

Instructions for use

MRSA/SA ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN



REF M800351

UDI 08033891486556



HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

Rev.	Aviso de alteração	Data (dd/mm/aa)
10	Utilização extensiva do produto em associação com o instrumento «ELITe BeGenius®» (REF INT040) e zaragatoas nasais e matrizes de hemocultura. Remoção do protocolo de sonicação durante a fase de extração Atualização do parágrafo “Símbolos” com o símbolo “Consulte as instruções de utilização” Novos gráficos e definição de conteúdos das instruções de utilização	27/03/25
09	Introdução da referência do novo produto "ELITe InGenius Sonication tubes" (ref. INT032SON) a ser utilizado em combinação com o produto para a sonicação de amostras.	13/10/20
08	Correções formais.	06/02/19
00–07	Desenvolvimento de novo produto e alterações subsequentes	

NOTE

A revisão destas instruções de utilização também é compatível com as versões anteriores do kit

ÍNDICE

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA	4
2 EXPLICAÇÃO DO ENSAIO	4
3 PRINCÍPIOS DO ENSAIO	4
4 DESCRIÇÃO DO PRODUTO	5
5 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	5
6 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	5
7 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	6
8 AVISOS E PRECAUÇÕES	7
9 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA ELITe InGenius and ELITe BeGenius	8
10 PROCEDIMENTO ELITe InGenius	10
11 PROCEDIMENTO ELITe BeGenius	15
12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM ELITe InGenius e ELITe BeGenius	19
13 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA OUTROS SISTEMAS	24
14 PROCEDIMENTO NOUTROS SISTEMAS	27
15 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM OUTROS SISTEMAS	32
16 REFERÊNCIAS	37
17 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	37
18 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	38
19 SÍMBOLOS	42
20 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	43
Appendix A QUICK START GUIDE	44

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA

O **MRSA/SA ELITe MGB® Kit** consiste num dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* que se destina a ser usado por profissionais de saúde como um ensaio de PCR em tempo real de ácidos nucleicos qualitativo para a deteção do ADN de *Staphylococcus aureus* (SA) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA, incluindo a estirpe *mecC*), extraído de amostras clínicas.

O ensaio é validado em associação com os instrumentos **ELITe InGenius®** e **ELITe BeGenius®**, automatizados e integrados para extração, PCR em tempo real e interpretação de resultados, utilizando amostras humanas de zara-gatoas nasais e hemocultura.

O ensaio é também validado em associação com o **7500 Real-Time PCR Instrument**, usando amostras humanas de zara-gatoas nasais e hemocultura.

O produto destina-se a ser utilizado como auxiliar na prevenção e controlo de infeções por MRSA nos contextos de saúde e a auxiliar no diagnóstico de infeções por MRSA, e não a orientar ou a monitorizar o tratamento de infeções por MRSA. Um resultado negativo não exclui colonização nasal de MRSA/SA. São necessárias culturas simultâneas para recuperar organismos para tipificação epidemiológica ou para testes de suscetibilidade adicionais.

Os resultados devem ser interpretados em conjunto com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

2 EXPLICAÇÃO DO ENSAIO

Staphylococcus aureus é um agente patogénico oportunista transportado como um organismo comensal na pele e nas narinas de cerca de 30% da população normal, causando potencialmente um leque alargado de doenças.

O SA e em especial o MRSA são consistentemente a causa líder de infeções nosocomiais e estão associados a uma morbidade, mortalidade e custos substanciais. A emergência de infeções de MRSA associadas à comunicada requer a vigilância ativa de SA e MRSA dos pacientes internados nos hospitais ou noutras instituições de saúde, para identificar pacientes que possam servir como transmissores de infeções a outros pacientes.

O **MRSA/SA ELITe MGB Kit** consiste num ensaio baseado em amplificação em tempo real triplex que visa as regiões conservadoras num **gene específico do Staphylococcus aureus**, responsável pela identificação de SA coagulase positivo.

O ensaio visa também o **gene *mecA***, incluindo a variante ***mecC***, que foi designado de **gene *mecC*** (Ito T. et al.), responsável pela resistência à meticilina e outros antibióticos beta-lactâmicos e um controlo interno exógeno, para controlar a inibição da reação e a integridade do reagente.

O gene específico de *Staphylococcus aureus* irá identificar de forma unívoca o SA coagulase positivo e os genes *mecA* irão identificar de forma unívoca a resistência à meticilina.

A presença de ambos os marcadores na mesma quantidade relativa medida por uma diferença no valor do limiar do ciclo é indicativo de MRSA; diferentes quantidades relativas ou a presença apenas do marcador do gene específico de *Staphylococcus aureus* é indicativo de SA.

Os ensaios baseados em amplificação em tempo real de MRSA/SA diminuem significativamente o tempo de laboratório em comparação com os testes de cultura padrão, aumentando a eficácia do procedimento. Os testes de deteção de MRSA por PCR em tempo real atuais visam o local de inserção do *SCCmec* (elemento genético móvel transportador de *mecA* designado de cassete cromossómica estafilocócica), e/ou o gene *mecA* e/ou o gene *spa*.

O **MRSA/SA ELITe MGB Kit** visa as regiões conservadoras nos marcadores genéticos de MRSA e SA, minimizando desta forma os resultados falsos negativos devido à variabilidade num local de inserção de *SCCmec* natural e minimizando os resultados falsos positivos devido a um problema de “cassete vazia”.

3 PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio é uma deteção qualitativa de PCR em tempo real do ADN de SA e MRSA isolado de amostras e amplificado usando o reagente de ensaio MRSA/SA PCR Mix, que contém primers e sondas com tecnologia ELITe MGB Kit.

As sondas ELITE MGB Kit são ativadas quando hibridizam com os correspondentes produtos da PCR. **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** monitorizam o aumento da fluorescência e calculam os ciclos de limite (Ct) e as temperaturas de fusão (Tm).

Nas sondas ELITE MGB Kit, os fluoróforos são inativados no estado de cadeia única de espiral aleatória da sonda. Os fluoróforos são ativados no duplex amplicon / sonda dado que o inativador está espacialmente separado do fluoróforo.

Ressalva-se que o fluoróforo não é clivado durante a PCR e pode ser utilizado para a análise da dissociação e o cálculo da temperatura de fusão.

4 DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O **MRSA/SA ELITE MGB Kit** fornece o reagente do ensaio **MRSA/SA PCR Mix**, uma PCR Mix otimizada e estabilizada que contém os primers e sondas específicos de:

- o gene específico de SA (específico de uma região conservadora no *Staphylococcus aureus* coagulase positivo), detetado no canal **SA**; a sonda é estabilizada por MGB, inativado pelo Eclipse Dark Quencher® e identificado pelo corante AquaPhluor® 554 (AP554),

- os genes *mecA* e *mecC* (específicos das regiões conservadoras dos **genes *mecA* e *mecC*** responsáveis pela resistência à meticilina e a outros antibióticos beta-lactâmicos) detetados no canal **MecA**; as sondas são estabilizadas por MGB, inativado pelo Eclipse Dark Quencher® e identificado pelo corante FAM,

- Internal Control (**IC**), específico para a sequência artificial IC2, detetado no Canal **IC**; a sonda é estabilizada por MGB, inativado pelo Eclipse Dark Quencher® e identificado pelo corante AquaPhluor 642 (AP642).

A **MRSA/SA PCR Mix** contém também tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos nucleótidos, fluoróforo AP593 (análogo do ROX ou Cy5) como referência passiva para normalização da fluorescência, a enzima Uracil-N-glicosidase (UNG) para inativar a contaminação pelo produto de amplificação e a polimerase de ADN de início a quente.

O produto **MRSA/SA ELITE MGB Kit** contém reagentes suficientes para **96 testes** no **ELITE InGenius** e no **ELITE BeGenius (24 testes em cada tubo)** e para **100 testes** **noutros sistemas (25 testes em cada tubo)**, com 20 µL usados por reação.

O **MRSA/SA ELITE MGB Kit** também pode ser usado em associação com instrumentos equivalentes.

5 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Table 1

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
MRSA/SA PCR Mix ref. M800351	Mistura de reagentes para PCR em tempo real o tubo com tampa BRANCA	4 x 540 µL	-

6 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Exaustor de fluxo de ar laminar.
- Luvas de nitrilo sem pó descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrífuga de bancada (~5.000 RPM).
- Microcentrífuga de bancada (~13.000 RPM).
- Micropipetas e pontas estéreis com filtro de aerossol ou pontas de deslocação positiva estéreis (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).

- Tubos com tampa de rosca esterilizados de 2,0 mL (Sarstedt, Alemanha, ref. 72.694.005).
- Água de qualidade para biologia molecular.
- Caldo de soja Trypticase

7 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para extração do ADN de amostra, o Internal Control da extração e inibição, os controlos positivo e negativo de amplificação e os consumíveis **não são** fornecidos com este produto.

Para a extração automática de ácidos nucleicos, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados das amostras, são necessários os produtos seguintes:

Table 2

Instrumentos e software	Produtos e reagentes
<p>ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA ref. INT030)</p> <p>Software ELITe InGenius versão 1.3.0.19 (ou mais recente)</p> <p>MRSA-SA ELITe_PC_200_100 ou MRSA-SA ELITe_PC_200_50, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Positive Control</p> <p>MRSA-SA ELITe_NC_200_100 ou MRSA-SA ELITe_NC_200_50, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control</p> <p>MRSA-SA ELITe_NS_200_50, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostras de zara-gatoas nasais</p> <p>MRSA-SA ELITe_BC_200_100, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostras de hemocultura</p>	<p>ELITe InGenius SP200 (EG SpA, ref. INT032SP200)</p> <p>ELITe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, ref. INT032CS)</p> <p>ELITe InGeniusPCR Cassette (EG SpA, ref. INT035PCR),</p> <p>ELITe InGenius Waste Box (EG SpA, ref. F2102-000)</p> <p>300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., ref. TF-350-L-R-S) apenas com o ELITe InGenius</p> <p>1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Switzerland, ref. 30180118) com o ELITe BeGenius apenas</p> <p>CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE)</p> <p>MRSA-SA — ELITe Positive Control (EG SpA, ref. M800356)</p> <p>eNATT™ kit (Copan, ref. 608CS01R),</p> <p>eSwab Collection Kit (Copan, ref. 480CE),</p>
<p>ELITe BeGenius (EG SpA ref. INT040)</p> <p>Software ELITe BeGenius versão 2.2.1. (ou superior)</p> <p>MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_100 ou MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_50, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Positive Control</p> <p>MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_100 ou MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_50, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control</p> <p>MRSA-SA ELITe_Be_NS_200_50, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostras de zara-gatoas nasais</p> <p>MRSA-SA ELITe_Be_BC_200_100, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostras de hemocultura</p>	<p>MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (Life Technologies, ref. 4346906)</p> <p>CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE)</p> <p>MRSA-SA — ELITe Positive Control (EG SpA, ref. M800356)</p> <p>NucliSENS easyMAG Reagents (bioMérieux SA, Ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)</p> <p>NucliSENSeasyMAGStrip for Premix (bioMérieux SA, ref. 278303)</p> <p>bioHit Electronic Multichannel Pipettor (bioMérieux SA, ref. 280141)</p> <p>Filter tips for bioHit (bioMérieux SA, ref. 280146)</p> <p>BBL CultureSwab Plus Amies Gel without Charcoal swabs (Becton-Dickinson, ref. 220116)</p>
<p>7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, ref. 4406985)</p> <p>NucliSENS® easyMAG (bioMérieux SA, Ref. 200111)</p>	

8 AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido para utilização exclusiva in-vitro.

8.1 Avisos e precauções gerais

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem infeciosas. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Tubos, pontas e outros materiais que entram em contacto com as amostras biológicas devem ser tratados durante, pelo menos, 30 minutos com hipoclorito de sódio (lixívia) a 3% ou em autoclave durante uma hora a 121 °C antes da eliminação.

Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais usados na realização do ensaio como se fossem infeciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os resíduos devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os resíduos líquidos que contenham ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação. Não permita que os reagentes de extração entrem em contacto com hipoclorito de sódio (lixívia).

Use vestuário e luvas de proteção adequados e proteja os olhos e o rosto.

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

Não coma, beba, fume ou aplique produtos cosméticos nas áreas de trabalho.

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

Elimine os reagentes remanescentes e os desperdícios em conformidade com os regulamentos em vigor.

Leia atentamente todas as instruções fornecidas antes de efetuar o ensaio.

Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas com o produto.

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

Use apenas os reagentes fornecidos com o produto e os recomendados pelo fabricante.

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

8.2 Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular requerem profissionais qualificados e com formação, para evitar o risco de resultados incorretos, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos na amostra ou à contaminação da amostra por produtos da PCR.

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter disponíveis áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação. Nunca introduza um produto de amplificação na área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter disponíveis batas, luvas e ferramentas de laboratório que sejam exclusivamente usadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação.

Nunca transfira batas, luvas ou ferramentas de laboratório da área designada para a amplificação/deteção de produtos de amplificação para a área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

São necessárias batas de laboratório, luvas e ferramentas para preparação da sessão de trabalho.

As amostras devem ser adequadas e, se possível, exclusivas para este tipo de análise. As amostras devem ser manuseadas sob uma câmara de fluxo laminar. As pipetas usadas no manuseamento de amostras devem ser usadas exclusivamente para este fim específico. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, estar livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os reagentes devem ser manuseados sob uma câmara de fluxo laminar. As pipetas usadas no manuseamento dos reagentes devem ser usadas exclusivamente para este fim. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os produtos de extração devem ser manuseados de modo a reduzir a dispersão para o ambiente, para evitar a possibilidade de contaminação.

