices de hisopados nasales y de hemocultivos. Eliminación del protocolo de aplicación de ultrasonidos durante el paso de extracción Actualización de la sección «Símbolos» con el símbolo «Consultar las instrucciones de uso» Nuevo diseño de los gráficos y del contenido de las instrucciones de uso	27/03/25
09	Introducción de la nueva referencia del producto «ELITe InGenius Sonication tubes» (ref. INT032SON) para utilizarlo en combinación con el producto destinado a la aplicación de ultrasonidos a las muestras.	13/10/20
08	Correcciones formales.	06/02/19
00–07	Desarrollo de un nuevo producto con los cambios consiguientes	

NOTA!

La revisión de estas instrucciones de uso también es compatible con las versiones anteriores del kit.

INDICE

1 USO PREVISTO	4
2 EXPLICACIÓN DEL ENSAYO	4
3 PRINCIPIO DEL ENSAYO	5
4 DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO.....	5
5 MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO.....	5
6 MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO.....	5
7 OTROS PRODUCTOS NECESARIOS	6
8 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.....	7
9 MUESTRAS Y CONTROLES PARA el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius	9
10 PROCEDIMIENTO CON EL ELITe InGenius	11
11 PROCEDIMIENTO CON EL ELITe BeGenius	17
12 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO CON EL ELITe InGenius y el ELITe BeGenius.....	21
13 MUESTRAS Y CONTROLES PARA OTROS SISTEMAS	26
14 PROCEDIMIENTO CON OTROS SISTEMAS.....	29
15 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO CON OTROS SISTEMAS.....	34
16 BIBLIOGRAFÍA	39
17 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.....	39
18 PROBLEMAS Y SOLUCIONES	41
19 SÍMBOLOS.....	44
20 AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA.....	45
Appendix A QUICK START GUIDE.....	46

1 USO PREVISTO

El producto **MRSA/SA ELITE MGB® Kit** es un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* destinado al uso por parte de profesionales sanitarios como ensayo cualitativo de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real para la detección de ADN de *Staphylococcus aureus* (SA) y de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM, inclusive la cepa *mecC*), extraído de muestras clínicas.

El ensayo se ha validado con los instrumentos **ELITE InGenius®** y **ELITE BeGenius®**, que son sistemas automatizados e integrados para la extracción, la PCR en tiempo real y la interpretación de resultados utilizando muestras humanas de hisopados nasales y de hemocultivos.

El ensayo también se ha validado con el **7500 Real-Time PCR Instrument** utilizando muestras humanas de hisopados nasales y de hemocultivos.

El producto se utiliza como ayuda en la prevención y el control de infecciones por SARM en el ámbito sanitario y está concebido para ayudar a diagnosticar infecciones por SARM, y no para dar orientación sobre el tratamiento de tales infecciones ni para realizar un seguimiento de esos tratamientos. Además, un resultado negativo no descarta la posibilidad de que exista una colonización nasal por SARM/SA, por lo que es necesario realizar cultivos simultáneos a fin de recopilar microorganismos que permitan realizar una tipificación epidemiológica o llevar a cabo análisis de sensibilidad adicionales.

Los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta todas las observaciones clínicas y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

2 EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

Staphylococcus aureus es un patógeno oportunista que se transporta como microorganismo comensal en la piel y los orificios nasales de aproximadamente el 30 % de la población normal y puede causar una amplia variedad de enfermedades.

SA, y sobre todo SARM, suelen ser una de las principales causas de las infecciones hospitalarias y se asocian a un aumento de la morbilidad y de los costes. La aparición de infecciones extrahospitalarias por SARM exige una vigilancia activa de los pacientes ingresados en hospitales u otros centros de salud por SA y SARM con el fin de identificar a aquellos que pueden ser un reservorio de infección para otros pacientes.

El producto **MRSA/SA ELITE MGB Kit** es un ensayo triple de amplificación en tiempo real que se dirige a las regiones conservadoras de un **gen específico de *Staphylococcus aureus*** y permite identificar SA positivo para coagulasa.

El ensayo también se dirige al **gen *mecA***, inclusive la variante ***mecC***, también denominada **gen *mecC*** (Ito T. et al.), que causa resistencia a la meticilina, así como a otros antibióticos betalactámicos y a un Internal Control exógeno, para controlar la inhibición de la reacción y la integridad de los reactivos.

El gen específico de *Staphylococcus aureus* identifica de forma inequívoca SA positivo para coagulasa, mientras que los genes *mecA* identifican de forma inequívoca la resistencia a la meticilina.

La presencia de los dos marcadores a la misma cantidad relativa medida mediante una diferencia en el valor umbral del ciclo es un indicio de la existencia de SARM. En cambio, la existencia de cantidades relativas distintas o la presencia únicamente del marcador del gen específico de *Staphylococcus aureus* es un indicio de la existencia de SA.

Los ensayos basados en la amplificación en tiempo real de SARM/SA reducen considerablemente el tiempo de laboratorio comparado con los análisis de cultivos estándar, lo que mejora la eficacia del procedimiento. Los análisis actuales de detección de SARM mediante PCR en tiempo real se dirigen al lugar de inserción del *SCCmec* (un elemento genético móvil portador del gen *mecA*, denominado cromosoma de casete estafilocócico), así como al gen *mecA* o al gen *spa*.

El producto **MRSA/SA ELITE MGB Kit** se dirige a las regiones conservadoras de los marcadores genéticos de SARM y SA, lo que reduce a un mínimo los resultados falsos negativos debidos a la variabilidad natural del lugar de inserción natural del *SCCmec* y, además, también reduce a un mínimo los resultados falsos positivos debidos al problema de «casete vacío».

3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

Este es un ensayo cualitativo de PCR en tiempo real para la detección de ADN de SA y de SARM aislado de muestras y amplificado mediante el uso del reactivo de ensayo MRSA/SA PCR Mix, que contiene cebadores y sondas con la tecnología ELITe MGB Kit.

Las sondas del ELITe MGB Kit se activan cuando se hibridan con los productos de PCR relacionados. **ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius** controlan el aumento de fluorescencia y calculan los ciclos umbral (Ct) y las temperaturas de fusión (Tm).

En las sondas del ELITe MGB Kit, los fluoróforos se inactivan en el estado de espiral aleatoria («random-coiled») y monocatenario de la sonda. Los fluoróforos están activos en el dúplex de sonda/amplicón, pues el inhibidor se encuentra separado espacialmente del fluoróforo.

Cabe reseñar además que el fluoróforo no se escinde durante la PCR y puede utilizarse para el análisis de la disociación y para calcular la temperatura de fusión.

4 DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** incluye el reactivo de ensayo **MRSA/SA PCR Mix**, que es una mezcla PCR Mix optimizada y estabilizada que contiene los cebadores y las sondas específicos para:

- El gen específico de SA (específico para una región conservadora en el ***Staphylococcus aureus*** positivo para coagulasa), detectado en el canal **SA**; la sonda se estabiliza con la tecnología MGB, se inactiva mediante el Eclipse Dark Quencher® y se marca con el colorante AquaPhluor® 554 (AP554).
- Los genes **mecA** y **mecC** (específicos de las regiones conservadoras de los genes **mecA** y **mecCgenes** que causan resistencia a la meticilina y a otros antibióticos betalactámicos), detectados en el canal **MecA**; las sondas se estabilizan mediante la tecnología MGB, se inactivan con el Eclipse Dark Quencher® y se marcan con el colorante FAM.

El Internal Control (**IC**), específico para la secuencia artificial **IC2**, detectado en el canal **IC**; la sonda se estabiliza con la tecnología MGB, se inactiva mediante el Eclipse Dark Quencher y se marca con el colorante AquaPhluor 642 (AP642).

La mezcla **MRSA/SA PCR Mix** también contiene solución tampón, cloruro de magnesio, nucleótidos-trifosfatos, el fluoróforo AP593 (análogo de ROX o de Cy5) como referencia pasiva para la normalización de la fluorescencia, la enzima N-uracil glucosidasa (UNG) para inactivar la contaminación provocada por el producto de amplificación y la enzima ADN polimerasa con activación térmica («hot start»).

El producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** contiene suficientes reactivos para realizar **96 análisis** en el **ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius (24 análisis con cada probeta)**, o bien para realizar **100 análisis** en **otros sistema (25 análisis con cada probeta)**, cuando se utilizan 20 µL en cada reacción.

El producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** también puede utilizarse con instrumentos equivalentes.

5 MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Tabla 1

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de peligros
MRSA/SA PCR Mix ref. M800351	Mezcla de reactivos para la PCR en tiempo real Probeta con tapón blanco	4 × 540 µL	-

6 MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.

- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Agitador vórtex
- Centrifugadora de sobremesa (aproximadamente 5000 rpm).
- Centrifugadora de sobremesa (aproximadamente 13.000 rpm).
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosoles o puntas estériles de desplazamiento positivo (0,5–10 µL, 2–20 µL, 5–50 µL, 50–200 µL, 200–1000 µL).
- Probetas estériles de 2,0 mL con tapón roscado (Sarstedt, Alemania, ref. 72.694.005).
- Agua de calidad para biología molecular.
- Caldo de soja y triptona

7 OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

Este producto **no** incluye los reactivos para la extracción del ADN de la muestra, ni tampoco el Internal Control de extracción e inhibición, el Positive Control y el Negative Control de amplificación ni los consumibles..

Para la extracción automática de ácidos nucleicos, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados de las muestras, es necesario utilizar los siguientes productos:

Tabla 2

Instrumentos y software	Productos y reactivos
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA ref. INT030) ELITe InGenius Software versión 1.3.0.19 (o posterior) MRSA-SA ELITe_PC_200_100 o MRSA-SA ELITe_PC_200_50 , Assay Protocols (protocolos de ensayo) con parámetros para el análisis del Positive Control MRSA-SA ELITe_NC_200_100 o MRSA-SA ELITe_NC_200_50 , Assay Protocols (protocolos de ensayo) con parámetros para el análisis del Negative Control MRSA-SA ELITe_NS_200_50 , Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de muestras de hisopados nasales MRSA-SA ELITe_BC_200_100 , Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de las muestras de hemocultivos	ELITe InGenius SP200 (EG SpA, ref. INT032SP200) ELITe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, ref. INT032CS) ELITe InGeniusPCR Cassette (EG SpA, ref. INT035PCR), ELITe InGenius Waste Box (EG SpA, ref. F2102-000) 300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., ref. TF-350-L-R-S), solo con ELITe InGenius 1000 µL Filter Tips Tican (Tecan, Switzerland, ref. 30180118), solo con ELITe BeGenius CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE) MRSA-SA — ELITe Positive Control (EG SpA, ref. M800356) eNAT™ kit (Copan, ref. 608CS01R), eSwab Collection Kit (Copan, ref. 480CE),
ELITe BeGenius (EG SpA ref. INT040) ELITe BeGenius Software versión 2.2.1. (o posterior) MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_100 o MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_50 , Assay Protocols (protocolos de ensayo) con parámetros para el análisis del Positive Control MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_100 o MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_50 , Assay Protocols (protocolos de ensayo) con parámetros para el análisis del Negative Control MRSA-SA ELITe_Be_NS_200_50 , Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de muestras de hisopados nasales MRSA-SA ELITe_Be_BC_200_100 , Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de las muestras de hemocultivos	MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (Life Technologies, ref. 4346906) CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE) MRSA-SA — ELITe Positive Control (EG SpA, ref. M800356) NucliSENS easyMAG Reagents (bioMérieux SA, Ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135) NucliSENSeasyMAGStrip for Premix (bioMérieux SA, ref. 278303) bioHit Electronic Multichannel Pipettor (bioMérieux SA, ref. 280141) Filter tips for bioHit (bioMérieux SA, ref. 280146) BBL CultureSwab Plus Amies Gel without Charcoal swabs (Becton-Dickinson, ref. 220116)

8 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto está diseñado exclusivamente para uso *in vitro*.

8.1 Advertencias y precauciones generales

Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si fueran infecciosas. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. Evitar salpicaduras o pulverizaciones. Las probetas, las puntas y el resto de materiales que entran en contacto con las muestras biológicas deben tratarse con hipoclorito de sodio (lejía) al 3 % durante al menos 30 minutos, o bien procesarse en autoclave durante una hora a 121 °C antes de su eliminación.

Manipular y eliminar todos los reactivos y materiales utilizados para realizar el ensayo como si fueran infecciosos. Evitar el contacto directo con los reactivos. Evitar salpicaduras o pulverizaciones. Los residuos deben tratarse y eliminarse conforme a las normas de seguridad aplicables. El material desechable combustible debe incinerarse. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben neutralizarse antes de eliminarlos. Evitar que los reactivos de extracción entren en contacto con hipoclorito de sodio (lejía).

Utilizar ropa de protección y guantes adecuados y protegerse los ojos y la cara.

No pipetear ninguna solución con la boca.

No comer, beber, fumar ni aplicarse cosméticos en el área de trabajo.

Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.

Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos conforme a las normas vigentes.

Leer atentamente todas las instrucciones incluidas antes de realizar el ensayo.

Durante la realización del ensayo, seguir las instrucciones proporcionadas con el producto.

No utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada.

Utilizar únicamente los reactivos incluidos en el producto y los recomendados por el fabricante.

No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

8.2 Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular

Con el fin de evitar el riesgo de resultados incorrectos, sobre todo debido a la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o a la contaminación de estas con productos de la PCR, para los procedimientos de biología molecular se requiere personal debidamente formado y cualificado.

Cuando la sesión de amplificación se configura manualmente, es necesario disponer de áreas independientes para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación. No introducir nunca un producto de amplificación en el área asignada a la extracción/preparación de las reacciones de amplificación.

Cuando la sesión de amplificación se configura manualmente, es necesario disponer de batas de laboratorio, guantes y herramientas que se empleen exclusivamente para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación.

No llevar nunca batas de laboratorio, guantes ni herramientas del área asignada a la amplificación/detección de productos de amplificación al área asignada a la extracción/preparación de las reacciones de amplificación.

Es necesario disponer de batas, guantes e instrumentos específicos para las sesiones de trabajo.

Las muestras deben ser aptas y, en la medida de lo posible, estar destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben destinarse exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN.

Los reactivos deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. Las pipetas utilizadas para manipular los reactivos deben destinarse exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN.

Con el fin de evitar el riesgo de contaminación, los productos de extracción deben manipularse de manera que se reduzca al mínimo la dispersión hacia el entorno.

Los cartuchos PCR Cassette deben manipularse con cuidado y no deben abrirse nunca para evitar la dispersión del producto de PCR hacia el entorno, así como la contaminación de muestras y reactivos.

