

Istruzioni per l'uso

MRSA/SA ELITe MGB® Kit

reagenti per la Real-Time PCR del DNA



REF M800351

UDI 08033891486556



CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Rev.	Revisioni	Data (gg/mm/aa)
10	Espansione dell'uso del prodotto in associazione con lo strumento ELITe BeGenius® e le matrici tamponi nasali ed emocolture. Eliminazione del protocollo di sonicazione durante la fase di estrazione. Aggiornamento del paragrafo "Legenda dei Simboli" con il simbolo "Consultare le istruzioni per l'uso" Nuovo formato grafico e nuova impostazione dei contenuti dell'IFU	27/03/25
09	Introduzione del riferimento del nuovo prodotto ELITe InGenius Sonication tubes (ref. INT032SON) da utilizzare in associazione al prodotto per la sonicazione del campione.	13/10/20
08	Correzioni formali	06/02/19
00–07	Nuovo sviluppo di prodotto e modifiche successive	

NOTA

La revisione di questa IFU è compatibile anche con la versione precedente del kit

INDICE

1 USO PREVISTO	4
2 DESCRIZIONE DEL SAGGIO	4
3 PRINCIPIO DEL SAGGIO	4
4 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	5
5 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	5
6 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO	5
7 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	6
8 AVVERTENZE E PRECAUZIONI	6
9 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius	8
10 PROCEDURA ELITe InGenius	10
11 PROCEDURA ELITe BeGenius	15
12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius	19
13 CAMPIONI E CONTROLLI PER ALTRI STRUMENTI	24
14 PROCEDURA ALTRI STRUMENTI	26
15 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con ALTRI STRUMENTI	32
16 BIBLIOGRAFIA	36
17 LIMITI DELLA PROCEDURA	37
18 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	38
19 LEGENDA DEI SIMBOLI	42
20 AVVISO PER L'ACQUIRENTI: LICENZA LIMITATA	42
Appendix A QUICK START GUIDE	44

1 USO PREVISTO

Il prodotto **MRSA/SA ELITe MGB® Kit** è un dispositivo medico diagnostico in vitro destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come test di real-time PCR qualitativa per la rilevazione del DNA di *Staphylococcus aureus* (SA) e *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA, incluso il ceppo *mecC*), estratto da campioni clinici.

Il saggio è validato in associazione agli strumenti **ELITe InGenius®** ed **ELITe BeGenius®**, sistemi integrati e automatizzati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, a partire da campioni umani di tamponi nasali e da emocolture.

Il saggio inoltre è validato in associazione al **7500 Real-Time PCR Instrument** con campioni da tamponi nasali e da emocolture.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella prevenzione e nel controllo delle infezioni da MRSA in ambito sanitario ed è destinato all'uso come ausilio per la diagnosi delle infezioni da MRSA, ma non per la guida o il monitoraggio del trattamento delle infezioni da MRSA. Un risultato negativo non preclude la colonizzazione nasale da parte di MRSA/SA.

E' necessario realizzare in contemporanea colture cellulari da cui ottenere microrganismi per la tipizzazione epidemiologica o per ulteriori test di sensibilità.

I risultati devono essere interpretati insieme a tutte le osservazioni cliniche rilevanti e agli esiti degli esami di laboratorio.

2 DESCRIZIONE DEL SAGGIO

Lo *Staphylococcus aureus* è un patogeno opportunista che vive come microrganismo commensale sulla pelle e le narici di circa il 30% della popolazione normale, causando potenzialmente un ampio spettro di malattie. Lo SA e soprattutto l'MRSA sono regolarmente tra le principali cause di infezioni nosocomiali e sono associati a morbilità, mortalità e costi considerevoli. La comparsa di infezioni da MRSA in comunità rende necessaria la sorveglianza attiva dei pazienti ricoverati in ospedale o in altre strutture sanitarie per evidenziare la presenza di SA e MRSA e identificare i pazienti che potrebbero agire da serbatoio di infezione per altri pazienti.

Il **MRSA/SA ELITe MGB Kit** è un saggio di amplificazione Real Time con modalità triplex che mira alle regioni conservative di un **gene specifico allo *Staphylococcus aureus***, responsabile dell'identificazione di SA positivi alla coagulasi. Il saggio mira anche al **gene *mecA***, inclusa la variante ***mecC***, identificata anche come **gene *mecC*** (Ito T. e al.), responsabile della resistenza alla meticillina e ad altri antibiotici betalattamici e a un controllo interno esogeno, per controllare l'inibizione della reazione e l'integrità dei reagenti.

Il gene specifico allo *Staphylococcus aureus* identifica in modo inequivocabile gli SA positivi alla coagulasi e il gene *mecA* identifica in modo inequivocabile la resistenza alla meticillina. La presenza di entrambi i marcatori nella stessa quantità relativa misurata da una differenza del valore del ciclo soglia è indicativa di MRSA; quantità relative diverse o presenza del solo gene specifico allo *Staphylococcus aureus* sono indicative di SA.

I saggi di amplificazione real time di MRSA/SA riducono in modo significativo il tempo dedicato alle analisi di laboratorio rispetto ai test standard su coltura, migliorando l'efficienza della procedura. Gli attuali test di rivelazione PCR real time di MRSA sono mirati al sito di inserzione *SCCmec* (*mecA* che porta un elemento genetico mobile chiamato cassetta cromosomica stafilococcica), e/o al gene *mecA* e/o al gene *spa*. Il **MRSA/SA ELITe MGB Kit** mira alle regioni conservative dei marcatori genetici di MRSA e SA, per cui risultano ridotti i falsi negativi dovuti alla variabilità naturale del sito di inserzione *SCCmec* e i falsi negativi dovuti al problema della "cassetta vuota".

3 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è una Real-Time PCR qualitativa multiplex per la rilevazione del DNA di SA e MRSA isolato dai campioni e amplificato utilizzando il reagente **MRSA/SA PCR Mix** che contiene primers e sonde con tecnologia ELITe MGB.

Le sonde ELITe MGB sono attivate quando ibridano con il prodotto specifico della PCR. **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** monitorano l'incremento di fluorescenza emessa e calcolano i "cicli soglia" (Ct) e le temperature di melting (Tm).

Nelle sonde ELITe MGB i fluorofori non emettono segnale quando la sonda non ibrida con il prodotto di reazione specifico. Quando la sonda ibrida con il prodotto specifico di amplificazione, il quencher viene separato dal fluoroforo ed emette il segnale di fluorescenza. Da notare che la sonda non viene idrolizzata durante la PCR e può essere utilizzata per l'analisi di dissociazione e il calcolo della temperatura di melting.

4 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** fornisce il reagente di saggio **MRSA/SA PCR Mix**, una miscela ottimizzata e stabilizzata di oligonucleotidi e reagenti per PCR che contiene i primers e le sonde specifici per:

- Il gene SA-specifico (specifico per una regione conservativa dello ***Staphylococcus aureus*** positivo alla coagulasi), rilevato nel canale **SA**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher® e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 554 (AP554),
- I geni **mecA** e **mecC** (specifici per una regione conservativa dei **geni mecA** e **mecC**, responsabili della resistenza alla meticillina e ad altri antibiotici betalattamici), rilevati nel canale **MecA**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher® e marcata con il fluoroforo FAM,
- la sequenza artificiale **IC2** del Controllo Interno IC, rilevato nel canale IC; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher® e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 642 (AP642).

MRSA/SA PCR Mix contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfato e la DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

Il prodotto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** consente di effettuare **96 test** in associazione con **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** e **100 test** in associazione ad altri sistemi (**25 test per tubo**), utilizzando 20 µL per reazione.

Il prodotto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** può essere anche utilizzato in associazione con strumenti equivalenti.

5 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Tabella 1

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
MRSA/SA PCR Mix cod. M800351	Miscela di reagenti per la Real-Time PCR in provetta con Tappo BIANCO	4 x 540 µL	

6 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o materiale analogo.
- Agitatore Vortex.
- Centrifuga da banco (~5,000 giri/minuto).
- Microcentrifuga da banco (~13,000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a spostamento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Provette sterili da 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005).
- Acqua per biologia molecolare.
- Brodo tripticasi-soia

7 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA dai campioni da analizzare, il controllo interno di estrazione e di inibizione, i controlli positivo e negativo di amplificazione e i materiali di consumo **non** sono inclusi in questo prodotto.

Per l'estrazione automatica degli acidi nucleici, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati delle analisi eseguite sui campioni da analizzare, sono richiesti i seguenti prodotti.