As PCR Cassette devem ser manuseadas com cuidado de modo a evitar a emanação do produto da PCR para o ambiente e a contaminação da amostra e do reagente.

8.3 Avisos e precauções específicos para os componentes

Table 3

Componente	Temperatura de armazenamento	Utilização a partir da primeira abertura	Ciclos de congelação/ /descongelação	Estabilidade de bordo (ELITe InGenius e ELITe BeGenius)
MRSA/SA PCR Mix	-20°C ou inferior (protegido da luz)	um mês	até cinco	até 15 horas (5 sessões de trabalho de 3 horas cada)

9 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA ELITe InGenius and ELITe BeGenius

9.1 Amostras

Este produto destina-se a ser usado no instrumento **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** com o ácido nucleico extraído das seguintes amostras clínicas identificadas e manuseadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, e colhidas, transportadas e armazenadas sob as condições seguintes:

Table 4

Amostra	Requisitos de colheita	Condições de transporte/armazenamento			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2° / +8°C	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
zaragatoa nasal	colhida com eNAT™ kit		≤ 4 semanas	≤ 6 meses	-
zaragatoa nasal	colhida com eSwab Collection Kit	≤ 2 horas	≤ 48 horas	≤ 6 meses	-
hemocultura	-	≤ 24 horas	-	-	-

Antes da análise, dilua a hemocultura numa relação de 1:1000 em água ultrapurificada (pelo menos 10 µL de amostras em 10 mL de água ultrapurificada), misture por meio de vórtice e transfira 0,2 mL de amostras diluídas para um tubo de extração (para o instrumento ELITe InGenius) ou para um tubo Sarstedt de 2 mL (para o instrumento ELITe BeGenius).

Recomenda-se a divisão das amostras em alíquotas antes da congelação, para evitar ciclos repetidos de congelação / descongelação. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Para realizar o teste das amostras no **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius**, devem ser usados os seguintes protocolos de ensaio. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com o **ELITe InGenius** ou **ELITe BeGenius** com as matrizes indicadas.

Table 5 Protocolos de ensaio para o MRSA/SA ELITe MGB Kit

Amostra	Instrumento	Nome do protocolo de ensaio	Relatório	Características
Zaragatoa nasal	ELITe InGenius	MRSA-SA ELITe_NS_200_50	Positiva / Negativa	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 50 µL Internal Control: 10 µL Sonicção: NÃO Fator de diluição: 1 Volume da PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL
	ELITe BeGenius	MRSA-SA ELITe_Be_NS_200_50	Positiva / Negativa	
hemocultura	ELITe InGenius	MRSA-SA ELITe_BC_200_100	Positiva / Negativa	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicção: NÃO Volume da PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL
	ELITe BeGenius	MRSA-SA ELITe_Be_BC_200_100	Positiva / Negativa	

Para todos os protocolos, 200 µL de amostra devem ser transferidos para o tubo de extração (para ELITe InGenius) ou tubo Sarstedt de 2 mL (para ELITe BeGenius).

NOTE

A pipetagem de amostras para o **tubo de extração** ou para o **tubo Sarstedt de 2 mL** pode gerar **contaminação**. Utilize as pipetas adequadas e siga todas as recomendações reportadas na secção 8 AVISOS E PRE-CAUÇÕES page 7.

Os ácidos nucleicos purificados podem ser deixados à temperatura ambiente durante 16 horas e armazenados a -20 °C ou abaixo durante não mais de um mês.

Consulte "Substâncias Potencialmente Interferentes" na secção [12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM ELITe InGenius e ELITe BeGenius page 19](#) para verificar os dados relativos a substâncias interferentes.

Uma elevada quantidade de ADN genómico humano no ADN extraído da amostra pode inibir a reação de amplificação.

9.2 Controlos da PCR

Os resultados do controlo da PCR têm de ser gerados e aprovados para cada lote de reagente de PCR.

- Para o Positive Control, utilize o produto **MRSA/SA - ELITe Positive Control** (não fornecido com este kit) com os protocolos de ensaio **MRSA-SA ELITe_PC_200_50** ou **MRSA-SA ELITe_PC_200_100** e **MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_50** ou **MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_100**.
- Para o Negative Control, utilize água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit) com os protocolos de ensaio **MRSA-SA ELITe_NC_200_50** ou **MRSA-SA ELITe_NC_200_100** e **MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_50** ou **MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_100**.

NOTE

O **ELITe InGenius** e o **ELITe BeGenius** permitem a geração e o armazenamento da validação do controlo de PCR para cada lote de reagente de PCR. Os resultados do controlo da PCR expiram após **15 dias** e, nesse momento, é necessário voltar a executar os Positive e Negative Controls. Os controlos da PCR devem ser novamente testados se ocorrer algum dos seguintes eventos:

- se for usado um novo lote de reagentes,
- os resultados da análise de controlo da qualidade se encontrarem fora da especificação (ver o parágrafo seguinte),
- for realizada qualquer reparação ou manutenção significativa no instrumento **ELITe InGenius** ou **ELITe BeGenius**.

9.3 Controlos da qualidade

Recomenda-se a verificação do procedimento de extração e PCR. Podem ser usadas amostras arquivadas ou material de referência certificado. Os controlos externos devem ser usados em conformidade com as organizações de acreditação locais, estatais e federais, consoante aplicável.

10 PROCEDIMENTO ELITe InGenius

O procedimento para uso do **MRSA/SA ELITe MGB Kit** com o **ELITe InGenius** é composto por três passos:

Table 6

PASSO 1	Verificação da prontidão do sistema	
PASSO 2	Preparação da sessão	A) Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR])
		B) Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
		C) Execução do Positive Control e Negative Control (apenas PCR)
PASSO 3	Revisão e aprovação de resultados	1) Validação dos resultados de Positive Control e Negative Control
		1) Validação dos resultados das amostras
		3) Elaboração do relatório do resultado da amostra

10.1 PASSO 1 - Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- ligue o **ELITe InGenius** e inicie sessão no modo “**CLOSED**” (fechado),
- no menu “Controls” (Controlos) na página inicial, verifique se os controlos de PCR (**MRSA/SA - Positive Control**, **LGA251/SA Positive Control** e **MRSA/SA Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de **MRSA/SAPCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote de **MRSA/SA PCR Mix**, execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (ver [9 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA ELITe InGenius and ELITe BeGenius page 8](#)).
- Se o Protocolo de ensaio que precisa não estiver carregado no sistema, contacte o Serviço de Apoio ao cliente ELITechGroup S.p.A. da sua localidade.

10.2 PASSO 2 - Configuração da sessão

O **MRSA/SA ELITe MGB Kit** pode ser usado no **ELITe InGenius** para realizar:

- Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]),
- Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),
- Execução do Positive Control e Negative Control (apenas PCR).

Todos os parâmetros requeridos estão incluídos no Protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente carregados quando o Protocolo de ensaio é selecionado.

NOTE

O **ELITe InGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite descarregar a informação da sessão. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Antes de configurar uma execução:

Descongele os tubos **PCR Mix** necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para **24 testes** em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

Proteja a **PCR Mix** da luz enquanto aquece, dado que este reagente é fotossensível.

Para configurar um dos três tipos de execução, siga os passos abaixo diante da GUI

Table 7

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução do Positive e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
1	Identifique amostras e, se necessário, descongele até à temperatura ambiente. Transfira 200 µL da amostra para um tubo de extração anteriormente identificado.	Descongele os Elution tubes contendo os ácidos nucleicos extraídos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.	Descongele tubos de Positive Control (MRSA/SA Positive Control e LGA251/SA Positive Control) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. (Cada tubo é suficiente para 4 reações.)
2	Descongele os tubos de CPE necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 12 extrações.	Não aplicável	Prepare o Negative Control transferindo pelo menos 50 µL de água de grau de biologia molecular para um “Elution tube” (Tubo de eluição), fornecido com o ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Selecione “Perform Run” (Executar) a partir do ecrã “Home”.	Selecione “Perform Run” (Executar) a partir do ecrã “Home”.	Selecione “Perform Run” (Executar) a partir do ecrã “Home”.
4	Se forem processadas amostras de zara-gatoas nasais, certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o Volume de eluição extraído é de 50 µL. Se forem processadas amostras de hemocultura, certifique-se de que o “Volume de entrada de extração” é de 200 µL e que o “Volume de eluição extraído” é de 100 µL.	Se forem processadas amostras de zara-gatoas nasais, certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o Volume de eluição extraído é de 50 µL. Se forem processadas amostras de hemocultura, certifique-se de que o “Volume de entrada de extração” é de 200 µL e que o “Volume de eluição extraído” é de 100 µL.	Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o Volume de eluição extraído é de 50 µL (com NS) ou “100 µL” (com BC).
5	Para cada amostra, atribua um Track e introduza a “SampleID” (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.	Para cada amostra, atribua um Track e introduza a “SampleID” (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.	Não aplicável
6	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna “Assay” (Ensaio) (ver “Amostras e Controlos”).	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna “Assay” (Ensaio) (ver “Amostras e Controlos”).	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna “Assay” (Ensaio) (ver “Amostras e Controlos”). Introduza o número do lote e a data de validade do Positive Control e da água de grau biológico molecular.
7	Certifique-se de que o “Protocol” (Protocolo) apresentado é: “Extract + PCR”(Extrair + PCR).	Selecione “PCR Only” (apenas PCR) na coluna “Protocol”.	Certifique-se de que “PCR Only” (Apenas PCR) está selecionado na coluna “Protocol” (Protocolo).

Table 7 (continued)

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução do Positive e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
8	Selecione a posição de carregamento da amostra como "Primary tube" (Tubo primário) ou "Extraction Tube" (Tubo de extração) na coluna "Sample Position" (Posição da amostra).	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" (Posição da amostra) é "Elution Tube (bottom row)" (Tubo de eluição [linha inferior]).	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" (Posição da amostra) é "Elution Tube (bottom row)" (Tubo de eluição [linha inferior]).
9	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
10	Carregue a CPE e PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza a CPE e o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.	Carregue a PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.	Carregue a PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.
11	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
12	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.
13	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
14	Carregue a PCR Cassette , os cartuchos de extração ELITe InGenius SP 200 e todos os consumíveis e amostras necessários para serem extraídos	Carregue a PCR Cassette e os tubos de eluição com as amostras extraídas	Carregue os tubos de PCR Cassette, Positive Control e Negative Control.
15	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
16	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
17	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

Quando a sessão é concluída, o **ELITe InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

NOTE

No final da execução a restante amostra extraída no **Elution tube** (Tubo de eluição) deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 ± 10 °C durante não mais de um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

NOTE

No final da operação, a **PCR Mix** pode ser retirada do instrumento, tapada e armazenada a -20 °C ou abaixo ou pode ser mantida no bloco frigorífico durante até 5 sessões de trabalho de 3 horas; misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a próxima sessão.

NOTE

No final da execução, o **Positive Control** restante deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C ou menos. Evite o derrame de **Positive Control**. O **Negative Control** restante deve ser eliminado.

NOTE

O **Positive Control** pode ser usado para 4 sessões separadas de 3 horas cada.

NOTE

No final da execução, a **PCR Cassette** e os outros consumíveis têm de ser eliminados seguindo todos os regulamentos governamentais e ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

10.3 PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

O **ELITe InGenius** monitoriza os sinais de fluorescência do alvo e do Internal Control para cada reação e aplica automaticamente os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo de ensaio) para gerar curvas de PCR que são então interpretadas sob a forma de resultados.

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã “Results Display” (Exibição dos resultados). Neste ecrã são mostrados os resultados e informações sobre a execução. A partir deste ecrã é possível aprovar os resultados, imprimir ou guardar os relatórios (“Sample Report” ou “Track Report”). Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

O sistema **ELITe InGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite carregar os resultados da sessão no centro de dados laboratoriais. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

O **ELITe InGenius** gera os resultados com o **MRSA/SA ELITe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

1. Validação dos resultados de Positive Control e Negative Control,
2. Validação dos resultados da amostra,
3. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

10.3.1 Validação da amplificação dos resultados de Positive Control e Negative Control

O **ELITe InGenius Software** interpreta os resultados da PCR para os alvos da reação de Positive Control e Negative Control com os parâmetros dos protocolos de ensaio **ELITe_PC** e **ELITe_NC**. Os valores de Ct resultantes são usados para verificar o sistema (lote de reagentes e instrumento).

Os resultados do Positive Control e Negative Control, específicos para o lote do reagente de PCR, são registados na base de dados (Controlos). Podem ser visualizados e aprovados pelos utilizadores “Administrator” (Administrador) ou “Analyst” (Analista) seguindo as instruções na GUI.

Os resultados de Positive Control e Negative Control expiram após **15 dias**.

Os resultados da amplificação do Positive Control e Negative Control são usados pelo **software ELITe InGenius** para preparar os Gráficos de controlo que monitorizam os desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

Se o resultado de Positive Control ou Negative Control não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem “Failed” no ecrã “Calibration”. Neste caso, os resultados não podem ser aprovados e as execuções de Positive Control ou Negative Control têm de ser repetidas.