8.3 Advertencias y precauciones específicas para los componentes:

Tabla 3

Componente	Temperatura de almacenamiento	Uso a partir de la primera apertura	Ciclos de congelación y descongelación	Estabilidad con carga (ELITe InGenius y ELITe BeGenius)
MRSA/SA PCR Mix	-20 °C o menos (protegido de la luz)	un mes	máximo cinco	máximo 15 horas (5 sesiones de trabajo de 3 horas cada una)

9 MUESTRAS Y CONTROLES PARA el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius

9.1 Muestras

Este producto está concebido para utilizarlo en uno de los instrumentos **ELITe InGenius** o **ELITe BeGenius** con las siguientes muestras clínicas, identificadas y manipuladas conforme a las directrices para laboratorios y obtenidas, transportadas y conservadas en las condiciones siguientes:

Tabla 4

Muestra	Requisitos de obtención	Condiciones transporte/almacenamiento			
		de +16 °C a +26 °C (temperatura ambiente)	de +2 °C a +8 °C	-20 °C ± 10 °C	-70 °C ± 15 °C
Hisopado nasal	recogido con el eNAT™ kit		≤4 semanas	≤6 meses	-
Hisopado nasal	recogido con el eSwab Collection Kit	≤2 horas	≤48 horas	≤6 meses	-
Hemocultivo	-	≤24 horas	-	-	-

Antes de realizar el análisis, diluir la muestra de hemocultivo en agua ultrapura en una proporción 1:1000 (al menos 10 µL de muestras en 10 mL de agua ultrapura), mezclarla en un vórtex y verter 0,2 mL de las muestras diluidas en un «Extraction Tube» (tubo de extracción), en el caso del instrumento ELITe InGenius, o en una probeta Sarstedt de 2 mL, en el caso del instrumento ELITe BeGenius.

Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Para realizar el análisis de las muestras en el **ELITe InGenius** o el **ELITe BeGenius**, es necesario utilizar los siguientes Assay Protocols (protocolos de ensayo). Estos protocolos para diagnóstico *in vitro* se han validado específicamente con los productos ELITe MGB Kit y los instrumentos **ELITe InGenius** o **ELITe BeGenius** con las matrices indicadas.

Tabla 5 Assay Protocols (protocolos de ensayo) para el producto MRSA/SA ELITe MGB Kit

Muestra	Instrumento	Nombre del protocolo de ensayo	Informe	Características
Hisopado nasal	ELITe InGenius	MRSA-SA ELITe_NS_200_50	Positivo/ Negativo	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de elución de extracción: 50 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 10 µL
	ELITe BeGenius	MRSA-SA ELITe_Be_NS_200_50	Positivo/ Negativo	
Hemocultivo	ELITe InGenius	MRSA-SA ELITe_BC_200_100	Positivo/ Negativo	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de elución de extracción: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Volumen de PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 10 µL
	ELITe BeGenius	MRSA-SA ELITe_Be_BC_200_100	Positivo/ Negativo	

Para todos los protocolos, verter 200 µL de muestra en un «Extraction Tube» (tubo de extracción), en el caso del instrumento ELITe InGenius, o en una probeta Sarstedt de 2 mL, en el caso del instrumento ELITe BeGenius.

NOTA!

El pipeteado de las muestras en el **Extraction tube** (tubo de extracción) o en la **probeta Sarstedt de 2 mL** puede **desarrollar contaminación**. Así pues, utilizar pipetas apropiadas y seguir todas las recomendaciones indicadas en la sección «8 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES page 7».

Los ácidos nucleicos purificados pueden dejarse a temperatura ambiente durante 16 horas o conservarse a -20 °C o a una temperatura inferior durante un máximo de un mes.

Consultar el apartado «Sustancias potencialmente interferentes» en la sección «[12 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO CON EL ELITe InGenius y el ELITe BeGenius page 21](#)» para comprobar los datos relativos a tales sustancias.

Una alta cantidad de ADN genómico humano en el ADN extraído de la muestra puede inhibir la reacción de amplificación.

9.2 Controles de PCR

Los resultados del control de la PCR deben generarse y aprobarse para cada lote de reactivo de reactivo de PCR.

- Para el Positive Control, utilizar el producto **MRSA/SA - ELITe Positive Control** (no incluido con este kit) con los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **MRSA-SA ELITe_PC_200_50** o **MRSA-SA ELITe_PC_200_100** y **MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_50** o **MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_100**.
- Para el Negative Control, utilizar agua para biología molecular (no incluida con este kit) con los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **MRSA-SA ELITe_NC_200_50** o **MRSA-SA ELITe_NC_200_100** y **MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_50** o **MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_100**.

NOTA!

El **ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius** permiten generar y guardar la validación de los controles de PCR para cada lote de reactivos. Los resultados de los controles de PCR caducan **a los 15 días** y, transcurrido ese tiempo, es necesario volver a procesar el Positive Control y el Negative Control. Los controles de PCR deben volver a procesarse si se produce alguna de las siguientes circunstancias:

- Se utiliza un nuevo lote de reactivos.
- Los resultados del análisis de control de calidad (consultar el apartado siguiente) están fuera de las especificaciones.
- Se realiza una operación importante de servicio o mantenimiento en el **ELITe InGenius** o en el **ELITe BeGenius**.

9.3 Controles de calidad

Se recomienda verificar la extracción y el procedimiento de PCR. Se pueden utilizar muestras archivadas o material de referencia certificado. Deben realizarse controles externos de acuerdo con las disposiciones de los organismos de acreditación locales, estatales o federales, según proceda.

10 PROCEDIMIENTO CON EL ELITe InGenius

El procedimiento para utilizar el producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** con el **ELITe InGenius** comprende tres pasos:

Tabla 6

PASO 1	Verificación de la disponibilidad del sistema		
PASO 2	Configuración de la sesión	A) Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)	
		B) Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).	
		C) Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)	
PASO 3	Evaluación y aprobación de los resultados	1) Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control	
		1) Validación de los resultados de las muestras	
		3) Generación del informe de los resultados de la muestra	

10.1 PASO 1. Verificación de la disponibilidad del sistema

Antes iniciar la sesión, es necesario realizar las siguientes tareas:

- Encender el **ELITe InGenius** e iniciar sesión en el modo **«CLOSED»**.
- En el menú «Controls» (Controles) de la página «Home» (Inicio), verificar que los controles de PCR (**MRSA/SA - Positive Control, LGA251/SA Positive Control** y **MRSA/SA Negative Control**) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de **MRSA/SAPCR Mix** que va a utilizarse. Si no se dispone de controles de PCR válidos para el lote de **MRSA/SA PCR Mix**, procesar los controles de PCR tal como se describe en los apartados siguientes.
- Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz para configurar la sesión y utilizando los Assay Protocols (protocolos de ensayo) proporcionados por EG SpA (consultar la sección «»).
- Si el protocolo de ensayo deseado no está cargado en el sistema, contactar con el servicio de atención al cliente de ELITechGroup S.p.A. más cercano.

10.2 PASO 2. Configuración de la sesión

El producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** puede utilizarse con el **ELITe InGenius** para realizar las siguientes tareas:

- Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)
- Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
- Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

Todos los parámetros necesarios están incluidos en el protocolo de ensayo disponible en el instrumento y se cargan automáticamente al seleccionar el protocolo de ensayo.

NOTA!

El **ELITe InGenius** puede conectarse al «Laboratory Information System» (sistema de información de laboratorios, LIS), que permite descargar la información de la sesión. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

Antes de configurar una sesión:

Descongelar las probetas necesarias de **PCR Mix** a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 24 análisis en condiciones óptimas de uso (es decir, realizando al menos 2 análisis por sesión). Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.

NOTA!

Conservar **PCR Mix** en un lugar protegido de la luz mientras se descongele, pues este reactivo es fotosensible.

Para configurar uno de los tres tipos de sesión, realizar los pasos siguientes conforme a las instrucciones de la interfaz:

Tabla 7

	A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)	B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)	C. Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
1	Identificar las muestras y, en caso necesario, descongelarlas a temperatura ambiente. Verter 200 µL de muestra en un «Extraction Tube» (tubo de extracción) previamente etiquetado.	Descongelar las «Elution Tubes» (Tubos de elución) que contienen los ácidos nucleicos extraídos a temperatura ambiente. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.	Descongelar las probetas de Positive Control (MRSA/SA Positive Control y LGA251/SA Positive Control) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Cada probeta es suficiente para 4 reacciones.
2	Descongelar las probetas de CPE necesarias a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones.	No aplicable	Preparar el Negative Control vertiendo al menos 50 µL de agua para biología molecular en un «Elution Tube» (Tubo de elución), que se incluye en el producto ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).

Tabla 7 (continued)

	A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)	B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)	C. Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
4	Si se están procesando muestras de hisopados nasales, asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Eluate Volume» (Volumen del eluido extraído), a 50 µL. Si se están procesando muestras de hemocultivos, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Eluate Volume» (Volumen del eluido extraído), a 100 µL.	Si se están procesando muestras de hisopados nasales, asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Eluate Volume» (Volumen del eluido extraído), a 50 µL. Si se están procesando muestras de hemocultivos, asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Eluate Volume» (Volumen del eluido extraído), a 100 µL.	Aunque no se vaya a realizar la extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Eluate Volume» (Volumen del eluido extraído), a 50 µL (si se utilizan hisopados nasales) o a 100 µL (si se utilizan hemocultivos).
5	Para cada muestra, asignar un carril e introducir el «SampleID» o SID (ID de la muestra), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras.	Para cada muestra, asignar un carril e introducir el «SampleID» o SID (ID de la muestra), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras.	No aplicable
6	Seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	Seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	Seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles». Introducir el número de lote y la fecha de caducidad del Positive Control y del agua para biología molecular.
7	Asegurarse de que el protocolo que se muestra en el área «Protocol» (Protocolo) sea «Extract + PCR» (Extracción + PCR).	Seleccionar «PCR Only» en la columna «Protocol» (Protocolo).	En la columna «Protocol» (Protocolo), asegurarse de que esté seleccionado «PCR Only» (Solo PCR).
8	En la columna «Sample Position» (Posición de la muestra), seleccionar la posición de carga «Extraction Tube» (Tubo de extracción) para la muestra.	Asegurarse de que la posición de carga de la muestra de la columna «Sample Position» (Position de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior])	Asegurarse de que la posición de carga de la muestra de la columna «Sample Position» (Position de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior])
9	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
10	Cargar el CPE y la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (lista de carga) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.	Cargar la PCR Mix en el «Inventory Block» (bloque de inventario) en función de la «Load List» (lista de carga) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.	Cargar la PCR Mix en el «Inventory Block» (bloque de inventario) en función de la «Load List» (lista de carga) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.
11	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
12	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) del «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) del «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) del «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.

Tabla 7 (continued)

	A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)	B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)	C. Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
13	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
14	Cargar el PCR Cassette, los cartuchos de extracción ELITe InGenius SP 200, así como todos los consumibles necesarios y las muestras que deben extraerse.	Cargar el PCR Cassette y «Elution Tube» (Tubo de elución) con las muestras extraídas.	Cargar el PCR Cassette y las probetas de Positive Control y de Negative Control.
15	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
16	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.
17	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

Una vez finalizada la sesión, el **ELITe InGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda de la muestra extraída en la **«Elution Tube»** (Tubo de elución) debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a -20 ± 10 °C durante un máximo de un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la **PCR Mix** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C o a una temperatura inferior, o bien mantenerse en el bloque refrigerado durante un máximo de 5 sesiones de trabajo de 3 horas cada una. Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda del **Positive Control** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C o a una temperatura inferior. Evitar derramar el **Positive Control**. La parte que queda del **Negative Control** debe desecharse.

NOTA!

El producto **Positive Control** puede utilizarse para 4 sesiones independientes de 3 horas cada una.

NOTA!

Al finalizar la sesión, el **PCR Cassette** y el resto de consumibles deben eliminarse siguiendo las normativas gubernamentales y medioambientales. Evitar derramar los productos de reacción.

10.3 PASO 3. Evaluación y aprobación de los resultados

El **ELITe InGenius** supervisa las señales de fluorescencia de la diana y del Internal Control para cada reacción y aplica automáticamente los parámetros del Assay Protocol (protocolo de ensayo) para generar las curvas de PCR que, después, se convierten en resultados.

Al finalizar la sesión, aparece automáticamente la pantalla **«Results Display»**, En esta pantalla se muestran los resultados y la información de la sesión. Desde esta pantalla, es posible aprobar dichos resultados, así como imprimir o guardar los informes (**«Sample Report»** o **«Track Report»**). Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

NOTA!

El **ELITe InGenius** puede conectarse al «Laboratory Information System» (sistema de información de laboratorios, LIS), que permite cargar los resultados de la sesión en el centro de datos del laboratorio. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

El instrumento **ELITe InGenius** genera los resultados con el producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** mediante el siguiente procedimiento:

1. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control.
2. Validación de los resultados de las muestras.
3. Generación del informe de los resultados de la muestra.

10.3.1 Validación de los resultados de la amplificación del Positive Control y del Negative Control

El **ELITe InGenius Software** interpreta los resultados de la PCR para la diana de las reacciones del Positive Control y del Negative Control utilizando los parámetros de los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **ELITe_PC** y **ELITe_NC**. Los valores de Ct resultantes se utilizan para verificar el sistema (lote de reactivos e instrumento).

Los resultados del Positive Control y del Negative Control, específicos para el lote de reactivos de PCR, se guardan en la base de datos («Calibration»), por lo que el personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst») puede verlas siguiendo las instrucciones de la interfaz.

Los resultados del Positive Control y del Negative Control caducan **a los 15 días**.

El **ELITe InGenius Software** utiliza los resultados de la amplificación del Positive Control y del Negative Control para configurar los gráficos de control («Control Charts»), lo que permite controlar el rendimiento del paso de amplificación. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

NOTA!

Si el resultado del Positive Control o del Negative Control no cumple los criterios de aceptación, en la pantalla «Controls» (Controles) aparece el mensaje «Failed» (Error). En este caso, los resultados no pueden aprobarse y es necesario repetir las reacciones del Positive Control o del Negative Control.

NOTA!

Si el resultado del Positive Control o del Negative Control no es válido y se han incluido muestras en la misma sesión, las muestras pueden aprobarse, pero los resultados no se validan.. En este caso, es necesario repetir el procesamiento del control o los controles que han producido un error y el de todas las muestras.