Tabella 2

Strumenti e Software	Prodotti e Reagenti
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, cod. INT030). ELITe InGenius Software versione 1.3.0.19 (o successiva). MRSA-SA ELITe_PC_200_100 o MRSA-SA ELITe_PC_200_50 , Assay Protocol (Protocollo di Saggio) con i parametri per il test del Controllo Positivo. MRSA-SA ELITe_NC_200_100 o MRSA-SA ELITe_NC_200_50 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo. MRSA-SA ELITe_NS_200_50 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di tamponi nasali MRSA-SA ELITe_BC_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di emocolture.	ELITe InGenius SP 200 (EG SpA, cod. INT032SP200). ELITe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, cod. INT032CS). ELITe InGenius PCR Cassette (EG SpA, cod. INT035PCR). ELITe InGenius Waste Box (EG SpA, cod. F2102-000). 300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., cod. TF-350-L-R-S) solo per ELITe InGenius. 1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Switzerland, cod. 30180118) solo per ELITe BeGenius. CPE - Internal Control (EG SpA, cod. CTRCPE) MRSA-SA — ELITe Positive Control (EG SpA, cod. M800356) eNAT™ kit (Copan, cod. 608CS01R), eSwab Collection Kit (Copan, cod. 480CE).
ELITe BeGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, cod. INT040). ELITe InGenius Software versione 2.2.1 (o successiva). MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_100 o MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_50 , Assay Protocol con i parametri per il test del Controllo Positivo. MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_100 o MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_50 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo. MRSA-SA ELITe_Be_NS_200_50 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di tamponi nasali MRSA-SA ELITe_Be_BC_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di emocolture.	MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (Life Technologies, cod. 4346906) CPE – Internal Control (EG SpA, cod. CTRCPE) MRSA-SA — ELITe Positive Control (EG SpA, cod. M800356) NucliSENS easyMAG Reagents (bioMérieux SA, cod. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135) NucliSENSeeasyMAGStrip for Premix (bioMérieux SA, cod. 278303) bioHit Electronic Multichannel Pipettor (bioMérieux SA, cod. 280141) Filter tips for bioHit (bioMérieux SA, cod. 280146) BBL CultureSwab Plus Amies Gel without Charcoal swabs (Becton-Dickinson, cod. 220116)
7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, cod. 4406985) NucliSENS® easyMAG (bioMérieux SA, cod. 200111)	

8 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Questo prodotto è riservato esclusivamente all'uso *in vitro*.

Avvertenze e precauzioni generali

Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare provette, puntali, e gli altri materiali che vengono a contatto con i campioni biologici per almeno 30 minuti con ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o in autoclave a 121 °C per un'ora prima di smaltirlo.

Manipolare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali utilizzati per eseguire il saggio come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare e smaltire i rifiuti nel rispetto di norme di sicurezza adeguate. Incenerire il materiale monouso combustibile. Neutralizzare i rifiuti liquidi contenenti acidi o basi prima di smaltirli. Evitare che i reagenti di estrazione entrino in contatto con l'ipoclorito di sodio (candeggina).

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti a proteggersi gli occhi e il viso.

Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.

Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici sul posto di lavoro.

Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.

Eliminare i reagenti avanzati e i rifiuti secondo le norme vigenti.

Prima di eseguire il saggio, leggere attentamente tutte le istruzioni fornite con il prodotto.

Durante l'esecuzione del saggio attenersi alle istruzioni fornite con il prodotto.

Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.

Utilizzare solo i reagenti in dotazione con il prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

Le procedure di biologia molecolare devono essere eseguite da personale qualificato e addestrato per evitare il rischio di risultati errati, soprattutto a causa della degradazione degli acidi nucleici contenuti nei campioni o della contaminazione dei campioni stessi da parte di prodotti di amplificazione.

Quando la sessione di amplificazione deve essere eseguita manualmente, è necessario disporre di aree separate per l'estrazione / preparazione delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevamento dei prodotti di amplificazione. Non introdurre mai un prodotto di amplificazione nell'area destinata all'estrazione / preparazione delle reazioni di amplificazione.

Quando la sessione di amplificazione deve essere eseguita manualmente, è necessario disporre di camici, guanti o strumenti da laboratorio da usare esclusivamente per l'estrazione / preparazione delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevamento dei prodotti di amplificazione.

Non trasferire mai camici, guanti o strumenti da laboratorio dall'area designata per l'amplificazione / rilevamento dei prodotti di amplificazione all'area designata per l'estrazione / preparazione delle reazioni di amplificazione.

Utilizzare camici, guanti e strumenti per la preparazione delle sessioni di lavoro.

I campioni devono essere idonei e, se possibile, specifici per questo tipo di analisi. Manipolare i campioni sotto una cappa a flusso laminare. Utilizzare le pipette destinate alla manipolazione dei campioni solo per questo specifico scopo. Utilizzare pipette a spostamento positivo o con puntali con filtro per aerosol. Utilizzare puntali sterili, esenti da DNasi e RNasi, come anche da DNA e RNA.

Manipolare i reagenti sotto una cappa a flusso laminare. Utilizzare le pipette destinate alla manipolazione dei reagenti unicamente per questo scopo. Utilizzare pipette a spostamento positivo o con puntali con filtro per aerosol. Utilizzare puntali sterili, esenti da DNasi e RNasi, come anche da DNA e RNA.

Manipolare i campioni estratti in modo tale da ridurne quanto più possibile la dispersione nell'ambiente per prevenire il rischio di contaminazione.

Gestire le cassette di PCR (PCR Cassette) in modo tale da ridurre quanto più possibile la diffusione dei prodotti di amplificazione nell'ambiente come pure la contaminazione dei campioni e dei reagenti.

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti**Tabella 3**

Componente	Temperatura di conservazione	Utilizzo dalla prima apertura	Cicli di congelamento/scongelamento	Stabilità On board (ELITe InGenius ed ELITe BeGenius)
MRSA/SA PCR Mix	-20°C o inferiore (protetta dalla luce)	entro un mese	fino a cinque	fino a 15 ore (5 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna)

9 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato su **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** con i seguenti campioni clinici identificati e gestiti secondo le linee guida di laboratorio e raccolti, trasportati e conservati nelle seguenti condizioni:

Tabella 4

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto e conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
tampone nasale	raccolto con eNAT™ kit (COPAN Italia S.p.A., ref. 608CS01R)		≤ 4 settimane	≤ 6 mesi	—
tampone nasale	raccolto con eSwab Collection Kit (COPAN Italia S.p.A., ref. 480CE)	≤ 2 ore	≤ 48 ore	≤ 6 mesi	—
emocoltura		≤ 24 ore			—

Prima dell'analisi diluire il campione di emocoltura 1:1000 in acqua ultrapura (almeno 10 µL di campione in 10 mL di acqua ultrapura), mescolare con vortex, e trasferire 0,2 mL di campione diluito in un Extraction Tube (per lo strumento ELITe InGenius) o in una provetta Sarstedt da 2 mL (per lo strumento ELITe BeGenius).

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Per eseguire l'analisi dai campioni su **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius**, è necessario utilizzare gli Assay Protocols di seguito indicati. Questi protocolli di saggio IVD sono stati validati per l'uso specifico con i kit ELITe MGB e **ELITe InGenius** o **ELITe BeGenius** con le matrici indicate.

Tabella 5

Assay Protocol per MTB EXTRA ELITe MGB Kit				
Campione	Strumento	Assay Protocol	Report	Caratteristiche
tampone nasale	ELITe InGenius	MRSA-SA ELITe_NS_200_50	Positivo / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 50 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
	ELITe BeGenius	MRSA-SA ELITe_Be_NS_200_50		
emocoltura	ELITe InGenius	MRSA-SA ELITe_BC_200_100	Positivo / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
	ELITe BeGenius	MRSA-SA ELITe_Be_BC_200_100		

Per tutti i protocolli, 200 µL di campione devono essere trasferiti in un Extraction tube (per ELITe InGenius) o in una provetta Sarstedt da 2 mL (per ELITe BeGenius).

NOTA

Il trasferimento con le pipette dei campioni nell' **Extraction Tube** o nella **provetta Sarstedt da 2 mL** potrebbe generare contaminazione. Utilizzare le pipette appropriate e seguire tutte le raccomandazioni riportate nella sezione "Avvertenze e precauzioni".

Gli acidi nucleici purificati possono essere a temperatura ambiente per 16 ore e conservati a -20 ° C o temperatura inferiore per periodi non più lunghi di un mese.

I dati relativi all'inibizione indotta da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo "Sostanze potenzialmente interferenti" al capitolo [12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI](#) con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius pagina 19.

Controlli di PCR

E' obbligatorio generare e approvare i controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione:

- Come Controllo Positivo di PCR utilizzare il prodotto **MRSA/SA – ELITe Positive Control** (non fornito in questo kit), in associazione agli Assay Protocols **MRSA-SA ELITe_PC_200_50** o **MRSA-SA ELITe_PC_200_100** e **MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_50** o **MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_100**.
- Come Controllo Negativo di PCR utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita in questo kit) in associazione con gli Assay Protocols **MRSA-SA ELITe_NC_200_50** o **MRSA-SA ELITe_NC_200_100** e **MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_50** o **MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_100**.

NOTA

I sistemi **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** richiedono risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di PCR. La validazione dei risultati dei controlli di PCR approvati e memorizzati nel database, scade dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza è necessario eseguire nuovamente l'analisi dei controlli positivi e negativi. Inoltre, i controlli di amplificazione devono essere ritestati nei seguenti casi:

- quando si utilizza un nuovo lotto di reagenti di PCR,
- quando i risultati delle analisi di controllo qualità (vedi paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche,
- quando **ELITe InGenius** o **ELITe BeGenius** è stato sottoposto ad un intervento di manutenzione principale.

Controlli di qualità

Si consiglia la verifica programmata della procedura di estrazione e amplificazione. Si possono utilizzare campioni d'archivio testati o materiale di riferimento certificato. Quando disponibili, utilizzare i controlli esterni in conformità a leggi locali, statali, organizzazioni di accreditamento federali.

10 PROCEDURA ELITe InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** con **ELITe InGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 6

FASE 1	Verifica che il sistema sia pronto	
FASE 2	Impostazione della sessione	A) Corsa dei campioni (Extract + PCR)
		B) Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
		C) Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).
FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	1) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		2) Validazione dei risultati dei campioni
		3) Refertazione dei risultati dei campioni

FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- Accendere lo strumento **ELITe InGenius** e selezionare la modalità “**CLOSED**”,
- Nella sezione “Controls” della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**MRSA/SA - Positive Control**, **LGA251/ SA Positive Control** e **MRSA/SA Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **MRSA/SA PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito,
- Selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo [9 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius pagina 8](#)).