NOTE

Se o resultado de Positive Control ou Negative Control não for válido e as amostras tiverem sido incluídas na mesma execução, as amostras podem ser aprovadas mas os resultados não são válidos. Neste caso, o controlo(s) falhado e as amostras têm de ser todos repetidos.

10.3.2 Validação dos resultados da amostra

O software **ELITe InGenius** interpreta os resultados de PCR para os alvos (canais **mecA** e **SA**) e do Internal Control (Canal IC) com os parâmetros dos protocolos de ensaio **MRSA-SA ELITe_NS_200_50** e **MRSA-SA ELITe_BC_200_100**.

Os resultados são mostrados no ecrã “Result Display”.

Os resultados da amostra podem ser aprovados quando forem verdadeiras as duas condições reportadas na tabela abaixo.

Table 8

1) Positive Control	Estado
Positive control de MRSA/SA	APROVADO
Positive control de LGA251/SA	APROVADO
2) Negative Control	Estado
MRSA/SA - Negative Control	APROVADO

Os resultados da amostra são automaticamente interpretados pelo software **ELITe InGenius** usando os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo do ensaio). Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado.

Para cada amostra o sistema comunica uma combinação das seguintes mensagens a especificar se os ADN dos agentes patogénicos foram detetados ou não detetados.

Table 9

Resultado da execução da amostra	Interpretação
MRSA:detected (MRSA:detetado).	Foi detetado ADN de MRSA na amostra.
MRSA/SA:not detected or below the LoD (MRSA/SA não detetado ou abaixo de LoD)	Não foi detetado ADN de MRSA/SA na amostra. A amostra é válida negativa ou as concentrações alvo estão abaixo do limite de deteção do ensaio.
MRSA;not detected or below LoD, SA detected (MRSA não detetado ou abaixo de LoD, SA detetado)	Não foi detetado ADN MRSA na amostra. A amostra é negativa para este alvo ou a sua concentração está abaixo do Limite de deteção do ensaio, foi detetado SA
Invalid-Retest Sample (Inválido-Testar novamente a amostra)	Resultado do ensaio não válido devido a falha do Controlo Interno (extração incorreta, transferência de inibidores). O teste deve ser repetido.

Amostras reportadas como: "MRSA/SA:not detected or below the LoD (MRSA/SA não detetado ou abaixo de LoD)" são adequadas para análise mas não foi possível detetar ADN MRSA/SA. Neste caso não pode excluir-se que o ADN MRSA/SA esteja presente a uma concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver “[12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM ELITe InGenius e ELITe BeGenius page 19](#)”).

Amostras indicadas como “Invalid - Retest Sample” (Inválido - testar novamente amostra): neste caso, o ADN do Internal Control não foi detetado eficientemente devido a problemas nos passos de colheita, extração ou PCR da amostra (por ex. amostragem incorreta, degradação ou perda do ADN durante a extração ou inibidores na eluição), que pode causar resultados incorretos. Se subsistir volume da eluição suficiente, o eluato pode ser novamente testado através de uma execução da amplificação no modo “PCR Only” (apenas PCR). Se o segundo resultado for inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova amostra utilizando o modo “Extract + PCR” (ver “[18 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS page 38](#)”).

NOTE

Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados em combinação com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

Os resultados da execução da Amostra são guardados na base de dados e, se válidos, podem ser aprovados (Exibição dos resultados) pelos utilizadores “Administrator” (Administrador) ou “Analyst” (Analista), seguindo as instruções na GUI. A partir da janela “Result Display” (Exibição de resultados) é possível imprimir e guardar os resultados da execução da amostra como “Sample Report” (Relatório de amostra) e “Track Report” (Relatório de calha).

10.3.3 Elaboração do relatório do resultado da amostra

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e os relatórios podem ser exportados como "Sample Report" (Relatório da amostra) e "Track Report" (Relatório da calha).

O “Sample Report” (Relatório da amostra) apresenta os detalhes dos resultados pela amostra selecionada (SID).

O “Track Report” (Relatório do track) apresenta os detalhes do resultado pelo Rastreio selecionado.

O "Sample Report" (Relatório da amostra) e o "Track Report" (Relatório da calha) podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

11 PROCEDIMENTO ELITe BeGenius

O procedimento para uso do **MRSA/SA ELITe MGB Kit** com o **ELITe BeGenius** é composto por três passos:

Table 10

PASSO 1	Verificação da prontidão do sistema	
PASSO 2	Preparação da sessão	A) Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR])
		B) Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR]),
		C. Execução de Positive Control e do Negative Control (PCR Only (Apenas PCR))
PASSO 3	Revisão e aprovação de resultados	1) Validação dos resultados de Positive Control e Negative Control
		2) Validação dos resultados das amostras
		3) Elaboração do relatório do resultado da amostra

11.1 PASSO 1 - Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- ligue o **ELITe BeGenius** e inicie sessão no modo “CLOSED” (fechado),
- no menu “Controls” (Controlos) na página inicial, verifique se os controlos de PCR (**MRSA/SA - Positive Control**, **LGA251/SA Positive Control** e **MRSA/SA Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de **MRSA/SAPCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote de **MRSA/SA PCR Mix**, execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (ver “[9 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA ELITe InGenius and ELITe BeGenius page 8](#)”).

Se o protocolo do ensaio que precisa não estiver carregado no sistema, contacte o Serviço de Apoio ao cliente da ELITechGroup de sua localidade.

11.2 PASSO 2 - Configuração da sessão

O **MRSA/SA ELITe MGB Kit** pode ser usado no **ELITe BeGenius** para realizar:

- Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]),
- Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),
- Execução do Positive Control e Negative Control (apenas PCR).

Todos os parâmetros requeridos estão incluídos no protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente carregados quando o protocolo de ensaio é selecionado.

NOTE

O **ELITE BeGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite descarregar a informação da sessão. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Antes de configurar uma execução:

Descongele os tubos **PCR Mix** necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para **24 testes** em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

Proteja a **PCR Mix** da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

Para configurar um dos três tipos de execução, siga os passos abaixo diante da GUI:

Table 11

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução do Positive e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
1	Identifique amostras e, se necessário, descongele até à temperatura ambiente. Transfira 200 µL da amostra para um tubo Sarstedt de 2 mL anteriormente identificado.	Se necessário, descongele os tubos de eluição contendo os ácidos nucleicos extraídos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.	Descongele tubos de Positive Control (MRSA/SA Positive Control e LGA251/SA Positive Control) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 4 reações. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.
2	Descongele os tubos de CPE necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 12 extrações.	Não aplicável	Prepare o Negative Control transferindo pelo menos 50 µL de água de grau de biologia molecular para um “Elution tube” (Tubo de eluição), fornecido com o ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Selecione “ Perform Run ” (Executar) a partir do ecrã “Home”.	Selecione “ Perform Run ” (Executar) a partir do ecrã “Home”	Selecione “ Perform Run ” (Executar) a partir do ecrã “Home”.
4	Retire os Suportes da “Cooler Unit” e coloque-os na mesa de preparação.	Retire os “Racks” de “Lane 1, 2 and 3” (L1, L2, L3) da “Cooler Unit” e coloque-os na mesa de preparação	Retire os “Racks” de “Lane 1, 2 and 3” (L1, L2, L3) da “Cooler Unit” e coloque-os na mesa de preparação.
5	Selecione o “Run mode”: “ Extract + PCR ” (Extrair + PCR).	Selecione o “Run mode”: “ PCR Only ”.	Selecione o “Run mode”: “ PCR Only ”.
6	Carregue as amostras no “Sample Rack” (Suporte de amostras). Quando os tubos secundários “2 mL Tubes” forem carregados, use adaptadores azuis para o “Sample Rack” (Rack da amostra).	Carregue as amostras no “Elution Rack”(Rack de eluição).	Carregue os tubos de Positive Control e Negative Control no “Elution Rack”.

Table 11 (continued)

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução do Positive e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
7	Insira o "Sample Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 5" (L5). Se necessário, insira a "Sample ID" (SID) para cada "Position" usada (se os tubos secundários estiverem carregados, sinalize o "2 mL Tube"). Se os tubos secundários não possuírem código de barras, digite manualmente a "Sample ID").	Insira o "Elution Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 3" (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição), insira a "Sample ID" (Identificação da amostra), a "Sample matrix" (Matriz da amostra), o "Extraction kit" (Kit de extração) e o "Extracted eluate vol." (Volume de eluado extraído).	Insira o "Elution Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 3" (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição) introduza o "Reagent name" (Nome do reagente) e o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
8	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
9	Se forem processadas amostras de zara-gatoas nasais, certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o Volume de eluição extraído é de 50 µL. Se forem processadas amostras de hemocultura, certifique-se de que o "Volume de entrada de extração" é de 200 µL e que o "Volume de eluição extraído" é de 100 µL.	Se forem processadas amostras de zara-gatoas nasais, certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o Volume de eluição extraído é de 50 µL. Se forem processadas amostras de hemocultura, certifique-se de que o "Volume de entrada de extração" é de 200 µL e que o "Volume de eluição extraído" é de 100 µL.	Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o Volume de eluição extraído é de 50 µL" (com NS) ou "100 µL" (com BC).
10	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").
11	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
	NOTE		-
	Nota: Quando forem processadas mais de 12 amostras, repita o procedimento a partir do ponto 6.		
12	Coloque os "Elution tubes" (Tubo de eluição) no "Elution Rack" (rack de eluição) (os tubos de eluição podem ser etiquetados com código de barras para melhorar a capacidade de localização).	Não aplicável	Não aplicável
13	Insira o "Elution Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 3" (L3). Quando mais de 12 amostras forem processadas, repita usando a "Lane 2" (L2).	Não aplicável	Não aplicável
14	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Não aplicável	Não aplicável
15	Carregue o CPE e a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).	Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).	Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).

Table 11 (continued)

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução do Positive e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
16	Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) se estiver disponível, ou na "Lane 1" (L1). Se necessário, para cada reagente da PCR Mix e/ou CPE, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) se estiver disponível, ou na "Lane 1" (L1). Se necessário, para cada reagente da PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) se estiver disponível, ou na "Lane 1" (L1). Se necessário, para cada reagente da PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
17	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
18	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.
19	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
20	Carregue o "PCR Rack" com a "PCR Cassette" na área dos reagentes.	Carregue o "PCR Rack" com a "PCR Cassette" na área dos reagentes.	Carregue o "PCR Rack" com a "PCR Cassette" na área dos reagentes.
21	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
22	Carregue o "Extraction Rack" (rack de extração) com os cartuchos de extração "ELITE InGenius SP 200" e os consumíveis de extração necessários.	Não aplicável	Não aplicável
23	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
24	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

Quando a sessão é concluída, o **ELITe BeGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

NOTE

No final da execução a restante amostra extraída no **Elution tube** (Tubo de eluição) deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 ± 10 °C durante não mais de um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

NOTE

No final da operação, a **PCR Mix** pode ser retirada do instrumento, tapada e armazenada a -20 °C ou abaixo ou pode ser mantida no bloco frigorífico durante até 5 sessões de trabalho de 3 horas; misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a próxima sessão.

NOTE

No final da execução, o **Positive Control** restante deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C ou menos. Evite o derrame do Positive Control. O **Negative Control** restante deve ser eliminado.

NOTE

O **Positive Control** pode ser usado para 4 sessões separadas de 3 horas cada.

NOTE

No final da execução, a **PCR Cassette** e os outros consumíveis têm de ser eliminados seguindo todos os regulamentos governamentais e ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

11.3 PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

O **ELITe BeGenius** monitoriza os sinais de fluorescência do alvo e do Internal Control para cada reação e aplica automaticamente os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo de ensaio) para gerar curvas de PCR que são então interpretadas sob a forma de resultados.

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã “Results Display” (Exibição dos resultados). Neste ecrã são mostrados os resultados e informações sobre a execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios (“Sample Report” (Relatório da amostra) ou “Track Report” (Relatório da calha)). Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

O sistema **ELITe BeGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite carregar os resultados da sessão no centro de dados laboratoriais. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

O **ELITe BeGenius** gera os resultados com o **MRSA/SA ELITe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

1. Validação dos resultados de Positive Control e Negative Control,
2. Validação dos resultados da amostra,
3. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

NOTE

Para mais informações, consulte o mesmo parágrafo do Procedimento do **ELITe InGenius**.

12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM ELITe InGenius e ELITe BeGenius

12.1 Sensibilidade analítica: Limite de deteção

A sensibilidade analítica deste ensaio, como Limite de deteção (LdD) da amplificação de ADN, permite detetar a presença de cerca de 20 cópias em 10 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

O LdD deste ensaio foi testado usando o ADN de plasmídeos que contém os produtos de amplificação cuja concentração inicial foi medida pelo espetrofotômetro. O ADN de plasmídeos foi diluído a um título de 20 cópias/10 µL na presença de 40.000 cópias de internal control (CI) / 10 µL. Estas amostras foram testadas no ELITe InGenius em 18 réplicas a realizarem a amplificação por produtos ELITechGroup S.p.A. em dois instrumentos diferentes.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 12

Amostras	N	positivo	negativo	Mec A Ct média	SA Ct média
20 cópias de ADN de MRSA/SA de plasmídeo + 40.000 cópias de CI	18	17	1	35,04	34,43
20 cópias de ADN de LGA251/SA de plasmídeo + 40.000 cópias de CI	18	18	0	34,75	34,12

O valor teórico do LdD foi confirmado no ELITe InGenius e no ELITe BeGenius através do ensaio de 20 réplicas do plasmídeo MRSA/SA e 20 réplicas do plasmídeo LGA251/SA à concentração declarada (20 cópias/reação).