10.3.2 Validación de los resultados de la muestra

El **ELITe InGenius Software** interpreta los resultados de la PCR (canales **mecA** y **SA**) y del Internal Control (canal **IC**) con los parámetros de los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **MRSA-SA ELITe_NS_200_50** y **MRSA-SA ELITe_BC_200_100**.

Los resultados se muestran en la pantalla «Results Display» (Presentación de resultados).

Los resultados de la muestra pueden aprobarse cuando se cumplen las dos condiciones que se indican en la tabla siguiente.

Tabla 8

1) Positive Control	Estado
MRSA/SA Positive Control	APROBADO
LGA251/SA Positive Control	APROBADO

Tabla 8 (continued)

2) Negative Control	Estado
MRSA/SA - Negative Control	APROBADO

El **ELITE InGenius Software** interpreta automáticamente los resultados de las muestras utilizando los parámetros del Assay Protocol (protocolo de ensayo). En la tabla siguiente se muestran los posibles mensajes de los resultados.

Para cada muestra el sistema indica una combinación de los mensajes siguientes y especifica si se ha detectado o no el ADN de los patógenos.

Tabla 9

Resultado de la sesión de la muestra	Interpretación
MRSA:dected. (SARM: Detectado)	Se ha detectado ADN de SARM en la muestra.
MRSA/SA:not detected or below the LoD (SARM/SA: no detectado o por debajo del límite de detección)	No se ha detectado ADN de SARM/SA en la muestra. Se trata de una muestra negativa válida o la concentración de la diana se encuentra por debajo del límite de detección del ensayo.
MRSA:not detected or below LoD, SA detected (SARM no detectado o por debajo del límite de detección, SA detectado)	No se ha detectado ADN de MRSA en la muestra. La muestra es negativa para esta diana o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo. Se ha detectado SA.
Invalid-Retest Sample (No válido-Volver a probar muestra)	Resultado no válido del ensayo debido a un fallo en el Internal Control (extracción incorrecta o arrastre de inhibidores). Es necesario repetir la prueba.

Las muestras que se indican como: «MRSA/SA:not detected or below the LoD» (SARM/SA: no detectado o por debajo del límite de detección) son aptas para el análisis, pero no ha sido posible detectar ADN de SARM/A. En este caso, no se puede descartar que el ADN de SARM/SA esté presente en una concentración inferior al límite de detección del ensayo (consultar la sección «[12 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO CON EL ELITE InGenius y el ELITE BeGenius page 21](#)»).

Las muestras que se notifican como «Invalid-Retest Sample» (No válido. Volver a probar muestra) indican que el ADN del Internal Control no ha podido detectarse correctamente, probablemente debido a problemas en los pasos de recogida de la muestra, extracción o PCR (p. ej., obtención incorrecta de la muestra, degradación o pérdida de ADN durante la extracción o presencia de inhibidores en el eluido), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos. Si queda un volumen de eluido suficiente, dicho eluido puede volver a analizarse con una sesión de amplificación en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Si se produce un segundo resultado no válido, la muestra debe volver a analizarse a partir del paso de extracción de una nueva muestra utilizando el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR); consultar la sección «[18 PROBLEMAS Y SOLUCIONES page 41](#)».

NOTA!

Los resultados obtenidos con este ensayo deben interpretarse teniendo en cuenta todas las observaciones clínicas y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Los resultados de la muestra se guardan en la base de datos y, si son válidos, pueden ser aprobados en la pantalla «Results Display» (Presentación de resultados) por personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst»), siguiendo las instrucciones de la interfaz. La pantalla «Results Display» (Presentación de resultados) permite imprimir y guardar los resultados de la sesión de la muestra como «Sample Report» y como «Track Report».

10.3.3 Generación del informe de los resultados de la muestra

Los resultados de la muestra se guardan en la base de datos y los informes pueden exportarse como «Sample Report» y como «Track Report».

El «Sample Report» muestra los detalles de los resultados ordenados por la muestra seleccionada (SID).

El «Track Report» muestra los detalles de los resultados ordenados por el carril seleccionado.

El personal autorizado puede imprimir y firmar el «Sample Report» y el «Track Report».

11 PROCEDIMIENTO CON EL ELITe BeGenius

El procedimiento para utilizar el producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** con el **ELITe BeGenius** comprende tres pasos:

Tabla 10

PASO 1	Verificación de la disponibilidad del sistema	
PASO 2	Configuración de la sesión	A) Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)
		B) Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).
		C) Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).
PASO 3	Evaluación y aprobación de los resultados	1) Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control
		2) Validación de los resultados de las muestras
		3) Generación del informe de los resultados de la muestra

11.1 PASO 1. Verificación de la disponibilidad del sistema

Antes iniciar la sesión, es necesario realizar las siguientes tareas:

- Encender el **ELITe BeGenius** e iniciar sesión en el modo «CLOSED».
- En el menú «Controls» (Controles) de la página «Home» (Inicio), verificar que los controles de PCR (**MRSA/SA - Positive Control**, **LGA251/SA Positive Control** y **MRSA/SA Negative Control**) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de **MRSA/SAPCR Mix** que va a utilizarse. Si no se dispone de controles de PCR válidos para el lote de **MRSA/SA PCR Mix**, procesar los controles de PCR tal como se describe en los apartados siguientes.
- Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz para configurar la sesión y utilizando los Assay Protocols (protocolos de ensayo) proporcionados por EG SpA (consultar la sección «»).

Si el Assay Protocol (protocolo de ensayo) deseado no está cargado en el sistema, contactar con el servicio de atención al cliente de ELITechGroup más cercano.

11.2 PASO 2. Configuración de la sesión

El producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** puede utilizarse con el instrumento **ELITe BeGenius** para realizar las siguientes tareas:

- A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)
- B. Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
- C. Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

Todos los parámetros necesarios están incluidos en los Assay Protocols (protocolos de ensayo) disponibles en el instrumento y se cargan automáticamente al seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo).

NOTA!

El **ELITe BeGenius** puede conectarse al «Laboratory Information System» (sistema de información de laboratorios, LIS), que permite descargar la información de la sesión. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

Antes de configurar una sesión:

Descongelar las probetas necesarias de **PCR Mix** a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 24 análisis en condiciones óptimas de uso (es decir, realizando al menos 2 análisis por sesión). Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.

NOTA!

Conservar **PCR Mix** en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

Para configurar uno de los tres tipos de sesión, realizar los pasos siguientes conforme a las instrucciones de la interfaz:

Tabla 11

	A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)	B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)	C. Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
1	Identificar las muestras y, en caso necesario, descongelar a temperatura ambiente. Verter 200 µL de muestra en una probeta Sarstedt de 2 mL previamente etiquetada.	En caso necesario, descongelar los «Elution Tubes» (tubos de elución) que contienen los ácidos nucleicos extraídos a temperatura ambiente. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.	Descongelar las probetas de Positive Control (MRSA/SA Positive Control y LGA251/SA Positive Control) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 4 reacciones. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.
2	Descongelar las probetas de CPE necesarias a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones.	No aplicable	Preparar el Negative Control vertiendo al menos 50 µL de agua para biología molecular en un «Elution Tube» (Tubde elución) que se incluye con el producto ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).
4	Extraer todas las gradillas de la «Cooler Unit» y colocarlas en la mesa de preparación.	Extraer las racks de los «Lanes» 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la «Cooler Unit» y colocarlas en la mesa de preparación.	Extraer las racks de los «Lanes» 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la «Cooler Unit» y colocarlas en la mesa de preparación.
5	Seleccionar el «Run Mode»: «Extract + PCR» (Extracción + PCR) .	Seleccionar el «Run Mode»: «PCR Only» (Solo PCR) .	Seleccionar el «Run Mode»: «PCR Only» (Solo PCR) .
6	Cargar las muestras en la «Sample Rack» (rack de muestras). Cuando se cargan probetas secundarias «2 mL Tubes», utilizar los adaptadores azules para la «Sample Rack» (rack de muestras).	Cargar las muestras en la «Elution Rack» (rejilla de elución).	Cargar las probetas de Positive Control y de Negative Control en la «Elution Rack» (rejilla de elución).

Tabla 11 (continued)

	A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)	B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)	C. Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
7	Insertar la «Sample Rack» (rack de muestras) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 5 (L5). En caso necesario, insertar el «SID» (ID de la muestra) para posición utilizada (si las probetas secundarias están cargadas, marchar la probeta de 2 mL («2 mL Tube»). Si las probetas secundarias no tienen códigos de barras, introducir manualmente el ID de las muestras.	Insertar la «Elution Rack» (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). En caso necesario, para cada «Position» (Posición), introducir el «SID» (ID de la muestra), la «Sample matrix» (matriz de la muestra), el «Extraction Kit» (kit de extracción) y el «Extracted Eluate Volume» (volumen de elución extraído).	Insertar la «Elution Rack» (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). En caso necesario, para cada «Position» introducir el «Reagent name» (nombre del reactivo), el «S/N» (número de serie) el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).
8	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
9	Si se están procesando muestras de hisopados nasales, asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Eluate Volume» (Volumen del eluido extraído), a 50 µL. Si se están procesando muestras de hemocultivos, asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Eluate Volume» (Volumen del eluido extraído), a 100 µL.	Si se están procesando muestras de hisopados nasales, asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Eluate Volume» (Volumen del eluido extraído), a 50 µL. Si se están procesando muestras de hemocultivos, asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Eluate Volume» (Volumen del eluido extraído), a 100 µL.	Aunque no se vaya a realizar la extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen del eluido extraído), a 50 µL (si se utilizan hisopados nasales) o a 100 µL (si se utilizan hemocultivos).
10	Seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	Seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	Seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».
11	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
	NOTA!		-
	Nota: si se procesan más de 12 muestras, repetir el procedimiento a partir del punto 6.		
12	Cargar las «Elution Tube» (Tubos de elución) en la «Elution Rack» (rejilla de elución); las probetas de elución pueden etiquetarse con un código de barras para mejorar la rastreabilidad.	No aplicable	No aplicable
13	Insertar la «Elution Rack» (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). Si se procesan más de 12 muestras, repetir el procedimiento utilizando el «Lane 2» (L2).	No aplicable	No aplicable

Tabla 11 (continued)

	A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)	B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)	C. Sesión del Positive Control y del Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
14	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	No aplicable	No aplicable
15	Cargar el CPE y la PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).	Cargar la PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).	Cargar la PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).
16	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) en el Lane 2 (L2) de la «Cooler Unit» o, si está disponible, en el Lane 1 (L1). En caso necesario, para cada reactivo de PCR Mix o cada CPE, llenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) en el Lane 2 (L2) de la «Cooler Unit» o, si está disponible, en el Lane 1 (L1). En caso necesario, para cada PCR Mix o cada CPE, llenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) en el Lane 2 (L2) de la «Cooler Unit» o, si está disponible, en el Lane 1 (L1). En caso necesario, para cada PCR Mix o cada CPE, llenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).
17	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
18	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
19	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
20	Cargar la «PCR Rack» (gradilla de PCR) con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario).	Cargar la «PCR Rack» (gradilla de PCR) con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario).	Cargar la «PCR Rack» (gradilla de PCR) con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario).
21	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
22	Cargar la «Extraction Rack» (gradilla de extracción) con los cartuchos de extracción «ELITe InGenius SP 200» y los consumibles de extracción necesarios.	No aplicable	No aplicable
23	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.
24	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

Una vez finalizada la sesión, el **ELITe BeGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

NOTA!

al finalizar la sesión, la parte que queda de la muestra extraída en el «**Elution Tube**» (Tubo de elución) debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a $-20 \pm 10^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de un mes. Evitar cualquier derrame de la muestra extraída.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la **PCR Mix** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C o a una temperatura inferior, o bien mantenerse en el bloque refrigerado durante un máximo de 5 sesiones de trabajo de 3 horas cada una. Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda del **Positive Control** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C o a una temperatura inferior. Evitar derramar el Positive Control. La parte que queda del **Negative Control** debe eliminarse.

NOTA!

El producto **Positive Control** puede utilizarse para 4 sesiones independientes de 3 horas cada una.

NOTA!

Al finalizar la sesión, el **PCR Cassette** y el resto de consumibles deben eliminarse siguiendo las normativas gubernamentales y medioambientales. Evitar derramar los productos de reacción.

11.3 PASO 3. Evaluación y aprobación de los resultados

El **ELITe BeGenius** supervisa las señales de fluorescencia de la diana y del Internal Control para cada reacción y aplica automáticamente los parámetros del Assay Protocol (protocolo de ensayo) para generar las curvas de PCR que, después, se convierten en resultados.

Al finalizar la sesión, aparece automáticamente la pantalla «Results Display», En esta pantalla se muestran los resultados y la información de la sesión. Desde esta pantalla, es posible aprobar dichos resultados, así como imprimir o guardar los informes («Sample Report» o «Track Report»). Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

NOTA!

El **ELITe BeGenius** puede conectarse al «Laboratory Information System» (sistema de información de laboratorios, LIS), que permite cargar los resultados de la sesión en el centro de datos del laboratorio. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

El instrumento **ELITe BeGenius** genera los resultados con el producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** mediante el siguiente procedimiento:

1. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control.
2. Validación de los resultados de las muestras.
3. Generación del informe de los resultados de la muestra.

NOTA!

Consultar el mismo apartado del **procedimiento con el ELITe InGenius** para obtener más información.

12 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO CON EL ELITe InGenius y el ELITe BeGenius

12.1 Sensibilidad analítica: Límite de detección

La sensibilidad analítica de este ensayo, como límite de detección (LoD) de la amplificación de ADN, permite detectar la presencia de unas 20 copias en 10 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

El límite de detección de este ensayo se analizó utilizando ADN plasmídico que contenía los productos de amplificación en una concentración inicial medida con un espectrofotómetro. Los ADN plasmídicos se diluyeron a una concentración de aproximadamente 20 copias/10 µL en presencia de 40.000 copias del Internal Control (IC) por cada 10 µL. Estas muestras se analizaron en el ELITe InGenius con 18 duplicados realizando la amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. en dos instrumentos distintos.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 12

Muestras	N	positivas	negativas	mecA Ct medio	SA Ct medio
20 copias de ADN plasmídico de SARM/SA + 40.000 copias del Internal Control (IC)	18	17	1	35,04	34,43
20 copias de ADN plasmídico de LGA251/SA + 40.000 copias del Internal Control	18	18	0	34,75	34,12

El valor teórico para el LoD se confirmó en el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius, analizando 20 duplicados del plásmido SARM/SA y 20 duplicados del plásmido LGA251/SA a la concentración declarada (20 copias/reacción).