Se l'Assay Protocol d'interesse non è presente nel sistema, rivolgersi al Servizio Clienti ELITechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con **ELITe InGenius** per eseguire:

- Corsa dei campioni (Extract + PCR),
- Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
- Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi negli 'Assay Protocol disponibili sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay Protocol.

NOTA

ELITe InGenius può essere collegato al “Laboratory Information System” (LIS) tramite il quale è possibile scaricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Prima di impostare una sessione:

Scongelare le provette necessarie di **PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

La miscela **PCR Mix** è fotosensibile per cui non va esposta alla luce diretta.

Per l'impostazione dei tre tipi di sessione procedere con i seguenti passaggi seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI).

Tabella 7

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Per l'analisi 200 µL di campione devono essere trasferiti in un Extraction tube (tubo di estrazione) precedentemente etichettato.	Scongelare a temperatura ambiente gli Elution tube (Provetta con eluato) con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelare le provette di Controllo Positivo (MRSA/ SA Positive Control e LGA251/SA Positive Control) a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 4 reazioni.
2	Scongelare le provette necessarie di controllo interno CPE a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 12 reazioni.	Non applicabile	Preparare il Controllo Negativo trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un Elution tube (Provetta eluato), fornito con il prodotto ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run " (Esegui sessione)	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run " (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run " (Esegui sessione).
4	Se vengono processati tamponi nasali, verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (Volume di eluato estratto) sia 50 µL. Se vengono processate emocolture, verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (Volume di eluato estratto) sia 100 µL.	Se vengono processati tamponi nasali, verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (Volume di eluato estratto) sia 50 µL. Se vengono processate emocolture, verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (Volume di eluato estratto) sia 100 µL.	Verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (Volume di eluato estratto) sia 50 µL (con tamponi nasali) o 100 µL (con emocolture).
5	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (ID campione, SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (ID campione, SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Non applicabile
6	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli") e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del Positive Control e dell'acqua per biologia molecolare.

Tabella 7 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
7	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" (Protocollo) selezionare "PCR Only".	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) il protocollo visualizzato sia: "PCR Only".
8	Selezionare "Primary tube" o "Extraction tube" nella colonna "Sample Position".(Posizione campione)	Nella colonna "Sample Position" (Posizione campione) selezionare "Elution Tube" come posizione in cui caricare il campione.	Verificare nella colonna "Sample Position" (Posizione campione) che la posizione sia "Elution Tube".
9	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.
10	Caricare il CPE e la PCR Mix nell' "Inventory Block" (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.	Caricare la PCR Mix nell' "Inventory Block" (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.	Caricare la PCR Mix nell' "Inventory Block" (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
11	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
12	Nell'"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali)	Nell'"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali).	Nell'"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali).
13	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
14	Caricare le PCR cassette , le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200", tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre.	Caricare le PCR cassette e gli Elution tube con i campioni da analizzare.	Caricare le PCR cassette e le provette per il Controllo Positivo ed il Controllo Negativo.
15	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
16	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
17	Premere "Start" (Inizio).	Premere "Start" (Inizio).	Premere "Start" (Inizio).

Dopo il completamento della procedura, **ELITe InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a -20 ± 10 °C al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto

NOTA

Alla fine della corsa la **PCR Mix** può essere rimossa dallo strumento, tappata e conservata a -20 °C o temperatura inferiore, o può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 5 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna; mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento le provette di **Controllo Positivo**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Controllo Positivo. Smaltire le provette di **Controllo Negativo**

NOTA

Il **Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

NOTA

Alla fine della corsa, rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

ELITE InGenius monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri dell'Assay Protocol per generare curve di PCR e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display", nella quale sono riportati i risultati e le informazioni riguardanti la sessione. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

NOTA

ELITE InGenius può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile inviare i risultati della sessione di lavoro al centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

ELITE InGenius genera i risultati del prodotto **MRSA/SA ELITE MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

1. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
2. Validazione dei risultati dei campioni,
3. Refertazione dei risultati dei campioni.

Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo

Il **software ELITE InGenius** interpreta i risultati di PCR dei target del Controllo Positivo e del Controllo Negativo con i parametri inclusi negli Assay Protocol "ELITE_PC" e "ELITE_NC". I valori di Ct e Tm ottenuti sono utilizzati per validare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati del **Controllo Positivo** e **Controllo Negativo**, specifici per il lotto del reagente di PCR, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere consultati e approvati da personale avente la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo scadono **dopo 15 giorni**.

I risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo vengono utilizzati dal **software ELITE InGenius** per impostare i grafici di controllo che monitorano le prestazioni delle fasi di amplificazione. Per maggiori dettagli, consultare il manuale dello strumento.

NOTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Controls" appare il messaggio "Failed" che ne impedisce l'approvazione. In tal caso, ripetere la reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo.

NOTA

Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo sono amplificati insieme ai campioni da analizzare e il risultato non è valido, i campioni possono essere approvati, ma i risultati non sono validati. In tal caso, l'amplificazione dei Controlli non validi e di tutti i campioni deve essere ripetuta.

Validazione dei risultati dei campioni

Il software ELITE InGenius interpreta i risultati di amplificazione del target (Canali **mecA** e **SA**) e del controllo interno (Canale **IC**) con i parametri inclusi negli Assay Protocol **MRSA-SA ELITE_NS_200_50** e **MRSA-SA ELITE_BC_200_100**

I risultati vengono mostrati nella schermata "Results Display".

La sessione del campione può essere approvata quando sono soddisfatte le due condizioni riportate nella tabella sottostante.

Tabella 8

1) Controllo Positivo	Status
MRSA/SA Positive Control	APPROVATO
LGA251/SA Positive Control	APPROVATO
2) Controllo Negativo	Status
MRSA/SA Negative Control	APPROVATO

I risultati del campione vengono interpretati automaticamente dal software ELITE InGenius utilizzando i parametri dell'Assay Protocol. La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato ottenuto.

Per ogni campione il sistema riporta una combinazione dei seguenti messaggi specificando se il DNA dei patogeni è stato rilevato o non rilevato.

Tabella 9

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
MRSA:rilevato.	Il DNA dell' MRSA è stato rilevato nel campione.
MRSA/SA:non rilevato o inferiore LoD.	Il DNA dell' MRSA/SA non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo oppure le concentrazioni dei target sono inferiori al limite di rilevazione (LoD) del saggio.
MRSA:non rilevato o inferiore LoD, SA rilevato	Il DNA dell' MRSA non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per questo target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione (LoD) del saggio. SA è stato rilevato.
Non valido—Ripeti test su campione	Risultato del saggio non valido per un errore del Controllo Interno (es. estrazione errata o presenza di un inibitore). Il test deve essere ripetuto.

Campioni che riportano il risultato: "MRSA/SA:non rilevato o inferiore LoD" sono utili ai fini dell'analisi ma non è stato possibile rilevare il DNA di MRSA/SA. In questo caso non si può escludere che il DNA di MRSA/SA sia presente ad una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedi ["12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius pagina 19"](#)).

Campioni che riportano il risultato "Non valido-Ripeti test su campione": in questo caso, il DNA del Controllo interno non è stato rilevato in maniera efficace per problemi nella fase di campionamento, pretrattamento, estrazione o amplificazione (es.. errato campionamento, degradazione o perdita di DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono generare risultati errati.

Quando il volume è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato, tal quale oppure diluito, mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only". In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota in modalità "Extract + PCR" (vedi ["18 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 38"](#)).

NOTA

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e degli altri esiti di laboratorio riguardanti il paziente.

I risultati della sessione analitica del campione sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Results Display) da personale avente la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Dalla finestra "Results Display" è possibile stampare e salvare i risultati della sessione analitica sotto forma di "Sample Report" e "Track Report".

Refertazione dei risultati dei campioni

I risultati della sessione analitica sono memorizzati nel database e possono essere visualizzati o esportati sotto forma di "Sample Report" e "Track Report".

Il "Sample Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per campione selezionato (SID).

Il "Track Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per track selezionato.

Il "Sample Report" e il "Track Report" possono essere stampati e firmati da personale autorizzato.

11 PROCEDURA ELITe BeGenius

La procedura di utilizzo del prodotto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** con **ELITe BeGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 10

FASE 1	Verifica che il sistema sia pronto	
FASE 2	Impostazione della sessione	A) Corsa dei campioni (Extract + PCR)
		B) Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
		C) Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).
FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	1) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		2) Validazione dei risultati dei campioni
		3) Refertazione dei risultati dei campioni

FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITe BeGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**",
- nella sezione "Controls" della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**MRSA/SA - Positive Control**, **LGA251/ SA Positive Control** e **MRSA/SA Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito,
- selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo [9 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius pagina 8.](#))

Se l'Assay Protocol d'interesse non è presente nel sistema, rivolgersi al Servizio Clienti ELITechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con il sistema **ELITe BeGenius** per eseguire:

A. Corsa dei campioni (Extract + PCR),

B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only),

C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi negli Assay Protocol disponibili sullo strumento e vengono richiamati automaticamente nel momento in cui lo si seleziona.

NOTA

ELITe BeGenius può essere collegato al “Laboratory Information System” (LIS) tramite il quale è possibile scaricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d’istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Prima di impostare una sessione:

Scongelare le provette necessarie di **PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

La miscela **PCR Mix** è fotosensibile per cui non va esposta alla luce diretta.

Per l’impostazione dei tre tipi di sessione procedere con i seguenti passaggi seguendo le istruzioni visualizzate sull’interfaccia grafica (GUI).