O LdD do método foi verificado no ELITe InGenius e no ELITe BeGenius testando amostras de zaragatoas nasais colhidas no eSwab, amostras de zaragatoas nasais colhidas no eNat e amostras de hemocultura, enriquecidas com MRSA/SA - ELITe Positive Control (tanto plasmídeo MRSA/SA como plasmídeo LGA251/SA) a 1000 cópias/mL para as zaragatoas nasais e 2000 cópias/mL para a hemocultura.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 13 Limite de deteção (cópias / mL) para amostras de zaragatoas nasais e hemocultura no ELITe InGenius e no ELITe BeGenius

Amostra	LdD (cópias/mL)
Zaragatoa nasal	1000
Hemocultura	2000

Os resultados obtidos confirmaram a concentração declarada para o alvo MRSA/SA tanto no ELITe InGenius como no ELITe BeGenius.

12.2 Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como a capacidade de reprodução do valor de um material de referência calibrado, foi avaliada utilizando como material de referência um painel QCMD 2014 Methicillin Resistant *S. aureus* EQA Panel (Qnistics Ltd, UK) de diluições de MRSA/SA dentro do limite de concentração. Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, utilizando o **ELITe InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 14 Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe InGenius

Amostra	Conteúdo da amostra	Resultado esperado	Resultado real
MRSADNA14-01	MRSA N315	MRSA Detected (MRSA detetado)	MRSA Detected (MRSA detetado)
MRSADNA14-02	MSSA ATCC 29213	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-03	MSSA 29213 + MRCoNS 634	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-04	E. coli ATCC 35218	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-05	MRSA N315	MRSA frequentemente detetado	MRSA Detected (MRSA detetado)
MRSADNA14-06	Apenas MHB	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-07	MRSA N315	MRSA detetado pouco frequentemente	MRSA Detected (MRSA detetado)

Table 14 Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe InGenius (continued)

MRSADNA14-08	MRSA mecC	MRSA detetado pouco frequentemente	MRSA Detected (MRSA detetado)
MRSADNA14-09	MRCoNS 634	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-10	MRSA ST398	MRSA Detected (MRSA detetado)	MRSA Detected (MRSA detetado)
MRSADNA14-11	MRSA N315	MRSA frequentemente detetado	MRSA Detected (MRSA detetado)
MRSADNA14-12	MRSA N315	MRSA Detected (MRSA detetado)	MRSA Detected (MRSA detetado)

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

A sensibilidade analítica do ensaio, como a capacidade de reprodução do valor de um material de referência calibrado, foi também avaliada utilizando como material de referência um painel NATtrol™ MRSA/SA Panel (Zeptometrix, US) de *S. aureus* ou *S. epidermidis*. Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, utilizando o **ELITe InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 15 Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe InGenius

Amostra	Resultado esperado	Resultado real
Estirpe na comunidade de <i>S. aureus</i> _MRSA	Positivo para MRSA	MRSA Detected (MRSA detetado)
Estirpe hospitalar de <i>S. aureus</i> _MRSA	Positivo para MRSA	MRSA Detected (MRSA detetado)
<i>S. aureus</i> _MSSA	Positivo para MSSA	MSSA detetado
<i>S. aureus</i> _MSSA – cassete vazia	Positivo para MSSA	MSSA detetado
<i>S. epidermidis</i> _MSSE HER 1292	Negativo	Negativo

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

12.3 Repetibilidade

A repetibilidade do ensaio foi avaliada nos instrumentos **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** através da análise de um painel de amostras eSwab nasais, incluindo uma amostra negativa e amostras positivas reforçadas com MRSA/SA - ELITe Positive Control.

Um exemplo dos resultados da repetibilidade intra-sessão (num dia) são mostrados nas tabelas abaixo.

Table 16 Repetibilidade intra-sessão no ELITe InGenius

Amostra	N	Alvo de MecA			Alvo de SA			% Con-cordância
		Ct médio	SD	% CV	Ct médio	SD	% CV	
Negativo	8	-	-	-	-	-	-	100%
3X LOD	8	33,10	0,24	0,73	32,89	0,31	0,93	100%
10X LOD	8	31,14	0,09	0,28	30,96	0,17	0,54	100%

Table 17 Repetibilidade intra-sessão no ELITe BeGenius

Amostra	N	Alvo de MecA			Alvo de SA			% Con-cordância
		Ct médio	SD	% CV	Ct médio	SD	% CV	
Negativo	8	-	-	-	-	-	-	100%
3X LOD	8	32,55	0,29	0,90	31,73	0,29	0,90	100%
10X LOD	8	31,01	0,23	0,75	30,17	0,31	1,03	100%

Um exemplo dos resultados da repetibilidade inter-sessão (em dois dias) são mostrados nas tabelas abaixo.

Table 18 Repetibilidade inter-sessão no ELITe InGenius

Amostra	N	Alvo de MecA			Alvo de SA			% Con-cordância
		Ct médio	SD	% CV	Ct médio	SD	% CV	
Negativo	16	-	-	-	-	-	-	100%
3X LOD	16	33,24	0,37	1,10	32,95	0,40	1,22	100%
10X LOD	16	31,51	0,69	2,20	31,38	0,74	2,37	100%

Table 19 Repetibilidade inter-sessão no ELITe BeGenius

Amostra	N	Alvo de MecA			Alvo de SA			% Con-cordância
		Ct médio	SD	% CV	Ct médio	SD	% CV	
Negativo	16	-	-	-	-	-	-	100%
3X LOD	16	32,69	0,36	1,10	31,86	0,34	1,07	100%
10X LOD	16	30,90	0,29	0,94	30,11	0,30	1,01	100%

No teste de repetibilidade, o MRSA/SA ELITe MGB Kit detetou todas as amostras conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV menor que 5%.

12.4 Reproduzibilidade

A reproduzibilidade do ensaio foi avaliada nos instrumentos **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** através da análise de um painel de amostras eSwab nasais, incluindo uma amostra negativa e amostras positivas reforçadas com MRSA/SA - ELITe Positive Control.

Um exemplo de reproduzibilidade inter-lote (em dois lotes) é apresentado nas tabelas abaixo.

Table 20 Repetibilidade inter-lote no ELITe InGenius

Amostra	N	Alvo de MecA			Alvo de SA			% Con-cordância
		Ct médio	SD	% CV	Ct médio	SD	% CV	
Negativo	16	-	-	-	-	-	-	100%
3X LOD	16	33,37	0,34	1,01	33,17	0,42	1,27	100%
10X LOD	16	31,58	0,67	2,11	31,61	0,64	2,01	100%

Table 21 Repetibilidade interlote no ELITe BeGenius

Amostra	N	Alvo de MecA			Alvo de SA			% Concordância
		Ct médio	SD	% CV	Ct médio	SD	% CV	
Negativo	16	-	-	-	-	-	-	100%
3X LOD	16	32,72	0,30	0,92	31,94	0,33	1,04	100%
10X LOD	16	31,01	0,21	0,67	30,25	0,25	0,83	100%

Um exemplo de reproduzibilidade inter-instrumento (em dois lotes) é apresentado nas tabelas abaixo.

Table 22 Reproduzibilidade inter-instrumento no ELITe InGenius

Amostra	N	Alvo de MecA			Alvo de SA			% Concordância
		Ct médio	SD	% CV	Ct médio	SD	% CV	
Negativo	16	-	-	-	-	-	-	100%
3X LOD	16	32,94	0,47	1,44	33,04	0,39	1,18	100%
10X LOD	16	30,97	0,38	1,23	31,09	0,43	1,37	100%

Table 23 Capacidade de reprodução interinstrumento no ELITe BeGenius

Amostra	N	Alvo de MecA			Alvo de SA			% Concordância
		Ct médio	SD	% CV	Ct médio	SD	% CV	
Negativo	16	-	-	-	-	-	-	100%
3X LOD	16	32,83	0,21	0,65	32,18	0,26	0,82	100%
10X LOD	16	30,92	0,25	0,81	30,32	0,20	0,68	100%

No teste de reproduzibilidade, o MRSA/SA ELITe MGB Kit detetou todas as amostras conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV inferior a 5%.

12.5 Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada em associação com o ELITe InGenius através da análise de amostras clínicas de zaragatoa nasal e hemocultura negativas para MRSA/SA.

Dado que o **ELITe BeGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITe InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a especificidade de diagnóstico do ensaio obtida em associação com o **ELITe InGenius** é também aplicável ao **ELITe BeGenius**.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 24

Amostras	N	positivo	negativo	% de especificidade do diagnóstico
Amostras de zaragatoas nasais negativas para ADN de MRSA/SA	48	0	48	100
Amostras de hemocultura negativas para ADN de MRSA/SA	34	0	34	100

O valor-limite de Ct do IC está definido para 29 para amostras de zaragatoas e hemocultura nasais quando testadas com o ELITe InGenius e o ELITe BeGenius.

12.6 Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada em associação com o **ELITe InGenius** através da análise de amostras clínicas de zaragatoa nasal, positivas para MRSA ou MSSA, ou enriquecidas com ADN de MRSA adicionando MRSA BAA-1556 (ATCC) a um título de 100.000 UFC/mL, e de hemocultura positiva para MRSA e MSSA ou enriquecida com isolados de MRSA, dada a dificuldade de encontrar um número significativo de amostras clínicas positivas para alguns genes de MRSA alvo.

Dado que o **ELITe BeGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITe InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a sensibilidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o **ELITe InGenius** também se aplica ao **ELITe BeGenius**.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 25

Amostras	N	positivo	negativo	% de sensibilidade de diagnóstico
Amostras de zaragatoas positivas para ADN de MSSA	60	56	4	93
Amostras de zaragatoas positivas para ADN de MRSA	41	40	1	98
Amostras de hemocultura positivas para ADN de MSSA	39	39	0	100
Amostras de hemocultura positivas para ADN de MRSA	31	31	0	100

13 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA OUTROS SISTEMAS

13.1 Amostras

Este produto deve ser utilizado com o **ADN extraído** das seguintes amostras clínicas.

As amostras de zaragatoas nasais, destinadas à extração de ADN, devem ser colhidas com gel BBL Culture Swab Plus Amies sem zaragatoas carvão (Becton-Dickinson) e identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais.

As amostras de zaragatoas nasais devem ser transportadas e armazenadas a +18 / +25 °C durante até um máximo de um dia; caso contrário, têm de ser armazenadas a +2 / +8 °C durante até sete dias. As amostras de zaragatoas nasais têm de ser imersas em 1 mL de caldo de soja Trypticase (TSB) e submetidas a vórtice durante 10 segundos antes do dar início ao procedimento de extração.

NOTE

Quando extrair ADN com o sistema «**NucliSENS® easyMAG®**», utilize a configuração seguinte.

Defina os parâmetros da extração conforme se segue:

- Matriz = Outro
- Protocolo = Genérico 2.0.1
- Volume (mL) = 1,0 mL
- Eluição (µL) = 50 µL
- Tipo = Primário

Transfira **1 mL** de cada amostra TSB para um recipiente de amostras descartável de 8 poços conforme estabelecido na lista de trabalho do instrumento e distribua o tampão de lise. Durante os 10 minutos de incubação, prepare a suspensão de sílica magnética para 8 amostras misturando **550 µL** de **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**, **545 µL** de **água de qualidade para biologia molecular** e **5 µL** de **CPE**. Para cada amostra, use o pipetador BioHit para distribuir 125 µL de suspensão de sílica magnética para a tira NucliSENS easyMAG Strip para pré-mistura. Utilize o pipetador BioHit para transferir 100 µL de suspensão de sílica magnética para cada amostra no recipiente de amostras descartável de 8 poços, misturando bem para cima e para baixo com uma pipeta e, em seguida, dê início ao procedimento de extração.

13.2 Substâncias interferentes

Substâncias que podem interferir na deteção de SA e MRSA usando o **MRSA/SA ELITe MGB Kit** e gerar resultados potencialmente inválidos incluem o propilenoglicol e quantidades excessivas de secreções nasais/muco.

As substâncias exógenas listadas abaixo, que são componentes de descongestionantes e substâncias usadas no alívio da secura e/ou irritação nasal demonstraram, à exceção do propilenoglicol, não interferir na deteção de MRSA / SA usando o **MRSA/SA ELITe MGB Kit**. Não foi demonstrado que a presença de sangue humano na amostra não interfira na deteção de MRSA / SA usando o **MRSA/SA ELITe MGB Kit** em associação com **NucliSENS® easyMAG®**.