El límite de detección del método se verificó en el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius, analizando muestras de hisopados nasales recogidos en eSwab, muestras de hisopados nasales recogidos en eNat y muestras de hemocultivos, que se enriquecieron con MRSA/SA - ELITe Positive Control (que contenía tanto el plásmido MRSA/SA como el plásmido LGA251/SA) a una concentración de 1000 copias/mL para las muestras de hisopados nasales y de 2000 copias/mL para las de hemocultivos.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 13 Límite de detección (copias/mL) para muestras de hisopados nasales y de hemocultivos en el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius

Muestra	LoD (copias/mL)
Hisopado nasal	1000
Hemocultivo	2000

Los resultados obtenidos confirmaron la concentración declarada para la diana de SARM/SA, tanto en el ELITe InGenius como en el ELITe BeGenius.

12.2 Sensibilidad analítica: reproducibilidad con material de referencia certificado

La sensibilidad analítica del ensayo, como reproducibilidad del valor de un material de referencia calibrado, se evaluó utilizando como material de referencia el producto «QCMD 2014 Methicillin Resistant S. aureus EQA Panel» (Qnistics Ltd, Reino Unido), un panel de diluciones de SARM/SA dentro de la concentración límite. Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITe InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 14 Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITe InGenius

Muestra	Contenido de la muestra	Resultado esperado	Resultado real
MRSADNA14-01	MRSA N315	MRSA Detected (SARM detectado)	MRSA Detected (SARM detectado)
MRSADNA14-02	MSSA ATCC 29213	Negativo para SARM	Negativo para SARM

Tabla 14 Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITe InGenius (continued)

MRSADNA14-03	MSSA 29213 + MRCoNS 634	Negativo para SARM	Negativo para SARM
MRSADNA14-04	E. coli ATCC 35218	Negativo para SARM	Negativo para SARM
MRSADNA14-05	MRSA N315	SARM detectado con frecuencia	MRSA Detected (SARM detectado)
MRSADNA14-06	MHB solo	Negativo para SARM	Negativo para SARM
MRSADNA14-07	MRSA N315	SARM detectado con poca frecuencia	MRSA Detected (SARM detectado)
MRSADNA14-08	SARM mecC	SARM detectado con poca frecuencia	MRSA Detected (SARM detectado)
MRSADNA14-09	MRCoNS 634	Negativo para SARM	Negativo para SARM
MRSADNA14-10	MRSA ST398	MRSA Detected (SARM detectado)	MRSA Detected (SARM detectado)
MRSADNA14-11	MRSA N315	SARM detectado con frecuencia	MRSA Detected (SARM detectado)
MRSADNA14-12	MRSA N315	MRSA Detected (SARM detectado)	MRSA Detected (SARM detectado)

Todas las muestras se detectaron correctamente.

La sensibilidad analítica del ensayo, como reproducibilidad del valor de un material de referencia calibrado, se evaluó utilizando como material de referencia el producto «NATtrol™ MRSA/SA Panel» (Zeptometrix, EE. UU.), un panel de diluciones de *S. aureus* o *S. epidermidis*. Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITe InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 15 Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITe InGenius

Muestra	Resultado esperado	Resultado real
<i>S. aureus</i> _MRSA, cepa extrahospitalaria	Positivo para SARM	MRSA Detected (SARM detectado)
<i>S. aureus</i> _MRSA, cepa hospitalaria	Positivo para SARM	MRSA Detected (SARM detectado)
<i>S. aureus</i> _MSSA	Positivo para SASM	SASM detectado
<i>S. aureus</i> _MSSA, cartucho vacío	Positivo para SASM	SASM detectado
<i>S. epidermidis</i> _MSSE HER 1292	Negativas	Negativas

Todas las muestras se detectaron correctamente.

12.3 Repetibilidad

La repetibilidad del ensayo se evaluó en los instrumentos **ELITe InGenius** y **ELITe BeGenius** analizando un panel de muestras de hisopados nasales recogidos en eSwab, inclusive una muestra negativa y muestras positivas enriquecidas con MRSA/SA - ELITe Positive Control.

En las tablas siguientes se incluye un ejemplo de los resultados de la repetibilidad dentro de las sesiones (en un día).

Tabla 16 Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITe InGenius

Muestra	N	Diana de mecA			Diana de SA			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Negativas	8	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	8	33,10	0,24	0,73	32,89	0,31	0,93	100 %
10×LoD	8	31,14	0,09	0,28	30,96	0,17	0,54	100 %

Tabla 17 Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITe BeGenius

Muestra	N	Diana de mecA			Diana de SA			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Negativas	8	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	8	32,55	0,29	0,90	31,73	0,29	0,90	100 %
10×LoD	8	31,01	0,23	0,75	30,17	0,31	1,03	100 %

En las tablas siguientes se incluye un ejemplo de los resultados de la repetibilidad entre sesiones (en dos días).

Tabla 18 Repetibilidad entre sesiones con el ELITe InGenius

Muestra	N	Diana de mecA			Diana de SA			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Negativas	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	16	33,24	0,37	1,10	32,95	0,40	1,22	100 %
10×LoD	16	31,51	0,69	2,20	31,38	0,74	2,37	100 %

Tabla 19 Repetibilidad entre sesiones con el ELITe BeGenius

Muestra	N	Diana de mecA			Diana de SA			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Negativas	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	16	32,69	0,36	1,10	31,86	0,34	1,07	100 %
10×LoD	16	30,90	0,29	0,94	30,11	0,30	1,01	100 %

En la prueba de repetibilidad, el producto MRSA/SA ELITe MGB Kit detectó todas las muestras tal como se esperaba y presentó una variación máxima de los valores de Ct de la diana como un %CV inferior al 5 %.

12.4 Reproducibilidad

La reproducibilidad del ensayo se evaluó en los instrumentos **ELITe InGenius** y **ELITe BeGenius** analizando un panel de muestras de hisopados nasales recogidos en eSwab, inclusive una muestra negativa y muestras positivas enriquecidas con MRSA/SA - ELITe Positive Control.

En las tablas siguientes se incluye un ejemplo de la reproducibilidad entre lotes (en dos lotes).

Tabla 20 Reproducibilidad entre lotes con el ELITe InGenius

Muestra	N	Diana de mecA			Diana de SA			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Negativas	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	16	33,37	0,34	1,01	33,17	0,42	1,27	100 %
10×LoD	16	31,58	0,67	2,11	31,61	0,64	2,01	100 %

Tabla 21 Reproducibilidad entre lotes con el ELITe BeGenius

Muestra	N	Diana de mecA			Diana de SA			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Negativas	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	16	32,72	0,30	0,92	31,94	0,33	1,04	100 %
10×LoD	16	31,01	0,21	0,67	30,25	0,25	0,83	100 %

En las tablas siguientes se incluye un ejemplo de la reproducibilidad entre instrumentos (en dos instrumentos).

Tabla 22 Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITe InGenius

Muestra	N	Diana de mecA			Diana de SA			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Negativas	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	16	32,94	0,47	1,44	33,04	0,39	1,18	100 %
10×LoD	16	30,97	0,38	1,23	31,09	0,43	1,37	100 %

Tabla 23 Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITe BeGenius

Muestra	N	Diana de mecA			Diana de SA			% de concordancia
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	
Negativas	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3×LoD	16	32,83	0,21	0,65	32,18	0,26	0,82	100 %
10×LoD	16	30,92	0,25	0,81	30,32	0,20	0,68	100 %

En la prueba de reproducibilidad, el producto MRSA/SA ELITe MGB Kit detectó todas las muestras tal como se esperaba y presentó una variación máxima de los valores de Ct de la diana como un %CV inferior al 5 %.

12.5 Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras negativas, se evaluó en el **ELITe InGenius** analizando muestras clínicas de hisopados nasales y de hemocultivos negativos para SARM/SA.

Como el **ELITe BeGenius** presenta un rendimiento analítico equivalente al del **ELITe InGenius**, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Así pues, la especificidad diagnóstica del ensayo obtenida con el **ELITe InGenius** también es aplicable al **ELITe BeGenius**.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 24

Muestras	N	positivas	negativas	% de especificidad diagnóstica
Muestras de hisopados nasales negativas para ADN de SARM/SA	48	0	48	100
Muestras de hemocultivo negativas para ADN de SARM/SA	34	0	34	100

El valor de corte para el Ct del IC se estableció a 29, tanto para las muestras de hisopados nasales como para las de hemocultivos, cuando se analizaron con el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius.

12.6 Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó en el **ELITe InGenius**, analizando muestras clínicas de hisopados nasales, positivas para SARM o SASM, o enriquecidas con ADN de SARM añadiendo MRSA BAA-1556 (ATCC) a un título de 100.000 ufc/mL, así como muestras de hemocultivos positivas para SARM y SASM o enriquecidas con aislados de SARM, sobre todo debido a la dificultad de encontrar un número suficiente de muestras clínicas positivas para algunos genes diana específicos de SARM.

Como el **ELITe BeGenius** tiene un rendimiento analítico equivalente al del **ELITe InGenius**, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Por lo tanto, la sensibilidad diagnóstica del ensayo obtenida con el **ELITe InGenius** también es aplicable al **ELITe BeGenius**.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 25

Muestras	N	positivas	negativas	% de sensibilidad diagnóstica
Muestras de hisopados nasales positivas para ADN de SASM	60	56	4	93
Muestras de hisopados nasales positivas para ADN de SARM	41	40	1	98
Muestras de hemocultivo positivas para ADN de SASM	39	39	0	100
Muestras de hemocultivo positivas para ADN de SARM	31	31	0	100

13 MUESTRAS Y CONTROLES PARA OTROS SISTEMAS

13.1 Muestras

Este producto debe utilizarse con **ADN extraído** de las siguientes muestras clínicas: hisopados nasales.

Las muestras de hisopados nasales concebidas para la extracción de ADN deben recogerse con el producto «BBL Culture Swab Plus Amies Gel» sin hisopados de carbón (Becton-Dickinson), así como identificarse de acuerdo con las directrices para laboratorios.

Las muestras de hisopados nasales deben transportarse y conservarse a una temperatura comprendida entre +18 °C y +25 °C durante un máximo de un día, o bien conservarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C durante un máximo de siete días. Las muestras de hisopados nasales se sumergieron 1 mL de caldo de soja y triptona (TSB) y se mezclaron en un vórtex durante 10 segundos antes de comenzar el procedimiento de extracción.

NOTA!

Si la extracción del ADN se realiza con el sistema **NucliSENS® easyMAG®**, utilizar la configuración siguiente.

Definir los parámetros de extracción tal como se indica a continuación:

- Matriz: otra
- Protocolo: genérico 2.0.1
- Volumen (mL): 1,0 mL
- Eluido (μ L): 50 μ L
- Tipo: primaria

Verter 1 mL de cada muestra de caldo de soja y triptona en el recipiente de muestras desechable de 8 pocillos, tal como se establece en la lista de trabajo del instrumento y, a continuación, distribuir la solución tampón de lisis. Durante los 10 minutos de incubación, preparar la suspensión de sílice magnético para 8 muestras mezclando 550 μ L de **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**, 545 μ L de **agua para biología molecular** y 5 μ L de **CPE**. Para cada muestra, utilizar la pipeta BioHit para distribuir 125 μ L de la suspensión de sílice magnético en el producto **NucliSENS easyMAG Strip for Premix**. Utilizar la pipeta BioHit para verter 100 μ L de la suspensión de sílice magnético en cada muestra en el recipiente de muestras desechable de 8 pocillos, mezclar bien pipeteando arriba y abajo tres veces y, después, iniciar el procedimiento de extracción.

13.2 Sustancias interferentes

Entre las sustancias que pueden interferir en la detección de SA y SARM con el producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** y, en consecuencia, generar posibles resultados no válidos, cabe citar propilenglicol y cantidades excesivas de secreciones o mucosidad nasales.

Se ha demostrado que, a excepción del propilenglicol, las sustancias exógenas enumeradas a continuación, que son componentes de descongestionantes y productos utilizados para aliviar la sequedad o la irritación nasales, no interfieren en la detección de SARM/SA cuando se utiliza el producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit**. Se ha demostrado que la presencia de sangre humana en la muestra no interfiere en la detección de SARM/SA cuando el producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** se utiliza en combinación con el **NucliSENS® easyMAG®**.

Tabla 26

Sustancia potencialmente interferente (tipo)	Ingrediente activo	¿Interfiere?
Mucina, glándula submandibular bovina	Proteína mucina purificada	No
Sangre (humana)	Hemoglobina	No
Aerosoles o gotas nasales	Fenilefrina	No
	Oximetazolina	No
	Cloruro de sodio con conservantes	No
	Cloruro de benzalconio	No
	Fosfato de sodio	No
	Fenilcarbinol	No
	Propilenglicol	Sí
	Sorbitol, alcohol bencílico	No
	Edetato disódico, hipromelosa	No
	Ácido fosfórico	No

Tabla 26 (continued)

Sustancia potencialmente interferente (tipo)	Ingrediente activo	¿Interfiere?
Corticoides o gotas nasales	Dexametasona	No
	Triamcinolona	No
	Bclometasona	No
	Flunisolida	No
	Budesonida	No
	Mometasona	No
	Fluticasona	No
Gel nasal	Luffa opperculata, sulfuro	No
Medicamentos homeopáticos para aliviar la alergia	Galfimia glauca	No
	Hidrocloruro de histamina	No
Vacuna	Vacuna intranasal contra la gripe elaborada con virus vivos	No
Pastillas para la garganta, anestésicos y analgésicos orales	Benzocaína, mentol	No
Fármacos antivíricos	Zanamivir, fosfato de oseltamivir	No
Antibiótico, pomada nasal	Mupirocina	No
Antibacteriano, sistémico	Tobramicina	No

Se obtuvieron datos experimentales sobre interferencias utilizando el sistema de extracción NucliSENS® easyMAG® y la plataforma de detección 7500 Fast Dx Real-Time PCR con una versión anterior del ensayo **MRSA/SA ELITE MGB Kit**, que es idéntico al ensayo actual, excepto en el hecho de que no contiene oligonucleótidos específicos de *mecC*.

No se dispone de datos sobre la inhibición provocada por fármacos antivíricos, antibióticos, quimioterápicos o inmunosupresores.

Una alta cantidad de ADN genómico humano en el ADN extraído de la muestra puede inhibir la reacción de amplificación.

13.3 Controles de amplificación

Cada sesión de amplificación debe validarse con una reacción del Negative Control y una del Positive Control.

Para el Negative Control, utilizar agua para biología molecular (no incluida en este kit).

Para el Positive Control, utilizar el producto **MRSA/SA - ELITePositive Control** (no incluido en este kit).