Tabella 11

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Per l’analisi, 200 µL di campione devono essere trasferiti in un Tubo Sarstedt da 2 mL precedentemente etichettato.	Scongelare a temperatura ambiente gli “Elution tube” (Provetta con eluato) con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelare le provette di Controllo Positivo (MRSA/ SA Positive Control e LGA251/SA Positive Control) a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. (Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 4 reazioni).
2	Scongelare le provette necessarie di controllo interno CPE a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene volume sufficiente per 12 reazioni.	Non applicabile	Preparare il Controllo Negativo trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un “Elution tube” (Provetta con eluato), fornito con il prodotto ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Nella schermata Home, selezionare “Perform Run” (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare “Perform Run” (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare “Perform Run” (Esegui sessione).
4	Rimuovere tutti i Racks dalla “Cooler Unit” e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i Racks dalla “Lane 1, 2 e 3” (L1, L2, L3) della “Cooler Unit” e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i Racks dalla “Lane 1, 2 e 3” (L1, L2, L3) della “Cooler Unit” e posizionarli sul tavolo di preparazione.
5	Selezionare il “Run mode”: “Extract + PCR” .	Selezionare il “Run mode”: “PCR Only” .	Selezionare il “Run mode”: “PCR Only” .
6	Caricare i campioni nel “Sample Rack” (Rack campioni). Quando si utilizzano tubi secondari “2 mL Tube” utilizzare gli adattatori blu per il “Sample Rack	Caricare gli eluati dei campioni estratti nell’ “Elution Rack” (Rack di eluizione).	Caricare le provette di Controllo Positivo e di Controllo Negativo nell’ “Elution Rack” (Rack di eluizione).

Tabella 11 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
7	Inserire il "Sample Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 5" (L5). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse inserire il "SampleID" (ID campione, SID). (Se si utilizzano tubi secondari, selezionare "2 mL Tube". Se il tubo secondario non ha etichetta o barcode, digitare manualmente il "SID".	Inserire l' "Elution Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (ID campione, SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol.".	Inserire l' "Elution Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (ID campione, SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol.".
8	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.
9	Se vengono processati tamponi nasali, verificare che "Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluato estratto) sia impostato a 50 µL. Se vengono processate emocolture, verificare che "Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluato estratto) sia impostato a 100 µL.	Se vengono processati tamponi nasali, verificare che "Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluato estratto) sia impostato a 50 µL. Se vengono processate emocolture, verificare che "Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluato estratto) sia impostato a 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluato estratto) sia impostato a 50 µL (con tamponi nasali) o 100 µL (con emocolture).
10	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.
11	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
	Nota: Quando devono essere analizzati più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.		Non applicabile
12	Caricare gli "Elution tube" (Provetta eluato) nell' "Elution Rack" (Rack di eluizione).	Non applicabile	Non applicabile
13	Inserire l' "Elution Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). In caso di un numero di campioni maggiore di 12, ripetere usando "Lane 2" (L2).	Non applicabile	Non applicabile
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile	Non applicabile
15	Caricare il CPE e la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".
16	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix e / o CPE inserire "S/N", "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix inserire "S/N", "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).

Tabella 11 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
17	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
18	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i " Tip Rack " (Rack Puntali).	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i " Tip Rack " (Rack Puntali).	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i " Tip Rack ". (Rack Puntali).
19	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
20	Caricare il " PCR Rack " con le " PCR Cassette " nell' Inventory Area.	Caricare il " PCR Rack " con le " PCR Cassette " nell' Inventory Area.	Caricare il " PCR Rack " con le " PCR Cassette " nell' Inventory Area.
21	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
22	Caricare l" Extraction Rack " (rack di estrazione) con le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200" e i consumabili richiesti.	Non applicabile	Non applicabile
23	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
24	Premere "Start" (inizio).	Premere "Start" (inizio).	Premere "Start" (inizio).

Dopo il completamento della procedura, **ELITe BeGenius** permette di visualizzare, approvare e memorizzare i risultati, e di stampare e salvare il rapporto.

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a -20 ± 10 °C al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

NOTA

Alla fine della corsa, la **PCR Mix** può essere rimossa dallo strumento, tappata e conservata a -20 °C o temperatura inferiore, o può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 5 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna; mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento le provette di **Controllo Positivo**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Controllo Positivo. Smaltire le provette di **Controllo Negativo**.

NOTA

Il **Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

NOTA

Alla fine della corsa, rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

ELITe BeGenius monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri dell'Assay Protocol per generare curve di PCR e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display", nella quale sono riportati i risultati e le informazioni riguardanti la sessione. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

NOTA

ELITe BeGenius può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile inviare i risultati della sessione di lavoro al centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

ELITe BeGenius genera i risultati del prodotto **MRSA/SA ELITe MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

1. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
2. Validazione dei risultati dei campioni,
3. Refertazione dei risultati dei campioni.

NOTA

Per i dettagli fare riferimento agli stessi paragrafi della "Procedura" dello strumento **ELITe InGenius**.

12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

Sensibilità analitica: Limite di rilevazione

Il limite di rilevazione (LoD) del saggio, come Limite di rilevazione dell'amplificazione del DNA, permette di rilevare la presenza di circa 20 copie in 10 µL di DNA addizionati alla reazione di amplificazione.

Il LoD del saggio è stato testato usando DNA plasmidici contenenti i prodotti di amplificazione la cui concentrazione iniziale era stata misurata allo spettrofotometro. I DNA plasmidici erano stati diluiti ad un titolo di circa 20 copie / 10 µL in presenza di 40.000 copie di Internal Control (IC) / 10 µL. Questi campioni sono stati testati in associazione ad ELITe InGenius in 18 replicati su due diversi strumenti.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 12

Campioni	N	Positivi	Negativi	Media MecA Ct	Media SA Ct
20 copie di plasmidi MRSA/SA DNA + 40.000 copie di IC	18	17	1	35,04	34,43
20 copie di plasmidi LGA251/SA DNA + 40.000 copie di IC	18	18	0	34,75	34,12

Il valore di LoD teorico è stato confermato su ELITe InGenius ed ELITe BeGenius testando 20 replicati del plasmide MRSA/SA e 20 replicati del plasmide LGA251/SA alla concentrazione dichiarata (20 copie / reazione).

Il LoD è stato verificato su ELITe InGenius ed ELITe BeGenius testando campioni di tamponi nasali raccolti in eSwab e in eNat ed emocolture, successivamente positivizzati con MRSA/SA - ELITe Positive Control (entrambi i plasmidi MRSA/SA e LGA251/SA) a 1000 copie / mL per i tamponi nasali e 2000 copie / mL per le emocolture.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 13 Limite di rilevazione (copie/mL) per tamponi nasali ed emocolture con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

Campioni	LoD (copie / mL)
tamponi nasali	1000
emocolture	2000

Sensibilità analitica: riproducibilità con materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica del saggio, intesa come riproducibilità del valore di un materiale di riferimento calibrato, è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento il pannello "QCMD 2014 Methicillin Resistant S. aureus EQA Panel" (Qnistics Ltd, UK), e un pannello di diluizioni di MRSA/SA all'interno del limite di concentrazione.

Ciascun campione del pannello è stato testato in 2 replicati mediante l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rilevazione e interpretazione dei risultati, su **ELITe InGenius**.

I risultati sono mostrati nella tabella seguente.

Tabella 14 Test con materiale di riferimento calibrato ed ELITe InGenius

Campione	Contenuto del Campione	Risultati attesi	Risultati ottenuti
MRSADNA14-01	MRSA N315	MRSA Rilevato	MRSA Rilevato
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 Rilevato	MRSA Rilevato
MRSADNA14-06	MHB only	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-07	MRSA N315	MRSA Rilevato non frequentemente	MRSA Rilevato
MRSADNA14-08	MRSA mecC	MRSA Rilevato non frequentemente	MRSA Rilevato
MRSADNA14-09	MRCoNS 634	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-10	MRSA ST398	MRSA Rilevato	MRSA Rilevato
MRSADNA14-11	MRSA N315	MRSA Frequentemente Rilevato	MRSA Rilevato
MRSADNA14-12	MRSA N315	MRSA Rilevato	MRSA Rilevato

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente.

La sensibilità analitica del saggio, intesa come riproducibilità del valore di un materiale di riferimento certificato, è stata anche valutata utilizzando come materiale di riferimento il NATtrol™ MRSA/SA Panel (Zeptometrix, US), un pannello di S. aureus o S. epidermidis.

Ciascun campione del pannello è stato testato in 2 replicati mediante l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rilevazione e interpretazione dei risultati, su **ELITe InGenius**.

I risultati sono mostrati nella tabella seguente.

Tabella 15 Test con materiale di riferimento calibrato ed ELITE InGenius

Campione	Risultati attesi	Risultati ottenuti
S. aureus_MRSA Community Strain	MRSA Positivo	MRSA Rilevato
S. aureus_MRSA Hospital Strain	MRSA Positivo	MRSA Rilevato
S. aureus_MSSA	MSSA Positivo	MSSA Rilevato
S. aureus_MSSA – empty cassette	MSSA Positivo	MSSA Rilevato
S. epidermidis_MSSE HER 1292	Negativo	Negativo

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente.

Ripetibilità

La ripetibilità del saggio è stata valutata su ELITE InGenius ed ELITE BeGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di tamponi nasali raccolti in eSwab, negativi e positivizzati con MRSA/SA - ELITE Positive Control.

Un esempio di risultati del test di Ripetibilità Intra-Sessione (su un giorno) è mostrato nelle tabelle seguenti.