Table 26

Substâncias potencialmente interferentes (tipo)	Princípio ativo	Interfere?
Mucina, glândula submaxilar de bovino, tipo I-S	Proteína de mucina purificada	Não
Sangue (humano)	Hemoglobina	Não
Sprays ou gotas nasais	Fenilefrina	Não
	Oximetazolina	Não
	Cloreto de sódio com conservantes	Não
	Cloreto de benzalcônio	Não
	Fosfato de sódio	Não
	Fenilcarbinol	Não
	Propilenoglicol	Sim
	Sorbitol, álcool benzílico	Não
	edetato dissódico, hipromelose	Não
	ácido fosfórico	Não

Table 26 (continued)

Substâncias potencialmente interferentes (tipo)	Princípio ativo	Interfere?
Corticosteróides ou gotas nasais	Dexametasona	Não
	Triamcinolona	Não
	Beclometasona	Não
	Flunisolida	Não
	Budesonida	Não
	Mometasona	Não
	Fluticasona	Não
Gel nasal	Luffa opperculata, enxofre	Não
Medicamentos homeopáticos para alívio de alergias	Galphimia glauca	Não
	Histaminum hydrochloricum	Não
Vacina	Vacina do vírus vivo contra influenza intranasal	Não
Lozenges garganta, anestésicos e analgésicos orais	Benzocaína, mentol	Não
Medicamentos anti-víricos	Zanamivir, fosfato oseltamivir	Não
Antibiótico, creme nasal	Mupirocina	Não
Antibacteriano, sistémico	Tobramicina	Não

Foram obtidos dados experimentais de interferências usando a extração NucliSENS® easyMAG® e a plataforma de deteção 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, com uma versão anterior do **MRSA/SA ELITe MGB Kit** do ensaio, que é idêntico ao ensaio atual exceto no facto de os oligonucleótidos específicos de *mecC* estarem ausentes.

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por outros fármacos antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossupressores.

Uma elevada quantidade de ADN genómico humano no ADN extraído da amostra pode inibir a reação de amplificação.

13.3 Controlos de amplificação

É obrigatório validar cada sessão de amplificação com uma reação de Negative Control e uma reação de Positive Control.

Para o Negative Control, utilize água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit).

Para o Positive Control, utilize o produto **MRSA/SA - ELITePositive Control** (não fornecido com este kit).

13.4 Controlos da qualidade

Recomenda-se a validação de todo o procedimento de análise de cada sessão de extração e amplificação, através do processamento de uma amostra testada negativa e uma amostra testada positiva ou um material de referência calibrado.

14 PROCEDIMENTO NOUTROS SISTEMAS

14.1 Definição da sessão de amplificação em tempo real

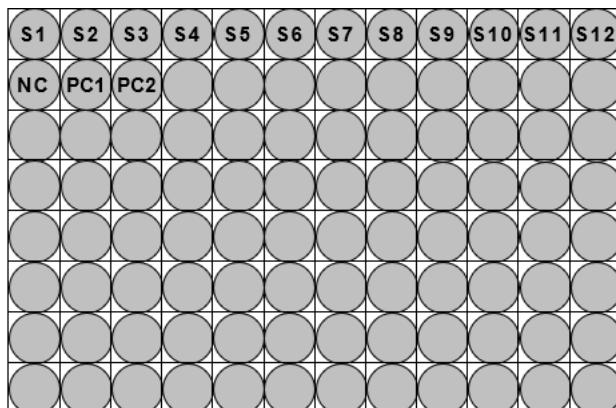
(Para realizar na área de amplificação/deteção de produtos de amplificação)

Quando é usado um **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**.

Antes de iniciar a sessão, siga as recomendações do fabricante fornecidas na documentação do instrumento e:

- ligue o computador, ligue o ciclo térmico em tempo real, execute o software dedicado, abra uma sessão de "quantificação absoluta"
- quando é usado o **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, escolha a definição "Run mode: Fast 7500"
- crie um novo "detector" (detetor) ou defina o detetor apropriado no menu Tool (Ferramenta), selecionando o Gestor de Detetores:
 1. defina o "detector" (detetor) para a sonda do gene específica do SA com o "reporter" (reportador) = "TAMRA" (AP554 é semelhante ao TAMRA) e o "quencher" (inativador) = "none" (nenhum) (não fluorescente)" e dê-lhe o nome "SA";
 2. defina o "detector" (detetor) para a sonda do gene específica do SA com o "reporter" (reportador) = "TAMRA" (AP554 é semelhante ao TAMRA) e o "quencher" (inativador) = "none" (nenhum) (não fluorescente)" e dê-lhe o nome "SA";
 3. defina o "detector" (detetor) para as sondas do gene *mecA* e *mecC* com o "reporter" (reportador) = "FAM", o "quencher" (inativador) = "none" (nenhum) (não fluorescente) e dê-lhe o nome "mecA";
 4. defina o "detector" (detetor) para a sonda de Internal Control com o "reporter" (reportador) = "Cy5" (AP642 é semelhante ao Cy5), o "quencher" (inativador) = "none" (nenhum) (não fluorescente) e dê-lhe o nome "IC";
- vá ao menu View (Ver), selecione o inspetor de poços e, para cada poço em utilização na microplaca, defina o "detector" (detetor) (tipo de fluorescência a ser medida), a "passive reference" (referência passiva) = "ROX" (AP593 é semelhante ao ROX, normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, negative control da amplificação, positive control da amplificação). Adicione esta informação à Ficha de trabalho anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

Consulte abaixo um exemplo da forma como a análise qualitativa das 12 amostras pode ser organizada.



Legenda: **S1 -S12:** Amostras a serem analisadas; **NC:** Negative Control da amplificação;

PC1: amplificação de Positive Control de MRSA/SA; **PC2:** amplificação Positive Control de LGA251/SA

Consultando a documentação do instrumento, definida no software dedicado (Instrumento > Protocolo de ciclo térmico > Perfil térmico) os parâmetros do **ciclo térmico**:

- adicione à etapa de amplificação (Adicionar passo) um **passo de extensão a 72 °C**;

NOTE

A aquisição de fluorescência (Instrumento > Protocolo do ciclo térmico > Definições > Recolha de dados) deve ser definida durante o passo de hibridização a 56 °C.

- modifique o tempo como indicado na tabela "Ciclo térmico" abaixo;
- defina o número de ciclos para **45**;
- defina o volume de reação para **30 µL**.

Table 27

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Tempo
Descontaminação	50 °C	2 min.
Desnaturação inicial	93 °C	2 min.
Amplificação e deteção (45 ciclos)	93 °C	10 seg.
	56 °C (recolha de dados)	30 seg.
	72 °C	15 seg.

14.2 Preparação da amplificação

(A ser realizado na área de extração/preparação da reação de amplificação)

Antes de iniciar a sessão, é necessário:

- retire e descongele os tubos que contêm as amostras a serem analisadas. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
 - retire e descongele os tubos da **MRSA/SA PCR Mix** necessários para a sessão, sem esquecer que cada tubo é suficiente para a preparação de **25 reações**. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
 - retire e descongele um tubo de **Positive Control de MRSA/SA** (controlo positivo das reações de amplificação em tempo real para o gene específico de SA e o gene *mecA*). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo durante um máximo de quatro horas;
 - retire e descongele um tubo de **Positive Control de LGA251/SA** (controlo positivo das reações de amplificação em tempo real para o gene *mecC*). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo durante um máximo de quatro horas;
 - pegue na **microplaca da amplificação** que será usada durante a sessão, tendo cuidado para manusear a mesma com luvas sem pó e para não danificar os furos.
1. Distribua exatamente **20 µL** da **MRSA/SA PCR Mix** no fundo dos poços da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Evite a criação de bolhas

NOTE

Se não usar a totalidade da mistura de reação, guarde o volume restante num local escuro a -20 °C durante um período máximo de um mês. Congele e descongele a mistura de reação um máximo de **5 vezes**.

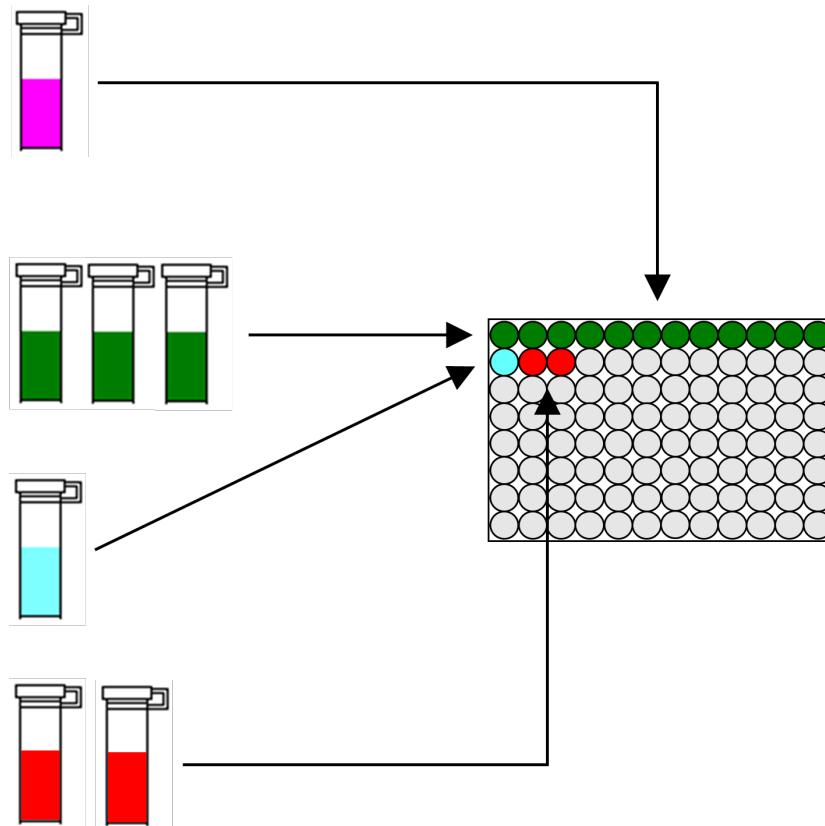
2. Adicione à mistura de reação **10 µL** da primeira amostra processada no poço designado, conforme anteriormente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem a amostra introduzindo com a pipeta o **ADN extraído** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma para as outras amostras extraídas.
3. Adicione **10 µL** à mistura de reação de **água de qualidade para biologia molecular** (não fornecida) no poço de negative control, conforme anteriormente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o controlo negativo introduzindo com a pipeta a **água de qualidade para biologia molecular** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
4. Adicione à mistura de reação **10 µL** de **MRSA/SA Positive Control** no poço designado, conforme anteriormente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o standard introduzindo com a pipeta o **MRSA/SA Positive Control** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

5. Adicione à mistura de reação 10 µL de **LGA251/SA Positive Control** no poço designado, conforme anteriormente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o standard introduzindo com a pipeta o **positive control de LGA251/SA** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
6. Vede com precisão a **microplaca da amplificação** com recurso à **folha adesiva da amplificação**.
7. Transfira a **microplaca de amplificação** para o ciclo térmico em tempo real na área de amplificação/detecção de produtos de amplificação e inicie o ciclo térmico para a amplificação. Guarde a definição da sessão com um nome de ficheiro unívoco e reconhecível (por ex., "ano-mês-dia-MRSA/SA-EGSpA").

NOTE

No final do ciclo térmico, a **microplaca da amplificação** com os produtos de reação devem ser removidos do instrumento e descartados sem produzir contaminações ambientais. Para evitar derramar os produtos de reação, a **folha adesiva da amplificação não deve ser removida da microplaca da amplificação**.

A figura seguinte mostra resumidamente a preparação da reação de amplificação



1. **Adicione 20 µL de PCR Mix**
2. **Adicione 10 µL de ADN extraído**
3. **Adicione 10 µL de Negative Control**
4. **Adicione 10 µL de Positive Control**

14.3 Análise qualitativa dos resultados

Os valores registados da fluorescência emitida pela sonda do gene específico de SA (detetor TAMRA "SA"), pelas sondas do gene *mecA* e *mecC* (detetor FAM "mecA") e pela sonda de controlo interno (detetor Cy5 "IC") nas reações de amplificação devem ser analisados pelo software do instrumento.

Antes de iniciar a análise, siga as recomendações do fabricante fornecidas na documentação do instrumento e:

- defina (Resultados > Traçado de amplificação > delta Rn vs. Ciclo) as **Definições da análise** para todos os detectores para **Base de referência automática** e **Ct manual**, com o **Limiar** definido para **0,1**. Prima o botão **Analizar e guarde** os resultados.

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas específicas na reação de amplificação e o valor do **Limiar** de fluorescência permitem determinar o **Ciclo do limiar (Ct)**, o ciclo em que a fluorescência alcançou o valor do **Limiar**. A Ct é o ciclo quando a fluorescência atinge o valor do **Limiar** e é proporcional à quantidade do alvo inicial.

Nas reações de amplificação de **Positive Control de MRSA/SA** and **Positive Control de LGA251/SA**, os valores da **Ct** dos detectores de SA e mecA (Resultados > Relatório) são usados para validar a amplificação e a deteção, conforme descrito na tabela seguinte:

Table 28

Positive Control reaction detector TAMRA "SA"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 35	POSITIVO	CORRETO

Table 29

Detetor de reação de Positive Control FAM "mecA"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 35	POSITIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação dos **Positive Controls** for **Ct > 35** ou **Ct indeterminada** para os detectores de SA e mecA, o ADN do alvo não foi corretamente detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou do positive control, degradação da mistura de reação ou do positive control, definição incorreta da posição do positive control, definição incorreta do ciclo térmico) que podem originar resultados incorretos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Na reação de amplificação de **Negative Control**, os valores de **Ct** de SA, mecA e os detectores IC (Resultados > Relatório) são usados para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Table 30

Detetor de reação de Negative Control TAMRA "SA"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct indeterminada ou Ct > 35	NEGATIVO	CORRETO

Table 31

Detetor de reação de Negative Control FAM "mecA"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct indeterminada ou Ct > 35	NEGATIVO	CORRETO

Table 32

Detetor de reação de Negative Control Cy5 "IC"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
CT indeterminada ou Ct ≥ 34	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da amplificação do **Negative Control** for **Ct ≤ 35**, para detectores SA e ou mecA, e **Ct < 34** para o detetor IC, o ADN do alvo foi incorretamente detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação (contaminação), que podem originar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Em cada reação de amplificação da **amostra**, os valores da **Ct** dos detetores de *mecA* e *SA* são usados para determinar o ADN do alvo, enquanto o valor de **Ct** do Controlo Interno é usado para validar a extração, amplificação e deteção.