13.4 Controles de calidad

Se recomienda validar el procedimiento entero de análisis de cada sesión de extracción y amplificación procesando una muestra con resultado negativo y una con resultado positivo o un material de referencia calibrado.

14 PROCEDIMIENTO CON OTROS SISTEMAS

14.1 Configuración de la sesión de amplificación en tiempo real

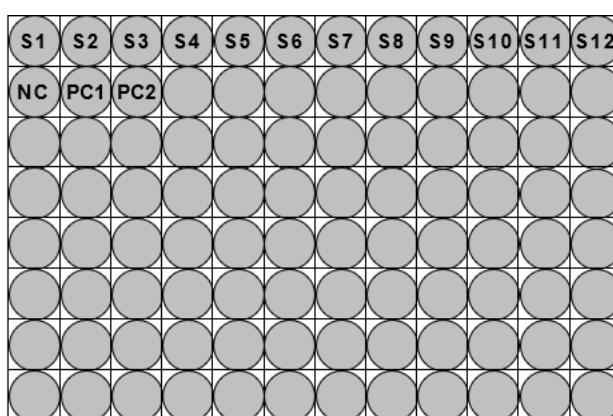
Debe realizarse en el área de amplificación/detección de los productos de amplificación.

Cuando se utiliza un **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**.

Antes de iniciar la sesión, seguir las recomendaciones del fabricante incluidas en la documentación del instrumento y, además:

- Encender el ordenador, encender el termociclador de tiempo real, ejecutar el software dedicado y abrir una sesión de «cuantificación absoluta».
- Si se utiliza el **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, seleccionar «Run mode: Fast 7500».
- Crear un nuevo conjunto de «detectores» o establecer el «detector» apropiado en el menú «Tool» (Herramienta) seleccionando el gestor de detectores.
- 1. Establecer el «detector» para la sonda del gen específico de SA con el «reporter» = «TAMRA» (AP554 es similar a TAMRA) y el inactivador («quencher») = «none» (no fluorescente) y llamarlo «SA».
- 2. Establecer el «detector» para la sonda del gen específico de SA con el «reporter» = «TAMRA» (AP554 es similar a TAMRA) y el inactivador («quencher») = «none» (no fluorescente) y llamarlo «SA».
- 3. Establecer el «detector» para las sondas de los genes *mecA* y *mecC* con el «reporter» = «FAM» y el inactivador («quencher») = «none» (no fluorescente) y llamarlo «mecA».
- 4. Establecer el «detector» para la sonda del Internal Control con el «reporter» = «Cy5» (AP642 es similar al Cy5) y el inactivador («quencher») = «none» (no fluorescente) y llamarlo «IC».
- Ir al menú «View» (Vista), seleccionar «Well Inspector» (Inspector de pocillos) y, para cada pocillo que se utilice en la microplaca, establecer el «detector» (tipo de fluorescencia que debe medirse), la «referencia pasiva» = "ROX" (AP593 es similar al ROX) para la normalización de la fluorescencia medida y el tipo de reacción (muestra, Negative Control de amplificación y Positive Control de amplificación). Añadir esta información a la hoja de trabajo que se adjunta al final de estas instrucciones de uso o imprimir la configuración de la microplaca. La **hoja de trabajo** debe seguirse estrictamente durante la transferencia de la mezcla de reacción y de las muestras a los pocillos.

Consultar a continuación un ejemplo de la forma en la que puede organizarse un análisis cualitativo de 12 muestras.



Leyenda: **S1–S12:** Muestras que deben analizarse. **NC:** Negative Control de amplificación.

PC1: Positive Control de SARM/SA para amplificación; **PC2:** Positive Control de LGA251/SA para amplificación

Siguiendo las indicaciones de la documentación del instrumento, utilizar el software dedicado y elegir «Instrument (Instrumento) > Thermal Cycler Protocol (Protocolo del termociclador) > Thermal Profile (Perfil térmico)» para definir los parámetros del **ciclo térmico**:

- Añadir a la fase de amplificación un **paso de extensión a 72 °C** (opción «Add Step»).

NOTA!

La adquisición de fluorescencia, que se define en «Instrument (Instrumento) > Thermal Cycler Protocol (Protocolo del termociclador) > Settings (Configuración) > Data Collection» (Recopilación de datos)» debe configurarse durante el paso de hibridación a 56 °C.

- Modificar el tiempo tal como se indica en la tabla «**Ciclo térmico**» incluida a continuación.
- Configurar el número de ciclos en **45**.
- Establecer el volumen de reacción a **30 µL**.

Tabla 27

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Tiempo
Descontaminación	50 °C	2 min
Desnaturalización inicial	93 °C	2 min
Amplificación y detección (45 ciclos)	93 °C	10 s
	56 °C (recopilación de datos)	30 s
	72 °C	15 s

14.2 Configuración de la amplificación

Esta tarea debe realizarse en la extracción/preparación del área de la reacción de amplificación.

Antes iniciar la sesión, es necesario realizar la siguientes tareas:

- Tomar y descongelar las probetas que contienen las muestras que van a analizarse. Mezclar suavemente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo.
 - Tomar y descongelar las probetas de la mezcla **MRSA/SA PCR Mix** que se necesitan para la sesión, teniendo en cuenta que cada una de ellas es suficiente para preparar **25 reacciones**. Mezclar suavemente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo.
 - Tomar y descongelar una probeta de **MRSA/SA Positive Control** (Positive Control de las reacciones de amplificación en tiempo real para el gen específico de SA y para el gen *mecA*). Mezclar cuidadosamente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo durante un máximo de cuatro horas.
 - Tomar y descongelar una probeta de **LGA251/SA Positive Control** (Positive Control de las reacciones de amplificación en tiempo real para el gen *mecC*). Mezclar cuidadosamente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo durante un máximo de cuatro horas.
 - Tomar la **microplaca de amplificación** que se utilizará durante la sesión, manipulándola con guantes sin talco y teniendo cuidado de no dañar los pocillos.
1. Distribuir de forma precisa **20 µL** del componente **MRSA/SA PCR Mix** en el fondo de los pocillos de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Evitar la formación de burbujas.

NOTA!

Si no se utiliza toda la mezcla de reacción, conservar el volumen que queda en un lugar protegido de la luz a -20 °C durante un máximo de un mes. Congelar y descongelar la mezcla de reacción un máximo de **cinco veces**.

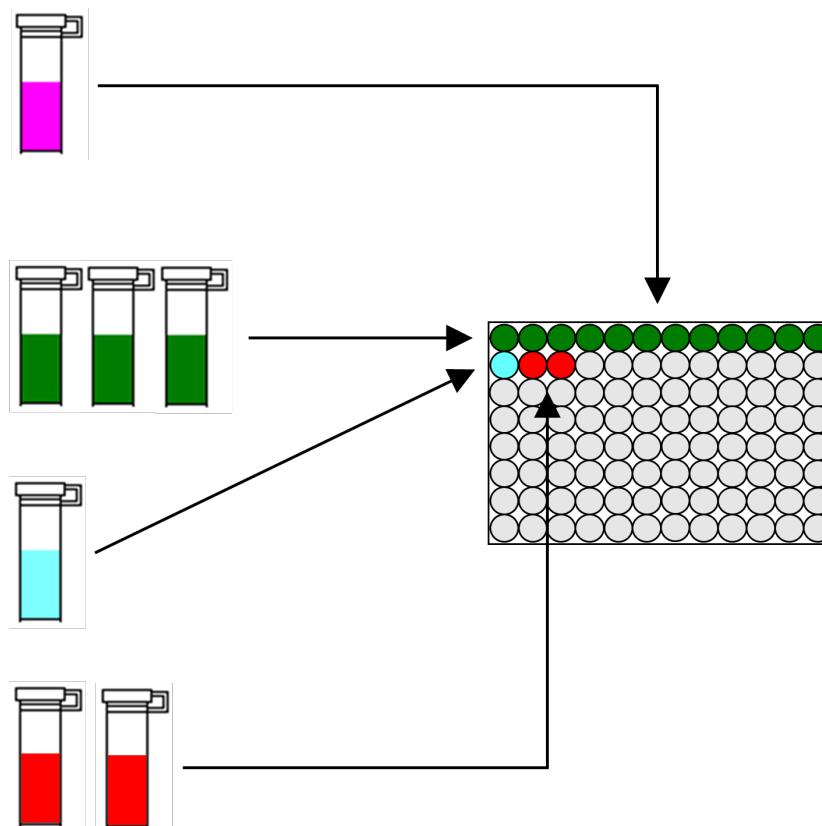
2. Añadir a la mezcla de reacción **10 µL** de la primera mezcla procesada en el pocillo designado, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien la muestra pipeteando el **ADN extraído** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas. Proceder de la misma forma con el resto de muestras extraídas.

3. Añadir a la mezcla de reacción **10 µL** de **agua para biología molecular** (no incluida en volumen de suministro) en el pocillo del Negative Control, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el Negative Control pipeteando el **agua para biología molecular** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.
4. Añadir a la mezcla de reacción **10 µL** de **MRSA/SA Positive Control** en el pocillo designado, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el calibrador pipeteando el **MRSA/SA Positive Control** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.
5. Añadir a la mezcla de reacción **10 µL** de **LGA251/SA Positive Control** en el pocillo designado, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el calibrador pipeteando el **LGA251/SA Positive Control** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.
6. Sellar con precisión la **microplaca de amplificación** con la **placa adhesiva de amplificación**.
7. Transferir la **microplaca de amplificación** al termociclador de tiempo real en el área de amplificación/detección de productos de amplificación e iniciar el ciclo térmico para la amplificación. Guardar la configuración de la sesión con un nombre de archivo único y reconocible (por ejemplo «año-mes-día-SARM/SA-EGSpA»).

NOTA!

Al finalizar el ciclo térmico, la **microplaca de amplificación** que contiene los productos de reacción debe extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Para evitar un derrame de los productos de reacción, la **placa adhesiva de amplificación no debe quitarse de la microplaca de amplificación**.

La figura siguiente muestra de forma esquemática la preparación de la reacción de amplificación.



1. **Añadir 20 µL de PCR Mix**
2. **Añadir 10 µL de los ADN extraídos**
3. **Añadir 10 µL de Negative Control**
4. **Añadir 10 µL de los Positive Control**

14.3 Análisis cualitativo de los resultados

El software del instrumento debe analizar los valores registrados de la fluorescencia emitida por la sonda del gen específico de SA (detector de TAMRA «SA»), por las sondas de los genes *mecA* y *mecC* (detector de FAM «mecA») y por la sonda del Internal Control (detector de Cy5 «IC») durante las reacciones de amplificación.

Antes de iniciar el análisis, seguir las recomendaciones del fabricante incluidas en la documentación del proyecto y, además:

- Establecer los **ajustes de análisis** («Results > Amplification plot > delta Rn vs. Cycle») para todos los detectores a **Auto Baseline** y **Manual Ct**, con el **umbral** («Threshold») establecido a **0,1**. Pulsar el botón **Analyze y guardar** los resultados.

Los valores de la fluorescencia emitida por las sondas específicas durante la reacción de amplificación y el valor **umbral** de fluorescencia permiten determinar el **ciclo umbral (Ct)**. El valor Ct es el ciclo en el que la fluorescencia ha alcanzado el valor **umbral** y es proporcional a la cantidad diana inicial.

En las reacciones de amplificación del **MRSA/SA Positive Control** y del **LGA251/SA Positive Control**, los valores **Ct** de los detectores de SA y *mecA*, en el menú «Results» (Resultados) > «Report» (Informe), se utilizan para validar la amplificación y la detección, tal como se describe en la tabla siguiente:

Tabla 28

Reacción del Positive Control; detector TAMRA «SA»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct ≤35	POSITIVO	CORRECTA

Tabla 29

Reacción del Positive Control; detector FAM «mecA»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct ≤35	POSITIVO	CORRECTA

Si el resultado de la amplificación de los **Positive Control** es **Ct >35 o Ct Undetermined** para los detectores de SA y de *mecA*, significa que el ADN diana no se ha detectado correctamente. Esto significa que se han producido problemas durante el paso de amplificación o de detección (distribución incorrecta de la mezcla de reacción o de los controles positivos, degradación de la mezcla de reacción o de los controles positivos, configuración incorrecta de la posición del Positive Control, configuración incorrecta del ciclo térmico), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

En la reacción de amplificación del **Negative Control**, los valores **Ct** de los detectores de SA, *mecA* e IC, en el menú «Results» (Resultados) > «Report» (Informe), se utilizan para validar la amplificación y la detección, tal como se describe en la tabla siguiente:

Tabla 30

Reacción del Negative Control; detector TAMRA «SA»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct Undetermined o Ct >35	NEGATIVO	CORRECTA

Tabla 31

Reacción del Negative Control; detector FAM «mecA»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct Undetermined o Ct >35	NEGATIVO	CORRECTA

Tabla 32

Reacción del Negative Control; detector Cy5 «IC»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct Undetermined o Ct ≥34	NEGATIVO	CORRECTA

Si el resultado de la amplificación del **Negative Control** es **Ct ≤35** para los detectores de SA o mecA y **Ct <34** para el detector del Internal Control, significa que el ADN diana no se ha detectado correctamente. Esto significa que se han producido problemas durante el paso de amplificación (contaminación), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y a falsos positivos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

En cada reacción de amplificación de la **muestra**, los valores **Ct** de los detectores de mecA y SA se utilizan para detectar el ADN diana, mientras que el valor **Ct** del Internal Control se utiliza para validar la extracción, la amplificación y la detección.

NOTA!

Comprobar con el software del instrumento («Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle») que el **Ct** se haya determinado mediante un aumento rápido y regular de la fluorescencia, y no mediante picos o un aumento del fondo (fondo irregular o alto).

Los valores **Ct** de las reacciones de amplificación de cada **muestra** («Results > Report») se utilizan tal como se describe en la siguiente tabla:

Tabla 33

Reacción de la muestra				Resultado del ensayo	
Detector «TAMRA» «SA» (Ct1)	Detector «FAM» «mecA» (Ct2)	ΔCt Ct1 –Ct2	Detector Cy5 «IC»	Resultado para SA	Resultado para SARM
Undetermined o Ct >35	Undetermined o Ct >35	N/A	Ct <34	Negativas	Negativas
		N/A	Undetermined o Ct ≥ 34	No válida	No válida
Determined, Ct ≤35	Undetermined o Ct >35	N/A	N/A	Positivas	Negativas
	Determined, Ct ≤35	ΔCt ≥2	N/A	Positivas	Negativas
		ΔCt <2	N/A	Positivas	Positivas
Undetermined o Ct >35	Determined, Ct ≤35	N/A	N/A	Negativas	Negativas

Tabla 34

Resultado del ensayo		Interpretación de los resultados
Resultado para SA	Resultado para SARM	
Negativas	Negativas	No se ha detectado ADN de SA, inclusive SARM. Supuestamente negativo para todos los SA, inclusive SARM, o puede que algunos microorganismos se encuentren por debajo del límite de detección.
No válida	No válida	Resultado no válido. Repetir la sesión a partir del paso de extracción de la muestra o de una nueva muestra.