Tabella 16 Ripetibilità Intra - Sessione con ELITE InGenius

Campione	N	Target MecA			Target SA			% Concordanza
		Ct medio	SD	% CV	Ct medio	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%

Tabella 17 Ripetibilità Intra - Sessione con ELITE BeGenius

Campione	N	Target MecA			Target SA			% Concordanza
		Ct medio	SD	% CV	Ct medio	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%

Un esempio dei risultati di ripetibilità Inter-Sessione (su due giorni) è riportato nelle tabelle seguenti.

Tabella 18 Ripetibilità Inter - Sessione con ELITE InGenius

Campione	N	Target MecA			Target SA			% Concordanza
		Ct medio	SD	% CV	Ct medio	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%

Tabella 19 Ripetibilità Inter - Sessione con ELITE BeGenius

Campione	N	Target MecA			Target SA			% Concordanza
		Ct medio	SD	% CV	Ct medio	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%

Nel test di Ripetibilità, il MRSA/SA ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct del target come %CV inferiore al 5 %.

Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata valutata su ELITE InGenius e ELITE BeGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di tamponi nasali raccolti in eSwab, negativi e positivizzati con MRSA/SA - ELITE Positive Control.

Un esempio di risultati del test di Riproducibilità Inter-Lotto (su due lotti) è mostrato nelle tabelle seguenti.

Tabella 20 Riproducibilità Inter - Lotto con ELITE InGenius

Campione	N	Target MecA			Target SA			% Concordanza
		Ct medio	SD	% CV	Ct medio	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%

Tabella 21 Riproducibilità Inter - Lotto con ELITE BeGenius

Campione	N	Target MecA			Target SA			% Concordanza
		Ct medio	SD	% CV	Ct medio	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%

Un esempio di risultati del test di Riproducibilità Inter-Strumento (su due strumenti) è mostrato nelle tabelle seguenti.

Tabella 22 Riproducibilità Inter - Strumento con ELITE InGenius

Campione	N	Target MecA			Target SA			% Concordanza
		Ct medio	SD	% CV	Ct medio	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%

Tabella 23 Riproducibilità Inter - Strumento con ELITe BeGenius

Campione	N	Target MecA			Target SA			% Concordanza
		Ct medio	SD	% CV	Ct medio	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%

Nel test di Riproducibilità, il MRSA/SA ELITe MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct del target come %CV inferiore al 5 %.

Specificità Diagnostica: conferma dei campioni negativi

La Specificità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata in associazione con ELITe InGenius analizzando campioni clinici di tamponi nasali e campioni clinici di emocoltura negativi per MRSA/SA. Poiché ELITe BeGenius possiede performance analitiche equivalenti a ELITe InGenius, le performance diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono anch'esse considerate equivalenti. Quindi la Specificità Diagnostica del saggio ottenuta in associazione a ELITe InGenius è anche riferibile ad ELITe BeGenius.

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Tabella 24 Specificità Diagnostica

Campione	N	Positivi	Negativi	Specificità Diagnostica %
Campioni di tamponi nasali negativi per il DNA di MRSA/SA	48	0	48	100
Campioni di emocolture negative per il DNA di MRSA/SA	34	0	34	100

Per il Controllo Interno è stato definito un cut-off del valore di 29 Ct per tamponi nasali ed emocolture in associazione a ELITe InGenius e ELITe BeGenius.

Sensibilità Diagnostica: conferma dei campioni positivi

La Sensibilità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata in associazione ad ELITe InGenius analizzando campioni clinici di tamponi nasali positivi per MRSA, per MSSA, o positivizzati per MRSA con l'aggiunta di MRSA BAA-1556 (ATCC) ad un titolo di 100.000 CFU/mL. Sono stati inoltre testati campioni di emocoltura positivi per MRSA, per MSSA e, data la difficoltà nel trovare un numero significativo di campioni clinici positivi per i geni target, utilizzando campioni di emocoltura positivizzati con isolati MRSA.

Poiché ELITe BeGenius possiede performance analitiche equivalenti a ELITe InGenius, le performance diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono anch'esse considerate equivalenti. Quindi la Sensibilità Diagnostica del saggio ottenuta in associazione a ELITe InGenius è anche riferibile ad ELITe BeGenius.

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Tabella 25 Sensibilità Diagnostica

Campione	N	Positivi	Negativi	Sensibilità Diagnostica %
Campioni di tamponi nasali positivi per il DNA di MSSA	60	56	4	93
Campioni di tamponi nasali positivi per il DNA di MRSA	41	40	1	98
Campioni di emocoltura positivi per il DNA di MSSA	39	39	0	100
Campioni di emocoltura positivi per il DNA di MRSA	31	31	0	100

13 CAMPIONI E CONTROLLI PER ALTRI STRUMENTI

13.1 Campioni

Il prodotto deve essere usato con DNA estratto da campioni clinici di tamponi nasali.

I campioni da tamponi nasali, destinati all'estrazione del DNA, devono essere raccolti con tamponi BBL Culture SWab Plus Amies Gel without charcoal (Becton-Dickinson) e identificati in base alle linee guida del laboratorio.

I campioni da tamponi nasali devono essere trasportati e conservati a +18/+25 °C per al massimo un giorno, altrimenti devono essere conservati a +2/+8 °C per un massimo di sette giorni. I campioni da tamponi nasali devono essere immersi in 1 mL di brodo tripticasoia (TSB) e agitati per 10 secondi prima di iniziare la procedura di estrazione.

NOTA

quando si estraie il DNA con il sistema «NucliSENS® easyMAG®», usare le seguenti impostazioni.

Definire i parametri di estrazione nel modo seguente:

- Matrice = Altro;
- Protocollo = Generico 2.0.1;
- Volume (ml) = 1,0 ml;
- Eluato (µl) = 50 µl;
- Tipo = Primario.

Trasferire **1 mL** di ciascun campione TSB in un vassoio per campioni usa e getta da 8 pozzetti, come definito nell'ordine di lavoro ed erogare il tampone di lisi. Durante i 10 minuti di incubazione, preparare la sospensione di silice magnetica per 8 campioni, miscelando **550 µL** di silice magnetica NucliSENS® easyMAG®, **545 µL** di acqua per uso in biologia molecolare e **5 µL** di CPE. Per ogni campione, usare il pipettatore BioHit per erogare 125 µL della sospensione di silice magnetica nella NucliSENS easyMAG Strip for Premix. Usare il pipettatore BioHit per trasferire 100 µL della sospensione di silice magnetica in ogni campione del vassoio monouso per campioni a 8 pozzetti, mescolare bene pipettando su e giù per tre volte e quindi iniziare la procedura di estrazione.

13.2 Sostanze interferenti

Sostanze che possono interferire con la rivelazione di SA e MRSA mediante il MRSA/SA ELITE MGB Kit e potrebbero determinare risultati non validi, inclusi il propilene glicole e quantità eccessive di secrezioni/muco nasale. È stato dimostrato che le sostanze esogene elencate sotto, che sono componenti di decongestionanti e prodotti usati per alleviare la secchezza e/o l'irritazione nasale, a eccezione del propilene glicole, non interferiscono con la rivelazione di MRSA/SA da parte del MRSA/SA ELITE MGB Kit. È stato dimostrato che la presenza di sangue umano non interferisce con la rivelazione di MRSA/SA da parte del MRSA/SA ELITE MGB Kit utilizzato in associazione con «NucliSENS® easyMAG®».

Tabella 26

Sostanza potenzialmente interferente (tipo)	Principio attivo	Interferisce?
Mucina, ghiandola sottomascellare bovina, tipo I-S	Mucina purificata	No
Sangue (umano)	Emoglobina	No
Spray o gocce nasali	Fenilefrina	No
	Ossimetazolina	No
	Cloruro di sodio con conservanti	No
	Cloruro di benzalconio	No
	Fosfato di sodio	No
	Fenilcarbinolo	No
	Propilene glicole	Sì
	Sorbitolo, alcol benzilico	No
	Disodio edatato, ipromellosio	No
	Acido fosforico	No
Corticosteroidi nasali	Desametasone	No
	Triamcinolone	No
	Beclometasone	No
	Flunisolide	No
	Budesonide	No
	Mometasone	No
	Fluticasone	No
Gel nasale	Luffa opperculata, zolfo	No
Rimedio omeopatico per alleviare le allergie	Galphimia glauca	No
	Histaminum hydrochloricum	No
Vaccino	Vaccino intranasale con virus dell'influenza vivo	No
Pasticche per la gola, anestetici e analgesici orali	Benzocaina, mentolo	No
Farmaci antivirali	Zanamivir, oseltamivir fosfato	No

Tabella 26 (segue)

Sostanza potenzialmente interferente (tipo)	Principio attivo	Interferisce?
Antibiotico, pomata nasale	Mupirocina	No
Antibatterico, sistemico	Tobramicina	No

Lo studio delle sostanze interferenti è stato condotto utilizzando l'estrattore NucliSENS® easyMAG® e il Thermal cycler programmabile 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument con la versione precedente del prodotto «**MRSA/SA ELITe MGB® Kit**», che rispetto a quella attuale non disponeva di oligonucleotidi specifici per *meCC*.

Non sono disponibili dati relativi all'inibizione causata da altri farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressivi.

Un'elevata quantità di DNA genomico umano nel DNA estratto dal campione potrebbe inibire la reazione di amplificazione.

13.3 Controlli dell'amplificazione

È necessario convalidare ciascuna sessione di amplificazione allestendo una reazione di controllo negativo e una reazione di controllo positivo.

Per il controllo negativo usare acqua per uso in biologia molecolare (non fornita).

Per il controllo positivo usare le due soluzioni del prodotto «**MRSA/SA – ELITe Positive Control**» (non fornito).