NOTE

Verifique com o software do instrumento (Resultados > Lote de amplificação > delta Rn vs Ciclo) que o **Ct** foi determinado por um aumento súbito e regular da fluorescência e não por picos ou um aumento do fundo (fundo irregular ou alto).

Os valores da **Ct** das reações de amplificação de cada **amostra** (Resultados > Relatório) são usados como descrito na tabela seguinte:

Table 33

Reação da amostra				Resultado do ensaio	
detetor TAMRA "SA" (Ct1)	detetor FAM "mecA" (Ct2)	$\Delta Ct Ct1 - Ct2 $	detetor Cy5 "IC"	Resultado de SA	Resultado de MRSA
Indeterminado ou Ct > 35	Indeterminado ou Ct > 35	N/A	Ct < 34	Negativo	Negativo
		N/A	Indeterminado ou Ct \geq 34	Inválido	Inválido
Determinado, Ct \leq 35	Indeterminado ou Ct > 35	N/A	N/A	Positivo	Negativo
	Determinado, Ct \leq 35	$\Delta Ct \geq 2$	N/A	Positivo	Negativo
		$\Delta Ct < 2$	N/A	Positivo	Positivo
Indeterminado ou Ct > 35	Determinado, Ct \leq 35	N/A	N/A	Negativo	Negativo

Table 34

Resultado do ensaio		Interpretação do resultado
Resultado de SA	Resultado de MRSA	
Negativo	Negativo	Não foi detetado ADN de SA, incluindo MRSA. Presumivelmente negativo para todo o SA, incluindo MRSA, ou o número de organismos pode estar abaixo do limite de deteção.
Inválido	Inválido	Resultado inválido. Repita a execução da extração da amostra ou de uma nova amostra.
Positivo	Negativo	Não foi detetado ADN de MRSA. Presumivelmente negativos para MRSA ou o número de MRSA pode estar abaixo do limite de deteção. ADN de SA detetado. Presumivelmente positivo para SA.
Positivo	Positivo	ADN de MRSA detetado. Presumivelmente positivo para MRSA.

NA = não aplicável

A presença de ambos os marcadores (gene *SA* e *mecA*) medidos pelo valor da **Ct** à mesma quantidade relativa (uma diferença na **Ct** inferior a 2) é indicativa de MRSA (incluindo uma estirpe *mecC*); quantidades relativas diferentes (uma diferença na **Ct** superior ou igual a 2) ou a presença apenas do marcador do gene específico do *Staphylococcus aureus* é indicativo de SA.

Se o resultado da reação de amplificação da amostra for **Ct indeterminada** ou **Ct > 35** para o detetor SA e *mecA* e **CT indeterminada** ou **Ct ≥ 34** para o detetor IC, isto significa que foi impossível detetar eficientemente o ADN do controlo interno. Neste caso, ocorreram problemas durante o passo de amplificação (amplificação ineficiente ou inexistente) ou durante o passo de extração (degradação do ADN, perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores no ADN extraído) que podem originar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio é inválido e precisa de ser repetido, começando pela extração da amostra ou de uma nova amostra do mesmo paciente.

Se o resultado da amplificação da amostra for **Ct indeterminada** ou **Ct > 35** para o detetor SA e **Ct < 34** para o detetor IC, isto significa que o ADN de SA (incluindo MRSA) não foi detetado na amostra processada. A amostra é presumivelmente negativa ou o número de organismos na amostra está abaixo do limite de deteção do produto (consulte [15 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑHO COM OUTROS SISTEMAS page 32](#)). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

NOTE

Quando é detetado ADN de SA ou MRSA numa amostra, o detetor IC pode ser **Ct indeterminada** ou **Ct ≥ 34**. Com efeito, a elevada eficiência da amplificação de SA ou MRSA pode competir com a baixa eficiência da amplificação do controlo interno. Neste caso, a amostra é adequada e o resultado positivo do ensaio é válido.

15 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑHO COM OUTROS SISTEMAS

15.1 Desempenho clínico

As características de desempenho do ensaio foram determinadas através da comparação do **MRSA/SA ELITe MGB Kit** utilizado em associação com o **NucliSENS® easyMAG®** com Remel Spectra™ MRSA e/ou testes de aglutinação/susceptibilidade. Foi definida uma amostra positiva para cultura de MRSA verdadeira como uma amostra, em que MRSA foi identificado por qualquer uma das técnicas de cultura utilizadas. Uma amostra positiva para cultura de SA sensível à meticilina verdadeira foi definida como uma amostra negativa para todas as técnicas de cultura usadas, à exceção do teste de aglutinação de látex.

Foi colhida de cada paciente uma zaragatoa nasal que foi usada para inocular uma placa de ágar de rastreio de MRSA cromogénica seletiva (MRSA Remel Spectra™). Em seguida, a zaragatoa foi inserida num tubo com caldo de soja trypticase e bem misturada, antes de todo o volume da suspensão celular ser processado conforme descrito anteriormente. Cada zaragatoa foi então sujeita a reforço de caldo de soja Trypticase com NaCl a 6,5%. As amostras de cultura reforçadas foram inoculadas com placas de ágar de sangue de soja trypticase. Foram usadas colónias de placas de ágar de sangue de soja trypticase para o teste de aglutinação de látex (Remel Staphaurex®). Foram usadas amostras positivas para aglutinação de látex no teste de susceptibilidade da cefoxitina (BD BBL™ Sensi-Disc™ Susceptibility Test Disc Cefoxitin 20), conforme instruído nas respetivas instruções de utilização.

O desempenho do **MRSA/SA ELITe MGB Kit** foi calculado face à combinação da cultura cromogénica direta e da cultura do caldo, seguido dos resultados do teste de aglutinação de látex e susceptibilidade à cefoxitina.

As amostras de zaragatoas nasais foram obtidas junto de uma organização de saúde e de dadores saudáveis e foram testadas por uma combinação de métodos de cultura, conforme descrito acima. Foram assim identificadas 20 amostras positivas para cultura da MRSA, 20 positivas para cultura da MSSA e 40 negativas para cultura de SA. Em 40 amostras negativas para cultura de SA, 20 amostras foram reforçadas com a estirpe BAA-2312 de MRSA (contendo o gene *mecC*) próximo do nível do LdD.

Em comparação com o método de referência da cultura, o **MRSA/SA ELITe MGB Kit** identificou 100% de amostras positivas para MRSA e *mecC* de MRSA usando o método de referência (sensibilidade de diagnóstico) e 97,5% das amostras negativas (especificidade do diagnóstico). Para as amostras testadas, o valor preditivo positivo de MRSA (PPV) foi de 97,6% e o valor preditivo engativo de MRSA (NPV) foi de 100%.

Table 35 Resultados de MRSA obtidos com o MRSA/SA ELITe MGB Kit em comparação com o método de referência.

	Sensibilidade de diagnóstico do <i>mecA</i> de MRSA	Sensibilidade do diagnóstico de <i>mecC</i> de MRSA	Especificidade do diagnóstico de MRSA
7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument	100%	100%	97,5%
7500 Real Time PCR System	100%	100%	97,5%

Em comparação com o método de referência da cultura, o **MRSA/SA ELITe MGB Kit** identificou 95% de amostras positivas (sensibilidade de diagnóstico) para SA usando o método de referência e 100% das amostras negativas (especificidade do diagnóstico). Para as amostras testadas, o valor preditivo positivo de SA (PPV) foi de 100% e o valor preditivo negativo de SA (NPV) foi de 95%.

Table 36 Resultados de SA obtidos com o MRSA/SA ELITe MGB Kit em comparação com o método de referência

	Sensibilidade de diagnóstico de SA	Especificidade de diagnóstico de SA
7500 Fast dx Real Time PCR Instrument	95%	100%
7500 Real Time PCR System	95%	100%

15.2 Limite de deteção

O Limite de Deteção (LdD) do **MRSA/SA ELITe MGB Kit** usado em associação com o **NucliSENS® easyMAG®** foi determinado usando as estirpes mostradas abaixo. As culturas destas estirpes foram quantificadas, diluídas em matrizes nasais simuladas para valores num intervalo de cerca de 5 a 1500 unidades formadoras de colónia (CFU) e absorvidas nas zaragatoas. Todas as diluições foram testadas, e o LdD foi determinado por análise Probit. O LdD para cada estirpe representa o número mais baixo de CFU/zaragatoa ao qual um resultado positivo pode ser obtido com 95% de probabilidade e com pelo menos 95% de confiança. O LdD para cada estirpe foi então verificado testando pelo menos 20 réplicas.

Table 37 Lista de estirpes bacterianas para estudos de determinação do LdD

Nº da estirpe	Designação	Descrição	Resistentes aos fármacos
ATCC 29213	Wichita	Estirpe QC	MSSA
ATCC BAA-1556	MRSA252	adquirida em contexto hospitalar, Reino Unido	MRSA
ATCC BAA-2312	M10/0061	LGA251	MRSA

Table 38 Resultados do limite de deteção (CFU/zaragatoa)

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

15.3 Eficiência de deteção do genótipo (inclusividade)

O desempenho do **MRSA/SA ELITE MGB Kit** utilizado em associação com o **NucliSENS® easyMAG®** foi testado com o painel de proficiência MRSA/SA QCMD. Todas as estirpes foram corretamente identificadas. Para além desse ensaio,¹ foi testado contra 75 isolados de MRSA e SA sensíveis à meticilina bem caracterizados, representativos da diversidade genética global, incluindo complexos clonais e tipos de sequência, bem como vários tipos de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e valores de CIM (concentração inibitória mínima).

As amostras foram obtidas junto do Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA) Program e da American Tissue Culture Collection (ATCC) ou foram cedidas pelo Medical College of Wisconsin.²

Todas as estirpes foram absorvidas nas zaragatoas próximas do limite de deteção e testadas. Além disso, todas as estirpes de SA sensíveis à meticilina foram testadas a 1×10^6 CFU/zaragatoa. Todas as estirpes de SA sensíveis à meticilina testaram positivo para SA e negativo para MRSA. Todas as estirpes de MRSA testaram positivo para MRSA. Dois isolados BORSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina limítrofes) sem o gene *mecA* testaram positivo para SA e negativo para MRSA, o que perfaz uma eficácia global da deteção do genótipo (inclusividade) de 97,3%

A análise das regiões escolhidas para a hibridização dos primers e das sondas fluorescentes no alinhamento das sequências disponíveis na base de dados para os elementos *mecA* de SSC incluindo *mecC* revelou a respetiva conservação e ausência de mutações significativas.

15.4 Especificidade analítica (Reatividade cruzada)

A análise do alinhamento das sequências dos primers de SA e da sonda fluorescente com as sequências de espécies filogeneticamente relacionadas com o *Staphylococcus aureus*, microrganismos patogénicos e microrganismos comumente presentes na microflora nasal normal disponíveis em bases de dados para organismos que não o SA, demonstrou a sua especificidade e a ausência de homologia significativa para o **MRSA/SA ELITE MGB Kit**.

Table 39 Espécies testadas quanto a reatividade cruzada pela análise da base de dados de sequência

Espécies de <i>Staphylococci</i>		Outros organismos	Vírus
<i>Staphylococcus arlettae</i>	CoNS	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Adenovírus tipo 1, 7</i>
<i>Staphylococcus capitis</i>	CoNS	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Coronavírus humano 229E, OC 43</i>
<i>Staphylococcus carnosus</i>	CoNS	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Citomegalovírus</i>
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	CoNS	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Coxsackievírus A21</i>
<i>Staphylococcus delphini</i>	MSCoPS	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Vírus Epstein-Barr</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MSCoNS	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	<i>Vírus influenza humano A, B</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MRCoNS	<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Vírus parainfluenza humano 1,2 (taxid:3,4)</i>
<i>Staphylococcus equorum</i>	CoNS	<i>Corynebacterium flavescent</i>	<i>Metapneumovírus humano</i>
<i>Staphylococcus felis</i>	CoNS	<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Vírus do sarampo</i>
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	CoNS	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Vírus da papeira</i>
<i>Staphylococcus hyicus</i>	CoPS	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Vírus sincicial respiratório</i>

1. foram obtidos dados experimentais de interferências usando o sistema de extração NucliSENS® easyMAG® e o instrumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR com uma versão anterior do ensaio, que é idêntico ao ensaio atual exceto no facto de os oligonucleótidos específicos de *mecALGA251* estarem ausentes.
2. Cedidas pelo Dr. Nathan A. Ledebouer, Medical College of Wisconsin, WI; as estirpes foram descritas em: Buchan, B. W. Ledebouer, N. A. Identificação de duas estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina limítrofes provenientes de amostras de zaragatoas de narinas de rotina por um de três ágaros cromogénicos avaliados para a deteção de MRSA, microbiologia e doenças infeciosas. 2010:134:921-927

Table 39 Espécies testadas quanto a reatividade cruzada pela análise da base de dados de sequência (continued)

Espécies de <i>Staphylococci</i>		Outros organismos	Vírus
<i>Staphylococcus intermedius</i>	CoPS	<i>Enterococcus flavesiens</i>	Rinovírus
<i>Staphylococcus kloosii</i>	CoNS	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
<i>Staphylococcus latus</i>	CoNS	<i>Enterococcus hirae</i>	
<i>Staphylococcus pulvereri</i>	CoNS	<i>Escherichia coli</i>	
<i>Staphylococcus simulans</i>	CoNS	<i>Klebsiella oxytoca</i>	
<i>Staphylococcus warneri</i>	CoNS	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ,	
<i>Staphylococcus xylosus</i>	MSCoNS	<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>	
		<i>Neisseria meningitidis</i>	
		<i>Streptococcus mutans</i>	
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
		<i>Streptococcus pyogenes</i>	
		<i>Homo sapiens</i>	

CoNS = *Staphylococcus coagulase negativo*.