Tabla 34 (continued)

Resultado del ensayo		Interpretación de los resultados
Resultado para SA	Resultado para SARM	
Positivas	Negativas	No se ha detectado ADN de SARM. Supuestamente negativo para SARM, o puede que algunos SARM se encuentren por debajo del límite de detección. Se ha detectado ADN de SA Supuestamente positivo para SA.
Positivas	Positivas	Se ha detectado ADN de SARM. Supuestamente positivo para SARM.

NA: no aplicable

La presencia de ambos marcadores (gen de SA y *mecA*) medida mediante el valor Ct a la misma cantidad relativa (una diferencia en el Ct inferior a 2) es un indicio de la presencia de SARM (inclusive la cepa *mecC*); la existencia de diferentes cantidades relativas (una diferencia en el Ct superior o igual a 2) o la presencia únicamente del marcador del gen específico de *Staphylococcus aureus* es un indicio de la existencia de SA.

Si el resultado de la reacción de amplificación de la muestra es **Ct Undetermined** o **Ct >35** para el detector de SA y *mecA* y **Ct Undetermined** o **Ct ≥34** para el detector del Internal Control, significa que no ha sido posible detectar correctamente ADN del Internal Control. En este caso, se han producido problemas durante el paso de amplificación (amplificación ineficaz o ausencia de amplificación) o durante el de extracción (degradación del ADN, pérdida de este durante la extracción o presencia de inhibidores en el ADN extraído), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y a falsos negativos. La muestra no es apta; el ensayo no es válido y debe repetirse a partir del paso de extracción de la muestra o de una nueva muestra del mismo paciente.

Si el resultado de la amplificación de la muestra es **Ct Undetermined** o **Ct >35** para el detector de SA y **Ct <34** para el detector del Internal Control, significa que no se ha detectado ADN de SA (inclusive SARM) en la muestra procesada. La muestra es supuestamente negativa o el número de microorganismos de la muestra se encuentra por debajo del límite de detección del producto (consultar la sección «**15 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO CON OTROS SISTEMAS page 34**»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

NOTA!

Cuando se detecta ADN de SA o SARM en una muestra, puede que el detector del Internal Control sea **Ct Undetermined** o **Ct ≥34**. De hecho, la alta eficacia de la amplificación de SA o SARM puede competir con la baja eficacia de la amplificación del Internal Control. En este caso, la muestra es apta y el resultado positivo del ensayo es válido.

15 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO CON OTROS SISTEMAS

15.1 Rendimiento clínico

Las características de rendimiento del ensayo se determinaron comparando el producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit**, utilizado en combinación con el **NucliSENS® easyMAG®**, con el producto Remel Spectra™ MRSA o con pruebas de aglutinación/susceptibilidad. Una muestra positiva verdadera para el cultivo de SARM se definió como una muestra en la que SARM se identificaba con cualquiera de las técnicas de cultivo utilizadas. Una muestra positiva verdadera para el cultivo de SA sensible a la meticilina se definió como una muestra negativa para todas las técnicas de cultivo utilizadas, excepto para en el ensayo de aglutinación en látex.

Se recogió un hisopado nasal de cada paciente y se utilizó para inocular una microplaca de agar para la detección de SARM cromogénico selectivo (Remel Spectra™ SARM). A continuación, el hisopado se insertó en una probeta con caldo de soja y triptona y se mezcló minuciosamente antes de procesar el volumen entero de la suspensión celular, tal como se ha descrito anteriormente. Acto seguido, cada hisopado se enriqueció en un caldo de soja y triptona con NaCl al 6,5 %. Las muestras de cultivo enriquecidas se inocularon en placas de agar con sangre, soja y triptona. Las colonias de las placas de agar con sangre, soja y triptona se utilizaron para el ensayo de aglutinación en látex (Remel Staphaurex®). Las muestras positivas para la aglutinación en látex se utilizaron para el análisis de la sensibilidad a la cefoxitina (BD BBL™ SensiDisc™ Susceptibility Test Disc Cefoxitin 20) siguiendo lo estipulado en las instrucciones de uso correspondientes.

El rendimiento del producto **MRSA/SA ELITE MGB Kit** se calculó en relación con la combinación del cultivo cromogénico directo y el cultivo en caldo y, a continuación se realizaron pruebas de aglutinación en látex y de sensibilidad a la cefoxitina.

Las muestras de hisopados nasales se obtuvieron de una organización sanitaria y de donantes sanos y se analizaron mediante una combinación de métodos de cultivo, tal como se ha descrito anteriormente. De este modo, se identificaron 20 muestras positivas para el cultivo de SARM, 20 muestras positivas para el cultivo de SASM y 40 muestras negativas para el cultivo de SA. De las 40 muestras negativas para el cultivo de SA, 20 muestras se enriquecieron con la cepa BAA-2312 de SARM (que contiene el gen *mecC*) cerca del nivel correspondiente al límite de detección.

Comparado con el método de cultivo de referencia, el producto **MRSA/SA ELITE MGB Kit** identificó el 100 % de las muestras positivas para SARM y *mecC* de SARM con el método de referencia (sensibilidad diagnóstica) y el 97,5 % de las muestras negativas (especificidad diagnóstica). Para las muestras analizadas, el valor predictivo positivo (PPV) para SARM fue del 97,6 % y el valor predictivo negativo (NPV) para SARM, del 100 %.

Tabla 35 Resultados para SARM obtenidos con el producto MRSA/SA ELITE MGB® Kit comparado con el método de referencia.

	Sensibilidad diagnóstica para <i>mecA</i> de SARM	Sensibilidad diagnóstica para <i>mecC</i> de SARM	Especificidad diagnóstica para SARM
7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument	100 %	100 %	97,5 %
7500 Real Time PCR System	100 %	100 %	97,5 %

Comparado con el método de cultivo de referencia, el producto **MRSA/SA ELITE MGB Kit** identificó el 95 % de las muestras positivas (sensibilidad diagnóstica) para SA con el método de referencia y el 100 % de las muestras negativas (especificidad diagnóstica). Para las muestras analizadas, el valor predictivo positivo (PPV) para SA fue del 100 % y el valor predictivo negativo (NPV) para SA, del 95 %.

Tabla 36 Resultados para SA obtenidos con el producto MRSA/SA ELITE MGB® Kit comparado con el método de referencia.

	Sensibilidad diagnóstica para SA	Especificidad diagnóstica para SA
7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument	95 %	100 %
7500 Real Time PCR System	95 %	100 %

15.2 Límite de detección

El límite de detección (LoD) del producto **MRSA/SA ELITE MGB Kit** cuando se utilizó en combinación con el **NucliSENS® easyMAG®** se determinó con las cepas que se indican a continuación. Los cultivos de estas cepas se cuantificaron, se diluyeron en una matriz nasal simulada a valores comprendidos entre aproximadamente 5 y 1500 unidades formadoras de colonias (ufc) y se absorbieron en hisopados. Todas las diluciones se analizaron y el LoD se determinó mediante un análisis Probit. El LoD de cada cepa representa el número más bajo de ufc/hisopado con el que puede obtenerse un resultado positivo con un 95 % de probabilidades y al menos un 95 % de confianza. A continuación, el LoD se verificó analizando al menos 20 duplicados.

Tabla 37 Lista de cepas bacterianas para estudios de determinación del LoD

Cepa n.º	Denominación	Descripción	Resistencia a fármacos
ATCC 29213	Wichita	Cepa QC	SASM
ATCC BAA-1556	MRSA252	Adquirida en un hospital, Reino Unido	SARM
ATCC BAA-2312	M10/0061	LGA251	SARM

Tabla 38 Resultados del límite de detección (ufc/hisopado)

	ATCC 29213	BAA-1556	BAA-2312
ABI 7500 Fast	210	159	237
ABI 7500 Standard	262	141	314

15.3 Eficacia de detección del genotipo (inclusividad)

El rendimiento del producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** cuando se utiliza en combinación con el **NucliSENS® easyMAG®** se evaluó con el panel de aptitud MRSA/SA QCMD. Todas las cepas se identificaron correctamente. Además, se obtuvieron datos experimentales en el ensayo utilizando el sistema de extracción NucliSENS® easyMAG® y el 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument con una versión anterior del ensayo, que es idéntica a la actual, excepto en el hecho de que no contiene oligonucleótidos específicos de *mecALGA251*. El ensayo se evaluó con 75 aislados bien caracterizados de SARM y SA sensible a meticilina, representativos de la diversidad genética global, inclusive complejos cloniales y tipos de secuencia, así como distintos tipos de PFGE (electroforesis en gel de campo pulsante) y valores de CMI (concentración inhibidora mínima).

Las cepas se obtuvieron a través del programa de la NARSA (Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*, Red sobre la resistencia a los antimicrobianos en *Staphylococcus aureus*) y de la ATCC (American Tissue Culture Collection, Colección Americana de Cultivos Celulares), o bien fueron cedidas por el Medical College of Wisconsin.¹

Todas las cepas se absorbieron en hisopados cerca del límite de detección y se analizaron. Además, todas las cepas de SA sensibles a la meticilina se analizaron a 1×10^6 ufc/hisopado. Todas las cepas de SA sensibles a la meticilina dieron un resultado positivo para SA y negativo para SARM. Todas las cepas de SARM dieron un resultado positivo para SARM. Dos cepas aisladas de BORSA (*Staphylococcus aureus* con resistencia limítrofe a la oxacilina) que no contenían del gen *mecA* dieron un resultado positivo para SA y negativo para SARM, lo que representa una eficacia global de detección de genotipos (inclusividad) del 97,3 %.

El análisis de las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores y de las sondas fluorescentes realizado mediante la alineación de las secuencias disponibles en la base de datos para los elementos de SSC *mecA*, inclusive *mecC*, presentaron conservación y ausencia de mutaciones reseñables.

15.4 Especificidad analítica (reactividad cruzada)

El análisis de la alineación de las secuencias de los cebadores de SA y de la sonda fluorescente con las secuencias de especies filogenéticamente relacionadas con *Staphylococcus aureus*, microorganismos patógenos y microorganismos presentes de manera habitual en la microflora nasal y disponibles en bases de datos de microorganismos distintos de SA, demostró su especificidad y la ausencia de homologías reseñables para el producto **MRSA/SA ELITe MGB Kit**.

Tabla 39 Especies analizadas para la presencia de reactividad cruzada mediante análisis de bases de datos de secuencias

Especies de <i>Staphylococci</i>		Otros microorganismos	Virus
<i>Staphylococcus arlettae</i>	SCoN	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Adenovirus tipo 1, 7</i>
<i>Staphylococcus capitis</i>	SCoN	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Coronavirus humano 229E, OC 43</i>
<i>Staphylococcus carnosus</i>	SCoN	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Citomegalovirus</i>
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	SCoN	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Virus de Coxsackie A21</i>
<i>Staphylococcus delphini</i>	SCoPSM	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Virus de Epstein Barr</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SCoNSM	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	<i>Virus de la gripe A, B</i>

1. Donación del Dr. Nathan A. Lebedouer, Medical College of Wisconsin, WI; las cepas se describen en: Buchan, B.W. Ledeboer, N.A. Identification of Two Borderline Oxacillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* From Routine Nares Swab Specimens by One of Three Chromogenic Agars Evaluated for the Detection of MRSA, Microbiology and Infectious Disease. 2010;134:921-927

Tabla 39 Especies analizadas para la presencia de reactividad cruzada mediante análisis de bases de datos de secuencias (continued)

Especies de <i>Staphylococci</i>		Otros microorganismos	Virus
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SCoNRM	<i>Corynebacterium bovis</i>	Virus paragripal 1, 2, 3, 4
<i>Staphylococcus equorum</i>	SCoN	<i>Corynebacterium flavescentes</i>	Human metapneumovirus
<i>Staphylococcus felis</i>	SCoN	<i>Corynebacterium genitalium</i>	Virus del sarampión
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	SCoN	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Virus de la parotiditis
<i>Staphylococcus hyicus</i>	SCoP	<i>Enterococcus faecalis</i>	Virus respiratorio sincicial
<i>Staphylococcus intermedius</i>	SCoP	<i>Enterococcus flavescentes</i>	Rinovirus
<i>Staphylococcus kloosii</i>	SCoN	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
<i>Staphylococcus lentus</i>	SCoN	<i>Enterococcus hirae</i>	
<i>Staphylococcus pulvereri</i>	SCoN	<i>Escherichia coli</i>	
<i>Staphylococcus simulans</i>	SCoN	<i>Klebsiella oxytoca</i>	
<i>Staphylococcus warneri</i>	SCoN	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ,	
<i>Staphylococcus xylosus</i>	SCoNSM	<i>Listeria monocytogenes</i>	
		<i>Micrococcus luteus</i>	
		<i>Moraxella catarrhalis</i>	
		<i>Pasteurella aerogenes</i>	
		<i>Proteus mirabilis</i>	
		<i>Proteus vulgaris</i>	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
		<i>Salmonella typhimurium</i>	
		<i>Serratia marcescens</i>	
		<i>Shigella sonnei</i>	
		<i>Streptococcus mitis</i>	
		<i>Streptococcus salivarius</i>	
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	
		<i>Candida albicans</i>	
		<i>Candida glabrata</i>	
		<i>Cryptococcus neoformans</i>	
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
		<i>Legionella pneumophila</i>	
		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
		<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	

Tabla 39 Especies analizadas para la presencia de reactividad cruzada mediante análisis de bases de datos de secuencias (continued)

Especies de <i>Staphylococci</i>		Otros microorganismos	Virus
		<i>Neisseria meningitidis</i>	
		<i>Streptococcus mutans</i>	
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
		<i>Streptococcus pyogenes</i>	
		<i>Homo sapiens</i>	

SCoN: *Staphylococcus* coagulasa negativo.

SCoNSM: *Staphylococcus* coagulasa negativo y sensible a la meticilina.

SCoNRM: *Staphylococcus* coagulasa negativo y resistente a la meticilina.

SCPCo: *Staphylococcus* positivo para coagulasa.