13.4 Controlli di qualità

Si consiglia di convalidare l'intera procedura di analisi di ciascuna sessione di estrazione ed amplificazione utilizzando un campione negativo e un campione positivo già testati o del materiale di riferimento calibrato.

14 PROCEDURA ALTRI STRUMENTI

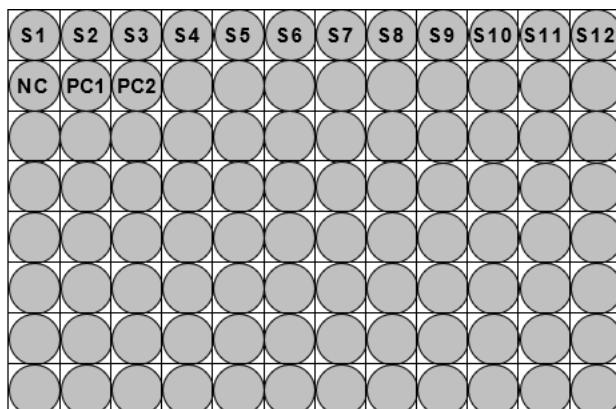
Impostazione della sessione di amplificazione Real-Time

(Da eseguire nell'area di amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione)

Prima di iniziare la sessione, seguire le raccomandazioni del produttore fornite nella documentazione dello strumento e:

- - accendere il computer, accendere il thermal cycler per real time, avviare il software dedicato e aprire una sessione "absolute quantification";
- - quando si utilizza uno strumento **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** impostare "Run mode: Fast 7500";
- - impostare il rivelatore appropriato nel menu strumenti selezionando il Detector Manager;
- - impostare il "detector" per la sonda del gene specifico a SA con il "reporter" = "TAMRA" (AP554 è simile a TAMRA), il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "SA";
- - impostare il "detector" per le sonde del gene *mecA* e *mecC* con il "reporter" = "FAM", il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "mecA";
- - impostare il "detector" per la sonda del controllo interno con il "reporter" = "Cy5" (AP642 è simile a Cy5), il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "IC";
- - andare al menu View, selezionare il Well Inspector e, per ciascun pozzetto in uso nella micropiastra, impostare il "detector" (tipo di fluorescenza da misurare), il "passive reference" = "ROX" (AP593 è simile a ROX, normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campione, controllo negativo di amplificazione, controllo positivo di amplificazione). Aggiungere queste informazioni al **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale oppure stampare l'organizzazione della micropiastra. Il **Piano di lavoro** dovrà essere seguito con attenzione durante il trasferimento nei pozzetti della miscela di reazione e dei campioni.

Vedere sotto un esempio di come si può organizzare un'analisi qualitativa di 12 campioni



Legenda: **S1 - S12**: campioni da analizzare; **NC**: controllo negativo di amplificazione; **PC1**: controllo positivo di amplificazione di MRSA / SA; **PC2**: controllo positivo di amplificazione di MECC/SA

Facendo riferimento alla documentazione dello strumento, impostare sul software dedicato (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:

- aggiungere alla fase di amplificazione (Add step) il passaggio **di estensione a 72 °C**;

NOTA

l'acquisizione della fluorescenza (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve essere impostata durante la fase di ibridazione a 56 °C.

- modificare il tempo come indicato nella tabella seguente **“Ciclo termico”**;
- impostare il numero di cicli su **45**;
- impostare il volume di reazione su **30 µL**.
- opzionale: aggiungere la fase di dissociazione (Add Dissociation Stage) e impostare le temperature da **40°C** a **80°C**.

Tabella 27 Parametri del ciclo termico

Fase	Temperature	Durata
Decontaminazione	50° C	2 min.
Denaturazione iniziale	93° C	2 min.
Amplificazione e rilevazione (45 cicli)	93° C	10 sec.
	56° C (raccolta dei dati)	30 sec.
	72° C	15 sec.

Allestimento dell'amplificazione

(Da eseguire nell'area di estrazione / allestimento della reazione di amplificazione).

Prima di iniziare la sessione è necessario:

- prelevare e scongelare le provette contenenti i campioni da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare le provette **MRSA/SA PCR Mix** necessarie per la sessione, ricordandosi che ciascuna provetta è sufficiente per preparare **25 reazioni**. Mescolare delicatamente, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio per un massimo di quattro ore;

- prelevare e scongelare una provetta di **MRSA/SA Positive Control** (controllo positivo per le reazioni di amplificazione real time per il gene specifico a SA e per il gene *mecA*). Mescolare delicatamente, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio per un massimo di quattro ore;
 - prelevare e scongelare una provetta di **LGA251/SA Positive Control** (controllo positivo per le reazioni di amplificazione real time per il gene *mecC*). Mescolare delicatamente, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio per un massimo di quattro ore;
 - prelevare la **Amplification microplate** che verrà usata durante la sessione, prestando attenzione a manipolarla con guanti privi di polvere e a non danneggiare i pozzetti.
- Erogare accuratamente **20 µL** di **MRSA/SA PCR Mix** al fondo dei pozzetti dell'**Amplification microplate**, come stabilito in precedenza nel **Piano di lavoro**. Evitare la creazione di bolle d'aria.

NOTA

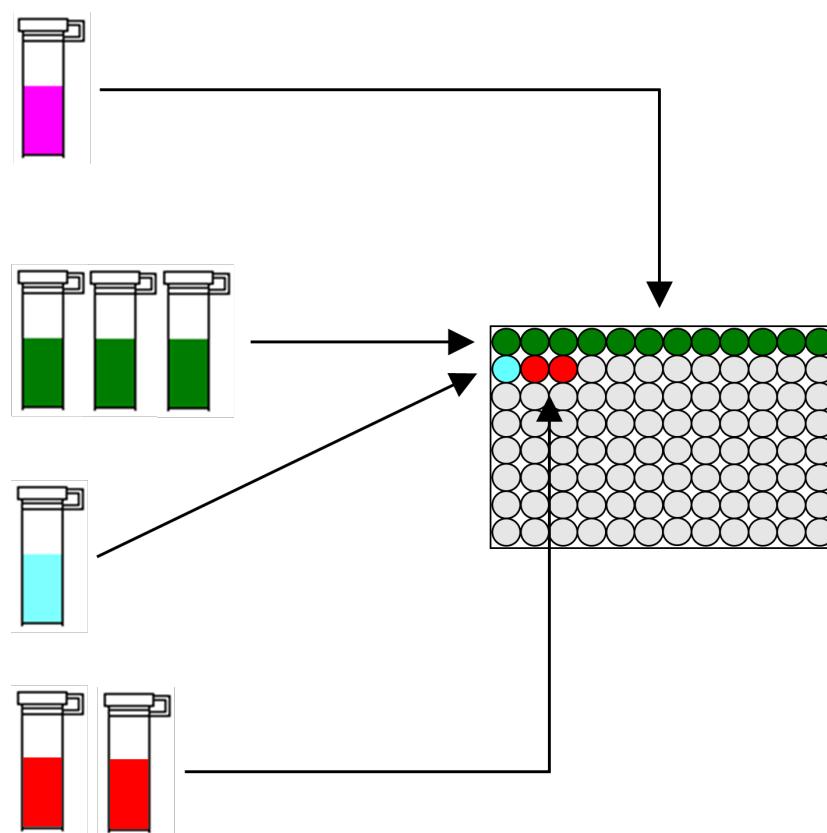
Se non si usa tutta la miscela di reazione, conservare il volume rimanente al buio a -20 °C per non più di un mese. Congelare e scongelare la miscela di reazione fino a **cinque volte**.

- Aggiungere alla miscela di reazione **10 µL** del primo campione trattato nel pozzetto designato, come precedentemente stabilito nel **Piano di lavoro**. Mescolare bene il campione pipettando il **DNA estratto** tre volte nella miscela di reazione. Evitare la creazione di bolle d'aria. Procedere allo stesso modo con gli altri campioni estratti.
- Aggiungere alla miscela di reazione **10 µL** di **acqua per uso in biologia molecolare** (non fornita) nel pozzetto del controllo negativo, come precedentemente stabilito nel **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo negativo pipettando l'**acqua per uso in biologia molecolare** tre volte nella miscela di reazione. Evitare la creazione di bolle d'aria.
- Aggiungere alla miscela di reazione **10 µL** di **MRSA/SA Positive Control** nel pozzetto designato, come precedentemente stabilito nel **Piano di lavoro**. Mescolare bene il campione pipettando il **MRSA/SA Positive Control** tre volte nella miscela di reazione. Evitare la creazione di bolle d'aria.
- Aggiungere alla miscela di reazione **10 µL** di **LGA251/SA Positive Control** nel pozzetto designato, come precedentemente stabilito nel **Piano di lavoro**. Mescolare bene il campione pipettando il **LGA251/SA Positive Control** tre volte nella miscela di reazione. Evitare la creazione di bolle d'aria.
- Sigillare accuratamente l'**Amplification microplate** con l'**Amplification Sealing Sheet** (foglio adesivo di amplificazione).
- Trasferire l'**Amplification microplate** nel thermal cycler per real time posto nell'area di amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione e avviare il ciclo termico di amplificazione. Salvare le impostazioni della sessione con un nome del file univoco e riconoscibile (ad es. "anno-mese-giorno-MRSA/SA-EGSpA").

NOTA

al termine del ciclo termico l'**Amplification microplate** con i prodotti di reazione deve essere rimossa dallo strumento ed eliminata senza produrre contaminazioni ambientali. Per evitare fuoriuscite dei prodotti di reazione, l'**Amplification Sealing Sheet** non deve essere rimosso dall'**Amplification microplate**

La figura sottostante illustra l'allestimento della reazione di amplificazione.