MSCoNS= *Staphylococcus coagulase sensível à meticilina*.

MSCoNS= *Staphylococcus coagulase resistente à meticilina*.

CoPS= *Staphylococcus coagulase positivo*.

15.5 Capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como capacidade de reprodução dos resultados comparada com os resultados obtidos com recurso a outros ensaios em diferentes laboratórios, foi verificada através de testes a um painel de material de referência certificado.

Foram realizados testes utilizando como material de referência calibrado e certificado um painel de diluições de MRSA (QCMD 2010 Methicillin Resistant *S. aureus* EQA Panel). O painel é composto por seis amostras contendo concentrações variáveis de MRSA, três amostras contendo *Staphylococcus aureus* (MSSA) sensíveis à meticilina, uma amostra contendo Staphylococci (MRCoNS) coagulase negativos resistentes à meticilina, uma amostra contendo *Escherichia coli* (*E. coli*) e uma amostra negativa verdadeira. Cada ponto do painel foi testado em 2 réplicas através da realização do procedimento de toda a análise: extração com o **NucliSENS® easyMAG®** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Table 40 Testes com material de referência certificado

Identificação da amostra	Conteúdo	Conc. da amostra CFU/mL	Resultado esperado	Resultado real
MRSADNA10-04	MRSA	1×10^8	Frequentemente detetado	Detetado
MRSADNA10-03	MRSA	5×10^7	Frequentemente detetado	Detetado
MRSADNA10-01	MRSA	5×10^6	Frequentemente detetado	Detetado
MRSADNA10-09	MRSA	5×10^5	Frequentemente detetado	Detetado
MRSADNA10-08	MRSA	5×10^5	Frequentemente detetado	Detetado
MRSADNA10-02	MRSA	5×10^5	Detetado	Detetado
MRSADNA10-05	MSSA	5×10^6	MRSA Negativo	Negativo para MRSA Positivo para SA
MRSADNA10-06	MSSA	1×10^7	MRSA Negativo	Negativo para MRSA Positivo para SA
MRSADNA10-07	MSSA	5×10^6	MRSA Negativo	Negativo para MRSA Positivo para SA
MRSADNA10-12	MRCoNS	1×10^7	Negativo	Negativo
MRSADNA10-10	<i>E. coli</i>	5×10^6	Negativo	Negativo
MRSADNA10-11	Apenas MHB	-	Negativo	Negativo

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

15.6 Transferência / contaminação cruzada

Foi realizado um estudo analítico para avaliar o potencial de contaminação cruzada entre amostras de MRSA elevado (1×10^7 CFU/mL) e amostras negativas, através do fluxo de trabalho do **MRSA/SA ELITE MGB Kit**. Dois operadores realizaram cinco execuções de extração de 24 amostras (11 amostras de MRSA elevado, 11 amostras negativas, 1 amostra de positive control e 1 amostra de negative control por execução) numa padrão quadriculado (amostras de MRSA elevado interrompidas por amostras completamente negativas). As amostras processadas foram então amplificadas em cinco execuções separadas usando dois padrões quadriculados diferentes. O teste da contaminação cruzada deu origem a zero falsos negativos de cinquenta, cinco amostras positivas para MRSA alto e uma amostra falsa positiva em cinquenta e cinco amostras negativas.

Foram obtidos dados de transferência/contaminação cruzada usando o sistema de extração NucliSENS® easyMAG® e o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, com uma versão anterior do ensaio, **MRSA/SA ELITE MGB Kit**, que é idêntico ao atual exceto no facto de os oligonucleótidos específicos de *mecC* estarem ausentes.

NOTE

Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com os instrumentos estão registados na Secção 7 do Ficheiro técnico do produto "MRSA ELITE MGB® Kit", FTP M800351.

16 REFERÊNCIAS

Centers for Disease Control and Prevention. 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. 2012 October; 56(10): 4997-4999.

17 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto apenas com as seguintes amostras clínicas: zaragatoa nasal e hemocultura.

Atualmente, não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com outras amostras clínicas.

Não utilize com este produto ADN extraído contaminado com mucoproteínas, propilenoglicol, etanol ou 2-propanol. Estas substâncias inibem a amplificação dos ácidos nucleicos e podem dar origem a resultados inválidos.

Não use com este produto ADN extraído contendo uma elevada quantidade de ADN genómico humano que possa inibir a reação de amplificação de ácidos nucleicos.

Os resultados obtidos com este produto dependem da identificação, colheita, transporte, armazenamento e processamento corretos das amostras. Para evitar resultados incorretos, é por isso necessário ter cuidado durante estes passos e seguir cuidadosamente as instruções de utilização fornecidas com o produto.

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de PCR em tempo real usado neste produto é sensível a contaminação a partir de amostras clínicas positivas, dos Positive Control e dos produtos de PCR. A contaminação cruzada causa resultados falsos positivos. O formato do produto foi concebido para limitar a contaminação cruzada. No entanto, as contaminações cruzadas podem ser evitadas simplesmente através de boas práticas laboratoriais e do cumprimento destas instruções de utilização.

Este produto deve ser manuseado por pessoal qualificado e com formação no processamento de amostras biológicas potencialmente infeciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de equipamento de proteção individual que seja adequado para o processamento de amostras biológicas potencialmente infeciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de equipamento de proteção individual e instrumentos específicos para preparação da sessão de trabalho, para evitar falsos resultados positivos.

Para evitar resultados incorretos, este produto deve ser manuseado por profissionais, qualificado e com formação em técnicas de biologia molecular, como extração, PCR e deteção de ácidos nucleicos.

É necessário ter áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação para evitar falsos resultados positivos.

Devido a diferenças inerentes entre tecnologias, é recomendado que os utilizadores realizem estudos de correlação do método para calcular diferenças tecnológicas antes de mudar para uma nova tecnologia.

Um resultado obtido com este produto não indica a presença de SA ou MRSA viável, mas é indicativo da presença de SA ou MRSA. Por conseguinte, um resultado positivo não indica necessariamente a falha da erradicação da intervenção, uma vez que pode persistir ADN inviável.

Um resultado negativo obtido com este produto significa que o ADN de SA ou MRSA não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode negligenciar-se o facto de o ADN de SA ou MRSA ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (Ver Características de desempenho, página 15). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

Um resultado negativo no seguimento de um resultado positivo pode ou não indicar o sucesso da erradicação.

Os resultados obtidos com este produto podem, por vezes, ser “Inválidos” devido a uma falha do controlo interno e exigir um novo teste; o que pode causar um atraso na obtenção dos resultados finais.

Embora raros, polimorfismos na região do ADN bacteriano abrangidos pelos primers e sondas do produto podem prejudicar a deteção.

A deteção de MRSA na presença de quantidade excessivas de transportadores de *mecA* coagulase negativos ou SA sensíveis à meticilina pode ser comprometida.

Staphylococcus aureus resistente à oxacilina limítrofe (BORSA) que não transporta o gene *mecA* não são detetados pelo produto.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, os resultados obtidos com este produto têm de ser interpretados em combinação com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, existe um risco residual de obter resultados inválidos ou errados com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou ainda mais reduzido. Nalguns casos, este risco residual pode contribuir para decisões erradas com potenciais efeitos perigosos para o doente. No entanto, este risco residual associado à utilização prevista do produto foi ponderado em relação aos potenciais benefícios para o paciente e foi considerado aceitável.

18 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Table 41

Reação de Positive Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix e do Positive Control (Controlo positivo). Verifique os volumes da PCR Mix e do Positive Control.
Degradação da PCR Mix.	Não use a PCR Mix durante mais de 5 sessões independentes (3 horas cada no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não utilize a PCR Mix durante mais de 5 sessões consecutivas (no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não deixe a PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Degradação da Positive Control.	Não use o Positive Control para mais de 4 sessões independentes (3 horas cada na área de extração ou na Cooler Unit). Utilize uma nova alíquota da Positive Control.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 42

Reação de Negative Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix e do Negative Control. Verifique os volumes da PCR Mix e do Negative Control.
Contaminação do Negative Control.	Não use o Negative Control para mais do que 1 sessão. Utilize uma nova alíquota de água de grau de biologia molecular.
Contaminação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Contaminação da área de extração, dos Racks, do Inventory Block (Gestor do reagente) ou da Cooler Unit	Limpe as superfícies com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos e as pontas utilizadas.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 43

Reação da amostra inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix, do Controlo Interno e da amostra. Verifique os volumes da PCR Mix, do Controlo Interno e da amostra.
Degradação da PCR Mix.	<p>Não use a PCR Mix para mais de 5 sessões independentes (3 horas cada na Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit).</p> <p>Não utilize a PCR Mix durante mais de 5 sessões consecutivas (no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit).</p> <p>Não deixe a PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos.</p> <p>Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.</p>
Degradação do modelo do Controlo Interno.	Utilize uma nova alíquota de Controlo Interno.
Inibição devido a substâncias interferentes na amostra.	<p>Repita a amplificação com uma diluição de 1:2 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR only".</p> <p>Repita a extração com uma diluição 1:2 em água de grau de biologia molecular da amostra numa sessão "Extract + PCR" (Extrair + PCR).</p>
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 44

Curva de dissociação anómala	
Causas possíveis	Soluções
Ausência de um pico definido. Pico definido mas Tm diferente do de outras amostras e do Positive Control.	<p>Verifique a presença de Ct do alvo inferior a 30.</p> <p>A elevada quantidade de produto de amplificação no final da reação pode interferir com a análise da curva de fusão.</p> <p>Repita a amplificação da amostra para confirmar a presença do alvo com uma possível mutação.</p> <p>O alvo da amostra deve ser sequenciado para confirmar a mutação.</p>

Table 45

Erro no cálculo de Ct	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra ou amostra com sinal de fluorescência anómalo.	<p>Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR, selecione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado como sendo positivo.</p> <p>Se não for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR, selecione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado como sendo negativo, ou deixe-o como inválido.</p> <p>Se for necessário um valor de Ct:</p> <ul style="list-style-type: none"> - repita a amplificação de amostra eluída com uma diluição 1:10 em água de grau de biologia molecular numa sessão "PCR Only" (apenas PCR). - repita a extração da amostra com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular numa sessão "Extract + PCR" (Extrair + PCR).

Table 46

Elevada taxa anómala de resultados positivos na mesma sessão (reações com valores Ct recentes semelhantes)	
Causas possíveis	Soluções
Contaminação entre amostras durante os passos pré-analíticos.	<p>Limpe a micropipeta com uma solução de hipoclorito de sódio (lixívia) a 3% nova ou detergente de ADN/ARN após usar a pipeta em cada amostra.</p> <p>Não use pipetas Pasteur. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis.</p> <p>Introduza as amostras nas últimas posições dos instrumentos, tal como indicado nas GUI. Siga a sequência de carregamento indicada pelo software.</p>
Contaminação pelo ambiente laboratorial.	<p>Limpe todas as superfícies em contacto com o operador e as amostras (incluindo as pipetas) com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% (lixívia) nova ou produto de limpeza de ADN/ARN.</p> <p>Realize um ciclo de descontaminação U.V.</p> <p>Utilize um novo tubo da PCR Mix e/ou CPE.</p>

Plataforma aberta:**Table 47**

ADN alvo não detetado na reação de Positive Control	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	<p>Tenha cuidado quando distribuir reações para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.</p> <p>Verifique os volumes de PCR Mix distribuídos.</p> <p>Verifique os volumes do positive control dispensados.</p>
Degradação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Degradação da Positive Control.	Utilize uma nova alíquota da Positive Control.
Erro na configuração do instrumento.	<p>Verifique as definições de posição para a reação de Positive Control no instrumento.</p> <p>Verifique as definições do ciclo térmico no instrumento.</p>

Table 48

ADN do alvo detetado na reação de Negative Control	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	<p>Evite derramar o conteúdo do tubo de teste da amostra.</p> <p>Mude sempre as pontas entre uma amostra e a outra.</p> <p>Tenha cuidado quando distribuir amostras, Negative Controls e positive controls para os poços da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.</p>
Erro durante a definição do instrumento	Verifique as definições de posição das amostras, Negative Controls, Positive Controls no instrumento
Microplaca mal vedada.	Tenha cuidado quando vedar a microplaca.
Contaminação da água de qualidade para biologia molecular.	Use uma nova alíquota de água esterilizada.

Table 48 (continued)

ADN do alvo detetado na reação de Negative Control	
Causas possíveis	Soluções
Contaminação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Contaminação da área de extração/preparação para reações de amplificação.	Limpe as superfícies e instrumentos com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.