15.5 Reproducibilidad con material de referencia certificado

La sensibilidad analítica del ensayo, expresada como reproducibilidad de los resultados comparados con los resultados obtenidos utilizando otros ensayos en laboratorios diferentes, se evaluó analizando un panel de material de referencia certificado.

Los análisis se llevaron a cabo utilizando como material de referencia calibrado y certificado un panel de diluciones de SARM («QCMD 2010 Methicillin Resistant *S. aureus* EQA Panel»). El panel consta de seis muestras que contienen varias concentraciones de SARM, tres muestras que contienen *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (SASM), una muestra que contiene estafilococos coagulasa negativos y resistentes a la meticilina (SCoNRM), una muestra que contiene *Escherichia coli* (*E. coli*) y una muestra negativa verdadera. Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: la extracción, con el sistema **NucliSENS® easyMAG®** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 40 Análisis con material de referencia certificado

ID de la muestra	Contenido	Concentración de la muestra ufc/mL	Resultado esperado	Resultado real
MRSADNA10-04	SARM	1×10^8	Detectado con frecuencia	Detectada
MRSADNA10-03	SARM	5×10^7	Detectado con frecuencia	Detectada
MRSADNA10-01	SARM	5×10^6	Detectado con frecuencia	Detectada
MRSADNA10-09	SARM	5×10^5	Detectado con frecuencia	Detectada
MRSADNA10-08	SARM	5×10^5	Detectado con frecuencia	Detectada
MRSADNA10-02	SARM	5×10^5	Detectada	Detectada
MRSADNA10-05	SASM	5×10^6	Negativo para SARM	Negativo para SARM Positivo para SA
MRSADNA10-06	SASM	1×10^7	Negativo para SARM	Negativo para SARM Positivo para SA

Tabla 40 Análisis con material de referencia certificado (continued)

MRSADNA10-07	SASM	5×10^6	Negativo para SARM	Negativo para SARM Positivo para SA
MRSADNA10-12	SCoNRM	1×10^7	Negativas	Negativas
MRSADNA10-10	E. coli	5×10^6	Negativas	Negativas
MRSADNA10-11	MHBonly	-	Negativas	Negativas

Todas las muestras se detectaron correctamente.

15.6 Arrastre/Contaminación cruzada

Se realizó un estudio analítico para evaluar el potencial de contaminación cruzada entre muestras de SARM de alta concentración (1×10^7 ufc/mL) y muestras negativas a lo largo de todo el flujo de trabajo del producto **MRSA/SA ELITE MGB Kit**. Dos operarios realizaron 24 series de extracción de muestras (11 muestras de SARM de alta concentración, 11 muestras negativas, 1 muestra de control positiva y 1 muestra de control negativa por serie) en un patrón de damero (muestras de SARM de alta concentración interrumpidas por muestras completamente negativas). A continuación, las muestras procesadas se amplificaron en cinco series independientes utilizando dos patrones de damero diferentes. El análisis de contaminación cruzada dio lugar a cero falsos negativos de 55 muestras positivas para SARM de alta concentración y una muestra falsa positiva de 55 muestras negativas.

Se obtuvieron datos de arrastre/contaminación cruzada utilizando el sistema de extracción NucliSENS® easyMAG® y el 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument con una versión anterior del producto **MRSA/SA ELITE MGB Kit**, que es idéntico al actual, excepto en el hecho de que no contiene oligonucleótidos específicos de *mecC*.

NOTA!

Los datos y resultados completos de los análisis realizados para evaluar las características de rendimiento del producto con los instrumentos se incluyen en la sección 7 de la documentación técnica del producto «MRSA/SA ELITE MGB® Kit», FTP M800351.

16 BIBLIOGRAFÍA

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 through June 2004. Am J Infect Control 2004; 32:470-485.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Surveillance for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Principles, Practices, and Challenges; A Report. CLSI Document X07-R (ISBN 1-56238-719-7) Wayne, PA:CLSI, 2010.

Jernigan, J. A. et al. Prevalence of and risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at the time of hospital admission. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24:409-414.

Garcia-Alvarez, L. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis 2011; 11:595-603.

Stegger, M. et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. Clin Microbiol Infect 2012; 18:395-400.

Ito T. et al. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. Antimicrob Agents Chemother. Octubre de 2012; 56(10): 4997-4999.

17 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Utilizar este producto únicamente con las siguientes muestras clínicas: hisopados nasales y hemocultivos

En la actualidad, no se dispone de datos acerca del rendimiento de este producto con otras muestras clínicas.

No utilizar con este producto ADN extraído contaminado con mucoproteínas, propilenglicol, etanol o 2-propanol, pues estas sustancias inhiben la amplificación de ácidos nucleicos y pueden dar lugar a resultados no válidos.

No utilizar con este producto ADN extraído que contenga altas cantidades de ADN genómico humano que pueda inhibir la reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

Los resultados obtenidos con este producto dependen de que las muestras se identifiquen, recojan, transporten, conserven y procesen de forma apropiada. Por lo tanto, con el fin de evitar resultados incorrectos, es necesario prestar especial atención durante estos pasos y seguir estrictamente las instrucciones incluidas con los productos.

Debido a su alta sensibilidad analítica, el método de PCR en tiempo real utilizado en este producto puede desarrollar contaminación con las muestras clínicas positivas, los Positive Control y los productos de la PCR. Una contaminación cruzada puede dar lugar a resultados falsos positivos. El formato del producto está diseñado para limitar la posibilidad de una contaminación cruzada. No obstante, esta solo puede evitarse procediendo conforme a las prácticas correctas de laboratorio y siguiendo estas instrucciones de uso.

Para utilizar este producto y con el fin de evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario y otras personas, se requiere personal cualificado y con la formación necesaria para procesar muestras biológicas potencialmente infecciosas o productos químicos clasificados como peligrosos.

Con el fin de evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario y otras personas, este producto requiere el uso de un equipo de protección individual y áreas que sean adecuadas para procesar muestras biológicas potencialmente infecciosas o productos químicos clasificados como peligrosos.

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, este producto requiere el uso de un equipo de protección individual e instrumentos especiales expresamente destinados a la configuración de la sesión de trabajo de que se trate.

Con el fin de evitar resultados incorrectos, este producto debe ser manipulado por profesionales debidamente formados y cualificados en técnicas de biología molecular, como la extracción, la PCR y la detección de ácidos nucleicos.

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, es necesario disponer de áreas independientes para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación.

Debido a las diferencias inherentes que existen entre las distintas tecnologías, se recomienda a los usuarios realizar estudios de relación entre los diversos métodos para evaluar dichas diferencias antes de pasar a una nueva tecnología.

Un resultado positivo obtenido con este producto no indica la presencia de SA o SARM viable, pero sí es un indicio de una posible presencia de SA o SARM. Por lo tanto, un resultado positivo no indica necesariamente el fracaso de la intervención de erradicación, pues puede mantenerse ADN no viable.

Un resultado negativo obtenido con este producto significa que el ADN de SA o SARM no se detecta en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de SA o SARM presente un título inferior al límite de detección del producto (consultar el apartado «Características de rendimiento» en la página 15). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

Un resultado negativo después de un resultado previamente positivo puede o puede no indicar el éxito de la erradicación.

En ocasiones, los resultados obtenidos con este producto pueden resultar «no válidos» debido a un error en el Internal Control, por lo que pueden necesitar un nuevo análisis y dar lugar a retrasos en la obtención de los resultados finales.

Si bien son raros, los posibles polimorfismos en la región del genoma bacteriano cubierto por los cebadores y las sondas del producto pueden afectar negativamente a la detección.

La detección de SARM puede verse afectada negativamente en presencia de cantidades excesivas de SA sensible a la meticilina o de portadores de *mecA* coagulasa negativo.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia limítrofe a la oxacilina (BORSA) que no portan el gen *mecA* no se detectan con el producto.

Como con cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, los resultados obtenidos con este producto deben interpretarse en combinación con los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Como en cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, este producto presenta un riesgo residual de obtener resultados no válidos o erróneos. Este riesgo residual no se puede eliminar ni reducir aún más. En determinadas situaciones, el riesgo residual puede hacer que se tomen decisiones incorrectas, con consecuencias potencialmente graves para el paciente. No obstante, este riesgo residual asociado al uso previsto del producto se ha ponderado con los beneficios potenciales para el paciente y se ha evaluado como aceptable.

18 PROBLEMAS Y SOLUCIONES

ELITe InGenius y ELITe BeGenius

Tabla 41

Reacción no válida del Positive Control	
Posibles causas	Soluciones
Error de configuración del instrumento.	Revisar la posición de la PCR Mix y del Positive Control. Comprobar los volúmenes de la PCR Mix y del Positive Control.
Degradación de la PCR Mix.	No utilizar la PCR Mix durante más de 5 sesiones independientes: 3 horas en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No utilizar la PCR Mix para más de 5 sesiones consecutivas: en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No dejar la PCR Mix a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.
Degradación de la Positive Control.	No utilizar el Positive Control para más de 4 sesiones independientes: 3 horas cada una en el área de extracción o en la «Cooler Unit» (unidad de refrigeración). Utilizar una nueva alícuota de la Positive Control.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Tabla 42

Reacción no válida del Negative Control	
Posibles causas	Soluciones
Error de configuración del instrumento.	Revisar la posición de la PCR Mix y del Negative Control. Comprobar los volúmenes de la PCR Mix y del Negative Control.
Contaminación del Negative Control.	No utilizar el Negative Control para más de una sesión. Utilizar una nueva alícuota de agua para biología molecular.
Contaminación del PCR Mix.	Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.
Contaminación del área de extracción, de las gradillas, del «Inventory Block» (administrador de inventarios) o de la «Cooler Unit» (unidad de refrigeración).	Limpiar las superficies con detergentes acuosos, lavar las batas y sustituir los probetas y las puntas que se hayan utilizado.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Tabla 43

Reacción no válida de la muestra	
Posibles causas	Soluciones
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la posición de la PCR Mix, la del Internal Control y la de la muestra. Comprobar el volumen de la PCR Mix, el del Internal Control y el de la muestra.
Degradación de la PCR Mix.	No utilizar la PCR Mix para más de 5 sesiones independientes: 3 horas cada una en la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No utilizar la PCR Mix para más de 5 sesiones consecutivas: en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No dejar la PCR Mix a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.
Degradación de la plantilla del Internal Control.	Utilizar una nueva alícuota del Internal Control.
Inhibición debida a la presencia de sustancias interferentes en la muestra.	Repetir la amplificación con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Repetir la extracción con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra en una sesión realizada en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Tabla 44

Curva de disociación anómala	
Posibles causas	Soluciones
Ausencia de un valor máximo definido. Pico definido, pero Tm diferente de la de otras muestras y de la presentada por el Positive Control.	Verificar que el Ct de la diana sea inferior a 30. Una alta cantidad de producto de amplificación al final de la reacción puede interferir con el análisis de la curva de fusión. Repetir la amplificación de la muestra para confirmar la presencia de la diana con una posible mutación. La diana de la muestra debe secuenciarse para confirmar la mutación.

Tabla 45

Error en el cálculo del Ct	
Posibles causas	Soluciones
Concentración demasiado alta de la diana en la muestra o muestra con una señal de fluorescencia anómala.	Si se observa una amplificación importante en el gráfico de la PCR, seleccionar el carril relativo a la muestra y aprobar manualmente el resultado como positivo. Si no se observa ninguna amplificación en el gráfico de la PCR, seleccionar el carril («Track») relativo a la muestra y aprobar manualmente el resultado como negativo, o bien dejarlo como no válido. Si se requiere un valor Ct: <ul style="list-style-type: none">- Repetir la amplificación de la muestra eluida con una dilución de 1:10 en agua para biología molecular de la muestra en una sesión realizada en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).- Repetir la extracción de la muestra con una dilución de 1:10 en agua para biología molecular en una sesión realizada en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Tabla 46

Tasa anormalmente alta de resultados positivos dentro de la misma sesión (reacciones con valores de Ct tardíos similares)	
Posibles causas	Soluciones
Contaminación entre muestras durante los pasos preanalíticos.	<p>Limpiar la micropipeta con una solución reciente de hipoclorito de sodio (lejía) al 3 % o un limpiador de ADN/ARN después de pipetear cada muestra.</p> <p>No utilizar pipetas de Pasteur. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles.</p> <p>Introducir las muestras en las últimas posiciones de los instrumentos, tal como se indica en la interfaz. Seguir la secuencia de carga indicada por el software.</p>
Contaminación medioambiental en el laboratorio	<p>Limpiar todas las superficies que están en contacto con el operador y las muestras (inclusive las pipetas) con solución de hipoclorito de sodio (lejía) al 3 % reciente o limpiador de ADN/ARN.</p> <p>Realizar un ciclo de descontaminación con radiación UV.</p> <p>Utilizar una nueva probeta de la PCR Mix o del CPE.</p>

Plataforma abierta:**Tabla 47**

ADN diana no detectado en la reacción del Positive Control	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	<p>Distribuir con cuidado las reacciones en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo.</p> <p>Revisar los volúmenes de la PCR Mix distribuida.</p> <p>Comprobar los volúmenes del Positive Control distribuido.</p>
Degradación de la PCR Mix (mezcla de PCR).	Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.
Degradación de la Positive Control.	Utilizar una nueva alícuota de la Positive Control.
Error de configuración del instrumento.	<p>Comprobar la configuración de las posiciones para las reacciones del Positive Control en el instrumento.</p> <p>Comprobar la configuración del ciclo térmico en el instrumento.</p>

Tabla 48

Se ha detectado ADN de la diana en la reacción del Negative Control	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	<p>Evitar derramar el contenido de la probeta de la muestra.</p> <p>Cambiar siempre las puntas entre una muestra y otra.</p> <p>Distribuir con cuidado las muestras, los Negative Control y los Positive Control en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo..</p>
Error al configurar el instrumento	Comprobar la configuración de las posiciones de las muestras, de los Negative Control y de los Positive Control en el instrumento.
Sellado incorrecto de la microplaca.	Proceder con cuidado al sellar la microplaca.
Contaminación del agua para biología molecular.	Utilizar una nueva alícuota de agua estéril.

Tabla 48 (continued)

Se ha detectado ADN de la diana en la reacción del Negative Control	
Posibles causas	Soluciones
Contaminación de la PCR Mix.	Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.
Contaminación del área de extracción/preparación para las reacciones de amplificación.	Limpiar las superficies y los instrumentos con detergentes acuosos, lavar las batas de laboratorio y sustituir las probetas y las puntas utilizadas.