1. Aggiungere 20 μ L di PCR Mix
2. Aggiungere 10 μ L di DNA estratto
3. Aggiungere 10 μ L Controllo Negativo
4. Aggiungere 10 μ L di Controllo Positivo

Analisi Qualitativa dei risultati

I valori registrati di fluorescenza emessa dalla sonda del gene specifico a SA (detector TAMRA "SA"), dalle sonde dei geni *mecA* e *mecC* (detector FAM "mecA") e dalla sonda del controllo interno (detector Cy5 "IC") durante le reazioni di amplificazione devono essere analizzati con il software dello strumento.

Prima di iniziare l'analisi, seguire le raccomandazioni del produttore fornite nella documentazione dello strumento e:

- impostare (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) le **Impostazioni di analisi** per tutti i rivelatori su **Auto Baseline** e **Manual Ct**, con la **soglia (Threshold)** a **0,1**. Premere il pulsante **Analyze** e **salvare** i risultati.

I valori di fluorescenza emessi dalle sonde specifiche durante la reazione di amplificazione e il valore **soglia** della fluorescenza permettono di determinare il **Ciclo soglia (Ct, Threshold cycle)**. Il Ct è il ciclo in cui la fluorescenza ha raggiunto il valore di **soglia** ed è proporzionale alla quantità iniziale target.

Nelle reazioni di amplificazione di **MRSA/SA Positive Control** e **LGA251/SA Positive Control**, i valori di **Ct** dei rivelatori di SA e *mecA* (Results > Report) vengono usati per convalidare l'amplificazione e la rivelazione, come descritto nella tabella seguente:

Tabella 28

Reazione controllo positivo detector TAMRA "SA"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct \leq 35	POSITIVO	CORRETTA

Tabella 29

Reazione controllo positivo detector FAM "mecA"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct ≤ 35	POSITIVO	CORRETTA

Se il risultato dell'amplificazione del **Positive Control** è **Ct > 35 o Ct non determinato** per i detector SA e mecA, il DNA target non è stato rivelato correttamente. Ciò significa che si sono verificati problemi durante la fase di amplificazione o di rivelazione (erogazione scorretta della miscela di reazione o dei controlli positivi, degradazione della miscela di reazione o dei controlli positivi, impostazione scorretta della posizione del controllo positivo, impostazione scorretta del ciclo termico), che possono determinare risultati non corretti. La sessione non è valida e deve essere ripetuta a partire dalla fase di amplificazione.

Nella reazione di amplificazione del **controllo negativo**, i valori di **Ct** dei detector SA, mecA e IC (Results > Report) vengono usati per convalidare l'amplificazione e la rivelazione, come descritto nella tabella seguente:

Tabella 30

Reazione controllo negativo detector TAMRA "SA"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct indeterminato o Ct > 35	NEGATIVO	CORRETTA

Tabella 31

Reazione controllo negativo detector FAM "mecA"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct indeterminato o Ct > 35	NEGATIVO	CORRETTA

Tabella 32

Reazione controllo negativo Detector Cy5 "IC"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct indeterminato o Ct ≥ 34	NEGATIVO	CORRETTA

Se il risultato dell'amplificazione del **controllo negativo** è **Ct ≤ 35** per i detector di SA o mecA e **Ct < 34.0** per il detector IC, il DNA target non è stato rivelato correttamente. Ciò significa che si sono verificati problemi durante la fase di amplificazione (contaminazione) che possono determinare risultati non corretti e falsi positivi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta a partire dalla fase di amplificazione.

In ogni reazione di amplificazione del **campione**, i valori di **Ct** dei detector di SA o mecA vengono usati per rivelare il DNA target mentre il valore di **Ct** del controllo interno viene usato per convalidare l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione.

NOTA

Verificare sul software dello strumento (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) che il valore di **Ct** sia stato determinato mediante un aumento immediato e regolare della fluorescenza e non da fenomeni di picco o incremento del segnale di fondo (irregolare o elevato).

I valori di **Ct** delle reazioni di amplificazione di ciascun **campione** (Results > Report) vengono usati come descritto nella tabella seguente:

Tabella 33

Reazione del campione				Risultato del saggio	
detector TAMRA "SA" (Ct1)	detector FAM "mecA" (Ct2)	ΔCt Ct1 – Ct2	detector Cy5 "IC"	Risultato SA	Risultato MRSA
Non determinato o Ct > 35	Non determinato o Ct > 35	NA	Ct < 34	Negativo	Negativo
		NA	Non determinato o Ct ≥ 34	Non valido	Non valido
Determinato, Ct ≤ 35	Non determinato o Ct > 35	NA	NA	Positivo	Negativo
	Determinato, Ct ≤ 35	ΔCt ≥ 2	NA	Positivo	Negativo
		ΔCt < 2	NA	Positivo	Positivo
Non determinato o Ct > 35	Determinato, Ct ≤ 35	NA	NA	Negativo	Negativo

Tabella 34

Risultato del saggio		Interpretazione dei risultati
Risultato SA	Risultato MRSA	
Negativo	Negativo	Nessun DNA di SA, incluso MRSA, rivelato. Si presume negativo per tutti gli SA, inclusi MRSA, o il numero di microrganismi potrebbe essere inferiore al limite di rivelazione.
Non valido	Non valido	Risultato non valido. Ripetere l'analisi a partire dall'estrazione del campione o di un nuovo campione.
Positivo	Negativo	Nessun DNA di MRSA rivelato. Si presume negativo per MRSA o il numero di MRSA potrebbe essere inferiore al limite di rivelazione. DNA di SA rivelato. Si presume positivo per SA.
Positivo	Positivo	DNA di MRSA rivelato. Si presume positivo per MRSA.

NA = non applicabile

La presenza di entrambi i marcatori (gene SA e mecA) nella stessa quantità relativa misurata mediante il valore di Ct (differenza di Ct inferiore a 2) è indicativa di MRSA (incluso il ceppo mecC); quantità relative diverse (differenze di Ct uguali o superiori a 2) o la presenza del solo marcatore del gene specifico a *Staphylococcus aureus* sono indicative di SA.

Se il risultato della reazione di amplificazione del campione è **Ct non determinato o Ct > 35** per il detector SA e **mecA** e **Ct non determinato o Ct ≥ 34** per il detector IC, significa che era impossibile rivelare in modo efficace il DNA del controllo interno. In questo caso si sono verificati problemi durante la fase di amplificazione (inefficiente o assente) o durante la fase di estrazione (degradazione del DNA, perdita di DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nel DNA estratto) che possono determinare risultati non corretti o falsi negativi. Il campione non è idoneo, il saggio non è valido e deve essere ripetuto a partire dall'estrazione del campione o di un nuovo campione dello stesso paziente.

Se il risultato dell'amplificazione del campione è **Ct non determinato o Ct > 35** per il detector SA e **Ct < 34** per il detector IC, significa che il DNA di SA (incluso MRSA) non è rivelato nel campione elaborato. Il campione si presume sia negativo oppure il numero di microrganismi nel campione è inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedere Caratteristiche delle prestazioni). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

NOTA

quando viene rivelato DNA di SA o MRSA nel campione, il detector IC potrebbe presentare **Ct non determinato o Ct ≥ 34** . L'elevata efficienza dell'amplificazione di SA o MRSA può competere con la bassa efficienza dell'amplificazione del controllo interno. In questo caso il campione è idoneo e il risultato positivo del saggio è valido.

15 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con ALTRI STRUMENTI

15.1 Prestazioni cliniche

Le caratteristiche delle prestazioni del **MRSA/SA ELITE MGB Kit** sono state determinate confrontando il prodotto **MRSA/SA ELITE MGB Kit** usato in associazione con **NucliSENS® easyMAG®** con Remel Spectra™ MRSA, e/o test di agglutinazione/sensibilità. Un vero campione positivo per MRSA è stato definito come un campione in cui MRSA è stato identificato mediante una qualsiasi delle tecniche culturali usate. Un vero campione positivo per SA sensibile alla meticillina è stato definito come un campione negativo a tutte le tecniche culturali usate tranne il test di agglutinazione su lattice.

Da ciascun paziente è stato prelevato un tampone nasale, usato per inoculare una piastra di agar per lo screening selettivo cromogeno dell'MRSA (Remel Spectra™ MRSA). Il tampone è stato poi inserito in una provetta con brodo tripticasi-soia e mescolato a fondo prima che l'intero volume della sospensione cellulare fosse trattato come descritto sopra. Ogni tampone è stato in seguito sottoposto ad arricchimento in brodo di tripticasi-soia con NaCl al 6,5%. I campioni di colture arricchite sono stati inoculati su piastre di agar sangue con tripticasi-soia. Le colonie cresciute sulle piastre di agar sangue con tripticasi-soia sono state usate per il test di agglutinazione su lattice (Remel Staphaurex®). I campioni positivi all'agglutinazione su lattice sono stati usati per il test di sensibilità alla cefoxitina (BD BBL™ Sensi-Disc™ Susceptibility Test Disc Cefoxitin 20) come indicato dalle relative istruzioni per l'uso.

Le prestazioni del **MRSA/SA ELITE MGB Kit** sono state calcolate relativamente alla combinazione dei risultati della coltura cromogena diretta e della coltura in brodo seguita da agglutinazione su lattice e test di sensibilità alla cefoxitina.