Table 49

Fluorescência de fundo irregular ou elevada nas reações	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta ou mistura inadequada da amostra.	Tenha cuidado, inserindo a pipeta três vezes, quando misturar amostras, Negative Controls and Positive Controls e standards na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
Erro na configuração da linha de base.	Defina o intervalo de cálculo da linha de base dentro dos ciclos onde a fluorescência de fundo já estabilizou (verifique os dados "Resultados", "Componente") e a fluorescência do sinal ainda não tenha começado a aumentar, por ex. do ciclo 6 para o ciclo 15. Utilize o cálculo automático da linha de base configurando a opção "Linha de base auto".

Table 50

Curva de dissociação anómala	
Causas possíveis	Soluções
Ausência de um pico definido. Pico definido mas diferente do de outras amostras e do Positive Control.	Procure um detetor FAM Ct inferior a 30. A elevada quantidade de produto de amplificação no final da reação pode interferir com a análise da curva de fusão. Repita a amplificação da amostra para confirmar a presença do ADN alvo com uma possível mutação. O ADN alvo da amostra deve ser sequenciado para confirmar a mutação.

19 SÍMBOLOS



Número de catálogo.



Limite máximo da temperatura.



Código de lote.



Prazo de validade (último dia do mês).

Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*.Cumprimento dos requisitos da Diretiva Europeia 98/79/CE relativa a dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*.



Identificação única do dispositivo



Contém suficiente para "N" testes.



Consultar as instruções de utilização.



Conteúdo.



Manter afastado da luz solar.



Fabricante.

20 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

Este produto contém reagentes produzidos pela Thermo Fisher Scientific e são vendidos ao abrigo de contratos de licenciamento celebrados entre a ELITechGroup S.p.A. e respetivas sucursais e a Thermo Fisher Scientific. O preço de compra deste produto inclui direitos exclusivos, não transmissíveis, de utilização apenas desta quantidade do produto exclusivamente para atividades do comprador que estejam diretamente relacionadas com diagnósticos em humanos. Para obter mais informações sobre a aquisição de uma licença deste produto para outros fins que não os acima indicados, contacte o Licensing Department, Thermo Fisher Scientific. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

Os reagentes de deteção ELITe MGB® são abrangidos por um ou mais dos números de patente dos EUA 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 e números de patente EP 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 bem como pedidos que estejam atualmente pendentes.

As tecnologias ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® estão cobertas por patentes e candidaturas pendentes.

Esta licença limitada permite à pessoa ou entidade legal à qual este produto foi fornecido, usar o produto e os dados gerados pela utilização do produto, unicamente para diagnóstico humano. Nem o ELITechGroup S.p.A. nem os respetivos licenciantes concedem quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, para quaisquer outros fins.

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, o logotipo ELITe MGB®, ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® são marcas registadas do ELITechGroup na União Europeia.
eSWAB® é uma marca comercial registada da COPAN Italia S.p.A.

Appendix A MRSA/SA ELITe MGB Kit usado em associação com as plataformas Genius series®



CAUTION

Este documento é uma versão simplificada das instruções de utilização oficiais. Consulte o documento completo antes da utilização: www.elitechgroup.com

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O **MRSA/SA ELITe MGB® Kit** consiste num dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* que se destina a ser usado por profissionais de saúde como um ensaio de PCR em tempo real de ácidos nucleicos qualitativo para a deteção do ADN de *Staphylococcus aureus* (SA) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA, incluindo a estirpe mecC), extraído de amostras clínicas.

O ensaio é validado em associação com os instrumentos **ELITe InGenius®** e **ELITe BeGenius®**, automatizados e integrados para extração, PCR em tempo real e interpretação de resultados, utilizando amostras humanas de zaragatoas nasais e hemocultura.

O ensaio é também validado em associação com o **7500 Real-Time PCR Instrument**, usando amostras humanas de zaragatoas nasais e hemocultura.

O produto destina-se a ser utilizado como auxiliar na prevenção e controlo de infeções por MRSA nos contextos de saúde e a auxiliar no diagnóstico de infeções por MRSA, e não a orientar ou a monitorizar o tratamento de infeções por MRSA. Um resultado negativo não exclui colonização nasal de MRSA/SA. São necessárias culturas simultâneas para recuperar organismos para tipificação epidemiológica ou para testes de suscetibilidade adicionais.

Os resultados devem ser interpretados em conjunto com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

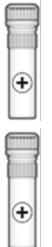
Sequência amplificada

Sequência	Gene	Fluoróforo	Canal
Alvo 1	região conservadora no gene da coagulase positiva de <i>Staphylococcus aureus</i>	AP554	SA
Alvo 2	regiões conservadoras nos genes mecA e mecC (responsáveis pela resistência à meticilina e a outros antibióticos beta-lactâmicos)	FAM	MeCA
Internal Control	sequência artificial IC2	AP642	IC

Matriz validada

- Zaragatoa nasal colhida em eNAT™ kit
- Zaragatoas nasais colhidas em eSwab Collection Kit
- Hemocultura

Conteúdo do Kit e produtos relacionados

MRSA/SA ELITe MGB Kit (M800351)	MRSA/SA ELITe - Positive Control (M800356)
 X 4	 X 2  X 2
MRSA/SA PCR Mix 4 tubos de 540 µL 24 reações por tubo 96 reações por kit 4 ciclos de congelação-descongelação por tubo	MRSA/SA - Positive Control e LGA251/ SA Positive Control 2 tubos de 160 µL para MRSA/SA 2 tubos de 160 µL para LGA251/SA 5 reações por tubo 10 reações por kit 12 ciclos de congelação-descongelação
Prazo de conservação máximo:	24 meses
Temperatura de armazenamento	≤ -20°C

Outros produtos necessários não fornecidos no 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 Pontas de filtro Axigen de 300 µL: TF-350-L-R-S. Pontas de filtro Tecan de 1000 µL: 30180118.
---	---

Protocolo do ELITe InGenius e do ELITe BeGenius

<ul style="list-style-type: none"> Volume da amostra Volume CPE Volume de eluição total 	<ul style="list-style-type: none"> 200 µL 10 µL 100 µL (com BC) ou 50 µL (com NS) 	<ul style="list-style-type: none"> Volume de entrada de PCR eluato Q—PCR Mix volume Frequência dos controlos 	<ul style="list-style-type: none"> 10 µL 20 µL 15 dias
--	--	---	---

Desempenhos ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Matriz	Limite de deteção	Sensibilidade	Especificidade
Zaragatoa nasal	1000 cópias/mL	MSSA: 93% (56/60) MRSA: 98% (40/41)	100% (48/48)
Hemocultura	2000 cópias/mL	MSSA: 100% (39/39) MRSA: 100% (31/31)	100% (34/34)

Preparação da amostra

Este produto destina-se a ser usado no instrumento **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** com o ácido nucleico extraído das seguintes amostras clínicas identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, e colhidas, transportadas e armazenadas sob as condições seguintes.

Table 51

Amostra	Requisitos de colheita	Condições de transporte/armazenamento			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2° / +8°C	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
zaragatoa nasal	colhida com eNAT™ kit	-	≤ 4 semanas	≤ 6 meses	-
zaragatoa nasal	colhida com eSwab Collection Kit	≤ 2 horas	≤ 48 horas	≤ 6 meses	-
hemocultura	-	≤ 24 horas	-	-	-

Procedimentos ELITe InGenius

O utilizador é guiado passo a passo pela interface gráfica do utilizador do software ELITe InGenius para configurar a execução. Todos os passos: extração, PCR em tempo real e a interpretação dos resultados são realizados automaticamente. Estão disponíveis dois modos operacionais: execução completa (Extract + PCR (Extrair+PCR)) ou PCR Only (Apenas PCR).

Antes da análise

1. Ligue o ELITe InGenius. Inicie sessão com o nome de utilizador e a palavra-passe. Selecione o modo “ CLOSED ” (Fechado).	2. Verifique os controlos: Positive Control e Negative Control no menu “Controls” (Controlos). Nota: Ambos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.	3. Descongele a PCR Mix e os tubos de CTRCPE . Submeta a vórtice suave. Centrifugue durante 5 s.
--	--	--

Procedimento 1 - Execução completa: Extração + PCR (p. ex., amostras)

1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil	2. Verifique os volumes de extração: Entrada: “200 µL”, eluição: “50 µL” (com NS) ou “100 µL” (com BC)	3. Leia os códigos de barras das amostras com um leitor de códigos de barras manual ou escreva a identificação da amostra
4. Selecione o “Assay protocol” (Protocolo de ensaio) de interesse: MRSA-SA ELITe_NS_200_50 ou MRSA-SA ELITe_BC_200_100.	5. Selecione o método “Extract + PCR” (Extrair+PCR) e a posição da amostra: Extraction Tube (Tubo de extração)	6. Carregue a PCR Mix e o Internal Control no Inventory Block (Gestor do reagente)
7. Carregar: PCR Cassette, Cartucho de extração, Tubo de eluição, Cassete de pontas, Racks do tubo de extração	8. Feche a porta. Iniciar a execução	9. Visualize, aprove e guarde os resultados

NOTE

Se for necessário um modo Apenas extração, consulte o manual do utilizador do instrumento para obter informações sobre o procedimento.

Procedimento 2: PCR Only (Apenas PCR) (p. ex., eluatos, controlos)

1. Selecione "Perform Run" (Executar) no ecrã tátil	2. Verifique os volumes de extração: Entrada: "200 µL", eluição: "50 µL" (com NS) ou "100 µL" (com BC)	3. Leia os códigos de barras das amostras com um leitor de códigos de barras manual ou escreva a identificação da amostra
4. Selecione o "Assay protocol" (Protocolo de ensaio) de interesse: MRSA-SA ELITe_NS_200_50 ou MRSA-SA ELITe_BC_200_100, MRSA-SA ELITe_PC_200_100 ou MRSA-SA ELITe_PC_200_50, MRSA-SA ELITe_NC_200_100 ou MRSA-SA ELITe_NC_200_50	5. Selecione o método "PCR Only" (Apenas PCR) e a posição da amostra "Elution Tube" (Tubo de eluição)	6. Carregue a PCR Mix no Inventory Block (Gestor do reagente)
7. Carregar: Rack de PCR Cassette e suporte de tubos de eluição com o ácido nucleico extraído	8. Feche a porta. Iniciar a execução	9. Visualize, aprove e guarde os resultados

Procedimentos ELITe BeGenius

O utilizador é guiado passo a passo pela interface gráfica do utilizador do software ELITe BeGenius® para configurar a execução. Todos os passos: extração, PCR em tempo real e a interpretação dos resultados são realizados automaticamente. Estão disponíveis dois modos operacionais: execução completa (Extract + PCR (Extrair+PCR)) ou PCR Only (Apenas PCR).

Antes da análise

1. Ligue o ELITe BeGenius. Inicie sessão com o nome de utilizador e a palavra-passe. Selecione o modo "CLOSED" (Fechado).	2. Verifique os controlos: Positive Control e Negative Control no menu "Controls" (Controlos). Nota: Ambos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.	3. Descongele a PCR Mix e os tubos de CTRCPE . Submeta a vórtice suave. Centrifugue durante 5 s.
---	--	---

Procedimento 1 - Execução completa: Extração + PCR (p. ex., amostras)

1. Selecione "Perform Run" (Executar) no ecrã tátil e, a seguir, clique no modo de execução "Extract + PCR" (Extrair +PCR)	2. Insira o rack de amostras com as amostras com código de barras na Cooler Unit. A leitura do código de barras já se encontra ativada	3. Verifique os volumes de extração: Entrada: "200 µL", eluado: "50 µL" (com NS) ou "100 µL" (com BC)
4. Selecione o "Assay protocol" (Protocolo de ensaio) de interesse: MRSA-SA ELITe_Be_NS_200_50 ou MRSA-SA ELITe_Be_BC_200_100. Nota: se for realizada uma segunda extração, repita os passos 2 a 4	5. Imprima as etiquetas para colocar um código de barras nos tubos de eluição vazios. Carregue os tubos no Elution Rack e insira-o na Cooler Unit	6. Carregue a PCR Mix e o Internal Control no Reagent/Elution Rack e insira-o na Cooler Unit
7. Carregue o "PCR Rack" com "PCR Cassette" e o "Extraction Basket" com os cartuchos de extração "ELITe InGenius SP 200" e os consumíveis de extração necessários	8. Feche a porta. Iniciar a execução	9. Visualize, aprove e guarde os resultados

NOTE

Se for necessário um modo Apenas extração, consulte o manual do utilizador do instrumento para obter informações sobre o procedimento.

Procedimento 2: PCR Only (Apenas PCR) (p. ex., eluatos, controlos)

1. Selecione "Perform Run" (Executar) no ecrã tátil e, a seguir, clique no modo de execução "PCR Only" (Apenas PCR)	2. Carregue os tubos com código de barras do ácido nucleico extraído ou dos controlos no Elution Rack e insira-o na Cooler Unit	3. Verifique os volumes de extração: Entrada: "200 µL", eluato: "50 µL" (com NS) ou "100 µL" (com BC)
4. Selecione o "Assay protocol" (Protocolo de ensaio) de interesse: MRSA-SA ELITe_Be_NS_200_50 ou MRSA-SA ELITe_Be_BC_200_100, MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_100 ou MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_50 MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_100 ou MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_50	5. Carregue a PCR Mix no rack de reagente/eluição e insira-o na Cooler Unit	6. Carregue o "PCR Rack" com "PCR Cassette"
7. Feche a porta. Iniciar a execução	8. Visualize, aprove e guarde os resultados	

ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185, 10149 Torino ITÁLIA
Tel. +39-011 976 191
Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
WEB site: www.elitechgroup.com