Tabla 49

Fluorescencia de fondo irregular o alto en las reacciones	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta o mezcla insuficiente de la muestra.	Mezclar con cuidado las muestras, los Negative Control y los Positive Control en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.
Error de configuración del punto de referencia.	Configurar el rango de cálculo de referencia entre los ciclos en los que la fluorescencia de fondo ya se ha estabilizado (comprobar los datos de «Results» o «Component») y la fluorescencia de la señal aún no ha empezado a aumentar, p. ej., del ciclo 6 al ciclo 15. Utilizar el cálculo automático del punto de referencia configurando la opción «Auto Baseline».

Tabla 50

Curva de disociación anómala	
Posibles causas	Soluciones
Ausencia de un valor máximo definido. Pico definido, pero diferente del de otras muestras y del presentado por el Positive Control.	Verificar que el valor de Ct del detector FAM sea inferior a 30. Una alta cantidad de producto de amplificación al final de la reacción puede interferir con el análisis de la curva de fusión. Repetir la amplificación de la muestra para confirmar la presencia del ADN diana con una posible mutación. El ADN diana de la muestra debe secuenciarse para confirmar la mutación.

19 SÍMBOLOS



Número de catálogo.



Límite superior de temperatura.



Código de lote.



Fecha de caducidad (último día del mes).

Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*.Cumple los requisitos de la Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*.



Identificador único del producto



Contenido suficiente para <<N>> análisis.



Consulte las instrucciones de uso



Contenido.



Manténgase fuera de la luz del sol



Fabricante.

20 AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

Este producto contiene reactivos fabricados por Thermo Fisher Scientific, que se venden conforme a acuerdos de licencia entre ELITechGroup S.p.A. y sus afiliadas y Thermo Fisher Scientific. El precio de compra de este producto incluye derechos limitados y no transferibles para utilizar únicamente esta cantidad de producto exclusivamente para las actividades del comprador directamente relacionadas con el diagnóstico humano. Para obtener información sobre cómo adquirir una licencia para este producto con fines distintos de los indicados anteriormente, contactar con del departamento de licencias de Thermo Fisher Scientific. Correo electrónico: outlicensing@thermofisher.com.

Los reactivos de detección ELITe MGB® están cubiertos por una o varias patentes de EE. UU., 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, así como por las patentes europeas 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 y por solicitudes de patentes pendientes en la actualidad.

ELITe InGenius® y las tecnologías ELITe BeGenius® están cubiertos por patentes y solicitudes de patentes.

Esta licencia limitada permite a la persona o a la entidad a la que se ha suministrado este producto utilizar este y los datos generados con el uso del producto exclusivamente para diagnóstico humano. Ni ELITechGroup S.p.A. ni sus licenciatarios conceden ninguna otra licencia, ni expresa ni implícita, para ningún otro propósito.

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, el logotipo de ELITe MGB® logo, ELITe InGenius® y ELITe BeGenius® son marcas registradas de ELITechGroup en la Unión Europea.
eSwab® es una marca registrada de COPAN Italia S.p.A.

Appendix A MRSA/SA ELITe MGB Kit utilizado junto con las plataformas de la serie Genius®



ATENCIÓN

Este documento es una versión simplificada de las instrucciones de uso oficiales. Consulte el documento completo antes de utilizar el producto visitando el enlace www.elitech-group.com.

USO PREVISTO

El producto **MRSA/SA ELITe MGB® Kit** es un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* destinado al uso por parte de profesionales sanitarios como ensayo cualitativo de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real para la detección de ADN de *Staphylococcus aureus* (SA) y de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM, inclusive la cepa mecC), extraído de muestras clínicas.

El ensayo se ha validado con los instrumentos **ELITe InGenius®** y **ELITe BeGenius®**, que son sistemas automatizados e integrados para la extracción, la PCR en tiempo real y la interpretación de resultados utilizando muestras humanas de hisopados nasales y de hemocultivos.

El ensayo también se ha validado con el **7500 Real-Time PCR Instrument** utilizando muestras humanas de hisopados nasales y de hemocultivos.

El producto se utiliza como ayuda en la prevención y el control de infecciones por SARM en el ámbito sanitario y está concebido para ayudar a diagnosticar infecciones por SARM, y no para dar orientación sobre el tratamiento de tales infecciones ni para realizar un seguimiento de esos tratamientos. Además, un resultado negativo no descarta la posibilidad de que exista una colonización nasal por SARM/SA, por lo que es necesario realizar cultivos simultáneos a fin de recopilar microorganismos que permitan realizar una tipificación epidemiológica o llevar a cabo análisis de sensibilidad adicionales.

Los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta todas las observaciones clínicas y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Secuencia amplificada

Secuencia	Gen	Fluoróforo	Canal
Diana 1	Región conservadora en el gen de <i>Staphylococcus aureus</i> positivo para coagulasa	AP554	SA
Diana 2	Regiones conservadoras en los genes mecA y mecC (que causan resistencia a la meticilina y a otros antibióticos betalactámicos)	FAM	mecA
Internal Control	Secuencia artificial (IC2)	AP642	IC

Matriz validada

- Hisopados nasales recogidos en el eNAT™ kit
- Hisopados nasales recogidos en el eSwab Collection Kit
- Hemocultivo

Contenido del kit y productos relacionados

MRSA/SA ELITe MGB Kit (M800351)	MRSA/SA ELITe - Positive Control (M800356)
 X 4	 X 2
MRSA/SA PCR Mix 4 probetas de 540 µL 24 reacciones por probeta 96 reacciones por kit 4 ciclos de congelación/descongelación por cada probeta	MRSA/SA - Positive Control y LGA251/ SA Positive Control 2 probetas de 160 µL para SARM/SA 2 probetas de 160 µL para LGA251/SA 5 reacciones por probeta 10 reacciones por kit 12 ciclos de congelación/descongelación
Período de estabilidad máximo:	24 meses
Temperatura de almacenamiento	≤-20 °C

Otros productos necesarios no proporcionados con el kit

<ul style="list-style-type: none"> Instrumento ELITe InGenius: INT030. Instrumento ELITe BeGenius: INT040. ELITe InGenius SP 200: INT032SP200. ELITe InGenius SP1000: INT033SP1000 ELITe InGenius SP 200 Consumable Set: INT032CS. 	<ul style="list-style-type: none"> ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR. ELITe InGenius Waste Box: F2102-000. CPE - Internal Control: CTRCPE 300 µL Filter Tips Axigen: TF-350-L-R-S. 1000 µL Filter Tips Tecan: 30180118.
---	---

Protocolos ELITe InGenius y ELITe BeGenius

<ul style="list-style-type: none"> Volumen de la muestra Volumen del CPE Volumen total de elución: 	<ul style="list-style-type: none"> 200 µL 10 µL 100 µL (con hemocultivos) o 50 µL (con hisopados nasales) 	<ul style="list-style-type: none"> Volumen inicial de PCR del eluido Volumen de la Q-PCR Mix Frecuencia de los controles 	<ul style="list-style-type: none"> 10 µL 20 µL 15 días
---	--	---	---

Rendimiento del ELITe InGenius y de ELITe BeGenius

Matriz	Límite de detección	Sensibilidad	Especificidad
Hisopado nasal	1000 copias/mL	SASM: 93 % (56/60) SARM: 98 % (40/41)	100 % (48/48)
Hemocultivo	2000 copias/mL	SASM: 100 % (39/39) SARM: 100 % (31/31)	100 % (34/34)

Preparación de la muestra

Este producto está concebido para utilizarlo en uno de los instrumentos **ELITe InGenius** o **ELITe BeGenius** con las siguientes muestras clínicas, identificadas conforme a las directrices para laboratorios y obtenidas, transportadas y conservadas en las condiciones siguientes:

Tabla 51

Muestra	Requisitos de obtención	Condiciones transporte/almacenamiento			
		de +16 °C a +26 °C (temperatura ambiente)	de +2 °C a +8 °C	-20 °C ± 10 °C	-70 °C ± 15 °C
Hisopado nasal	recogido con el eNAT™ kit	-	≤4 semanas	≤6 meses	-
Hisopado nasal	recogido con el eSwab Collection Kit	≤2 horas	≤48 horas	≤6 meses	-
Hemocultivo	-	≤24 horas	-	-	-

Procedimientos con el ELITe InGenius

La interfaz del ELITe InGenius guía al usuario paso a paso durante la configuración de la sesión. Todos los pasos, a saber, la extracción, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados, se realizan automáticamente. Existen dos modos operativos, a saber, sesión completa «Extract + PCR»·(Extracción + PCR) y «PCR Only» (Solo PCR).

Antes del análisis

1. Encender el ELITe InGenius. Iniciar sesión con el nombre de usuario y la contraseña correspondientes. Seleccionar el modo « CLOSED »	2. Verificar los controles: Positive Control y Negative Control en el menú «Controls» (Controles). Nota: los dos tienen que haberse procesado y aprobado y no deben estar caducados.	3. Descongelar las probetas de PCR Mix y de CTRCPE . Agitar suavemente en un vórtex. Centrifugar durante 5 segundos.
--	---	--

Procedimiento 1. Serie completa: Extraction + PCR (Extracción + PCR); por ejemplo, muestras

1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil.	2. Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL»; «Elution» (Elución): 50 µL (en el caso de hisopados nasales) o 100 µL (en el caso de hemocultivos)	3. Escanear los códigos de barras de las muestras con el lector de códigos de barras manual, o bien introducir directamente el ID de la muestra.
4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo): MRSA-SA ELITe_NS_200_50 o MRSA-SA ELITe_BC_200_100.	5. Seleccionar el método «Extract + PCR» (Extracción + PCR) y la posición de la muestra: «Extraction Tube» (Tubo de extracción)	6. Cargar la he PCR Mix y el Internal Control en el «Inventory Block» (administrador de inventarios).
7. Cargar: Cargar el PCR Cassette, el cartucho de extracción, la «Elution Tube» (Tubo de elución), el cartucho de puntas y las gradillas del «Extraction Tube» (Tubo de extracción).	8. Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	9. Consultar, aprobar y almacenar los resultados.

NOTA!

si necesita utilizar el modo de procesamiento «Extract Only» (Solo extracción) consulte las instrucciones de uso del instrumento para saber cómo realizar el procedimiento.

Procedimiento 2. «PCR Only» (Solo PCR); p. ej., eluidos, controles

1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil.	2. Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL»; «Elution» (Elución): 50 µL (en el caso de hisopados nasales) o 100 µL (en el caso de hemocultivos)	3. Escanear los códigos de barras de las muestras con el lector de códigos de barras manual, o bien introducir directamente el ID de la muestra.
4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo): MRSA-SA ELITe_NS_200_50 o MRSA-SA ELITe_BC_200_100, MRSA-SA ELITe_PC_200_100 o MRSA-SA ELITe_PC_200_50, MRSA-SA ELITe_NC_200_100 o MRSA-SA ELITe_NC_200_50	5. Seleccionar el método «PCR Only» (Solo PCR) y establecer la posición de la muestra «Elution Tube» (Tubo de elución).	6. Cargar la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios).
7. Cargar El PCR Cassette y la rejilla de la «Elution Tube» (Tubo de elución) con el ácido nucleico extraído.	8. Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	9. Consultar, aprobar y almacenar los resultados.

Procedimientos con el ELITe BeGenius

La interfaz del ELITe BeGenius guía al usuario paso a paso durante la ®configuración de la sesión. Todos los pasos, a saber, la extracción, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados, se realizan automáticamente. Existen dos modos operativos, a saber, sesión completa «Extract + PCR» (Extracción + PCR) y «PCR Only» (Solo PCR).

Antes del análisis

1. Encender el ELITe BeGenius. Iniciar sesión con el nombre de usuario y la contraseña correspondientes. Seleccionar el modo «CLOSED»	2. Verificar los controles: Positive Control y Negative Control en el menú «Controls» (Controles). Nota: los dos tienen que haberse procesado y aprobado y no deben estar caducados.	3. Descongelar las probetas de PCR Mix y de CTRCPE . Agitar suavemente en un vórtex. Centrifugar durante 5 segundos.
--	---	---

Procedimiento 1. Serie completa: Extraction + PCR (Extracción + PCR); por ejemplo, muestras

1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil y, a continuación, hacer clic en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).	2. Insertar el «Sample Rack» (Rack de muestras) con las muestras dotadas de códigos de barras en la «Cooling Unit». El escaneado de códigos de barras ya está activo.	3. Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL», «Eluate» (Eluido): 50 µL (en el caso de hisopados nasales) o 100 µL (en el caso de hemocultivos)
4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo): MRSA-SA ELITe_Be_NS_200_50 o MRSA-SA ELITe_Be_BC_200_100. Nota: si es necesario llevar a cabo una segunda extracción, repetir los pasos del 2 al 4.	5. Imprimir las etiquetas para incluir el código de barras correspondiente en los «Elution tubes» (tubos de elución) vacíos. Cargar las probetas en la «Elution Rack» (rejilla de elución) e insertarla en la «Cooler Unit».	6. Cargar la PCR Mix y el Internal Control en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) e insertarla en la «Cooler Unit».
7. Cargar la «PCR Rack» (gradilla de PCR) el PCR Cassette y la «Extraction Basket» (cesta de extracción) con los cartuchos de extracción ELITe InGenius SP 200 y los consumibles que se necesitan para la extracción.	8. Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	9. Consultar, aprobar y almacenar los resultados.

NOTA!

si necesita utilizar el modo de procesamiento «Extract Only» (Solo extracción) consulte las instrucciones de uso del instrumento para saber cómo realizar el procedimiento.

Procedimiento 2. «PCR Only» (Solo PCR); p. ej., eluidos, controles

1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil y, a continuación, hacer clic en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).	2. Cargar el ácido nucleico extraído o las probetas con códigos de barras de los controles en la «Elution Rack» (rejilla de elución) e insertarla en la «Cooler Unit».	3. Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL», «Eluate» (Eluido): 50 µL (en el caso de hisopados nasales) o 100 µL (en el caso de hemocultivos)
4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo): MRSA-SA ELITe_Be_NS_200_50 o MRSA-SA ELITe_Be_BC_200_100, MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_100 o MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_50 MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_100 o MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_50	5. Cargar la mezcla PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) e insertarla en la «Cooler Unit».	6. Cargar la «PCR Rack» (rejilla de PCR) con el PCR Cassette.
7. Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	8. Consultar, aprobar y almacenar los resultados.	

ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185, 10149 Turín, Italia
Teléfono: +39-011 976 191
Fax: +39-011 936 76 11
Correo electrónico: emd.support@elitechgroup.com
Página web: www.elitechgroup.com