Sono stati raccolti campioni di tamponi nasali forniti da strutture sanitarie e da donatori sani e, testati con una combinazione di saggi in coltura (come sopradescritto), sono stati identificati 20 campioni positivi in coltura per MRSA, 20 positivi in coltura per MSSA e 40 negativi per SA. 20 di questi ultimi campioni SA negativi sono stati evidenziati come ceppo MRSA BAA-2312 (caratterizzato da una mutazione nel gene *mecC* vicino al livello LoD (limite di rivelazione).

Rispetto al metodo culturale di riferimento, il **MRSA/SA ELITE MGB Kit** ha identificato il 100% dei campioni positivi per MRSA e MRSA *mecC* (sensibilità diagnostica) e il 97,5% dei campioni negativi (specificità diagnostica). Relativamente ai campioni testati, per MRSA il valore predittivo positivo (PPV) è stato del 97,6% e il valore predittivo negativo (NPV) del 100%.

Tabella 35 Risultati relativi a MRSA ottenuti con il MRSA/SA ELITE MGB Kit rispetto al metodo di riferimento.

	MRSA <i>mecA</i> Diagnostic sensitivity	MRSA <i>mecC</i> Diagnostic sensitivity	MRSADiagnostic specificity
7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument	100%	100%	97,5%
7500 Real Time PCR System	100%	100%	97,5%

Rispetto al metodo culturale di riferimento, il **MRSA/SA ELITE MGB Kit** ha identificato il 95% dei campioni positivi (sensibilità diagnostica) per SA e il 100% dei campioni negativi (specificità diagnostica). Relativamente ai campioni testati, per SA il valore predittivo positivo (PPV) è stato del 100% e il valore predittivo negativo (NPV) del 95%.

Tabella 36 Risultati relativi a SA ottenuti con il MRSA/SA ELITe MGB Kit rispetto al metodo di riferimento

	SA Sensibilità diagnostica	SA Specificità diagnostica
7500 Fast dx Real Time PCR Instrument	95%	100%
7500 Real Time PCR System	95%	100%

15.2 Prestazioni non cliniche**15.2.1 Limite di rilevazione**

Il limite di rilevazione (LoD) del **MRSA/SA ELITe MGB Kit** usato in associazione con **NucliSENS® easyMAG®** è stata determinato usando i ceppi riportati nella tabella sottostante. Le colture di questi ceppi sono state quantificate, diluite in matrice nasale simulata a valori compresi approssimativamente nell'intervallo 5-1500 unità formanti colonie (CFU) e assorbite su tamponi. Tutte le diluizioni sono state testate e il LoD è stato determinato mediante analisi Probit. Il LoD per ciascun ceppo rappresenta il numero più basso di CFU/tamponi per il quale verrà ottenuto un risultato positivo con il 95% di probabilità e con almeno il 95% di confidenza. Il LoD per ciascun ceppo è stato in seguito verificato testando almeno 20 replicati.

Tabella 37 Elenco dei ceppi batterici studiati per la determinazione del limite di rilevazione

Ceppo	Designazione	Descrizione	Resistenza farmacologica
ATCC 29213	Wichita	Ceppo QC	MSSA
ATCC BAA-1556	MRSA252	Infezione nosocomiale, UK	MRSA
ATCC BAA-2312	M10/0061	MECC	MRSA

Tabella 38 Risultati del limite di rilevazione

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

15.2.2 Efficienza della determinazione genotipica (inclusività)

Le prestazioni del **MRSA/SA ELITe MGB Kit** usato in associazione con **NucliSENS® easyMAG®** sono state testate con MRSA/SA QCMD proficiency panel. Tutti i ceppi sono stati correttamente identificati. Oltre a ciò il saggio¹ è stato testato nei confronti di 75 ceppi isolati ben caratterizzati di MRSA e di SA sensibili alla meticillina rappresentativi della diversità genetica globale, inclusi complessi clonali e tipi di sequenze, oltre a vari tipi di elettroforesi su gel in campo pulsato (PFGE) e valori di MIC (concentrazione minima inibitoria).

I ceppi sono stati ottenuti attraverso il programma Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA) e attraverso l'American Tissue Culture Collection (ATCC) o sono stati donati dal Medical College of Wisconsin².

Tutti i ceppi di SA sensibili alla meticillina sono stati inoltre testati a 1x10⁶ CFU/tamponi. Tutti i ceppi di SA sensibili alla meticillina hanno dato risultati positivi per SA e negativi per MRSA. Tutti i ceppi di MRSA hanno dato risultati positivi per MRSA. Due isolati BORSA (*Staphylococcus aureus* con resistenza borderline alla oxacillina), a cui mancava il gene *mecA*, testato positivo per SA e negativo per MRSA, che conduce ad una efficienza generale di rivelazione del genotipo (inclusività) del 97,3%.

1. Experimental data were obtained using NucliSENS® easyMAG® extraction system and 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument with an earlier version of the assay, which is identical to the current except that it lacks *mecALGA251* specific oligonucleotides.
2. Gift from Dr. Nathan A. Ledeboer, Medical College of Wisconsin, WI; the strains are described in: Buchan, B.W, Ledeboer, N.A. Identification of Two Borderline Oxacillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* From Routine Nares Swab Specimens by One of Three Chromogenic Agars Evaluated for the Detection of MRSA, *Microbiology and Infectious Disease*.2010:134,921-927

L'analisi delle regioni scelte per l'ibridazione dei primer e delle sonde fluorescenti nell'allineamento delle sequenze disponibili nel database degli elementi SSC *mecA*, incluso *mecC*, ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative.

15.2.3 Specificità analitica (cross reattività)

La specificità del **MRSA/SA ELITE MGB Kit** e l'assenza di significante omologia sono state valutate analizzando l'allineamento delle sequenze dei primer SA delle sonde fluorescenti con le sequenze di specie filogeneticamente correlate a *Staphylococcus aureus*, microrganismi patogeni e microrganismi comunemente presenti nella normale microflora nasale, disponibili nel database per microorganismi diversi da SA.

Tabella 39 Specie testate per la reattività crociata dall'analisi della sequenza in banca dati

Specie di <i>Staphylococci</i>		Altri microrganismi	Virus
<i>Staphylococcus arlettae</i>	CoNS	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Adenovirus tipo 1,7</i>
<i>Staphylococcus capitis</i>	CoNS	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Coronavirus umano (229E e OC43)</i>
<i>Staphylococcus carnosus</i>	CoNS	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Citomegalovirus</i>
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	CoNS	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Coxsackievirus tipo A21</i>
<i>Staphylococcus delphini</i>	MSCoPS	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Virus di Epstein Barr</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MSCoNS	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	<i>Virus A e B dell'influenza umana</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MRCoNS	<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Parainfluenza umana tipo 1, 2, 3, 4</i>
<i>Staphylococcus equorum</i>	CoNS	<i>Corynebacterium flavescent</i>	<i>Metapneumovirus umano</i>
<i>Staphylococcus felis</i>	CoNS	<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Virus del morbillo</i>
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	CoNS	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Virus della parotite</i>
<i>Staphylococcus hyicus</i>	CoPS	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Virus respiratorio sinciziale Tipo B</i>
<i>Staphylococcus intermedius</i>	CoPS	<i>Enterococcus flavescent</i>	<i>Rinovirus</i>
<i>Staphylococcus kloosii</i>	CoNS	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
<i>Staphylococcus lentus</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>	

Tabella 39 Specie testate per la reattività crociata dall'analisi della sequenza in banca dati (segue)

Specie di <i>Staphylococci</i>	Altri microrganismi	Virus
	<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* negativo alla coagulasi.

MSCoNS = *Staphylococcus* negativo alla coagulasi sensibile alla meticillina.

MRCoNS = *Staphylococcus* negativo alla coagulasi resistente alla meticillina.

CoPS = *Staphylococcus* positivo alla coagulasi.

15.2.4 Riproducibilità con materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica del saggio, come riproducibilità dei risultati confrontata con i risultati ottenuti utilizzando differenti metodiche in altri laboratori, è stata verificata testando un pannello di materiale di riferimento certificato.

I test sono stati eseguiti usando come materiale di riferimento calibrato e certificato un pannello di diluizioni di MRSA (QCMD 2012 Methicillin Resistant *S. aureus* EQA panel). Il pannello consta di sei campioni contenenti varie concentrazioni di MRSA, tre campioni contenenti *Staphylococcus aureus* sensibile alla meticillina (MSSA), un campione contenente Staphylococci negativi alla coagulasi resistenti alla meticillina (MRCoNS), un campione contenente *Escherichia coli* (*E. coli*) e due campioni veri negativi. Ogni campione del pannello è stato testato in 2 replicati seguendo l'intera procedura d'analisi, estrazione con NucliSENS® easyMAG® e amplificazione con i prodotti di ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 40 Test con il materiale di riferimento certificato

ID campione	Contenuto	Concentrazione del campione CFU/mL	Risultato atteso	Risultato ottenuto
MRSADNA10-04	MRSA	1×10^8	Frequentemente determinato	Determinato
MRSADNA10-03	MRSA	5×10^7	Frequentemente determinato	Determinato
MRSADNA10-01	MRSA	5×10^6	Frequentemente determinato	Determinato
MRSADNA10-09	MRSA	5×10^5	Frequentemente determinato	Determinato
MRSADNA10-08	MRSA	5×10^5	Frequentemente determinato	Determinato
MRSADNA10-02	MRSA	5×10^5	Determinato	Determinato
MRSADNA10-05	MSSA	5×10^6	MRSA negativo	MRSA negativo, SA positivo
MRSADNA10-06	MSSA	1×10^7	MRSA negativo	MRSA negativo, SA positivo
MRSADNA10-07	MSSA	5×10^6	MRSA negativo	MRSA negativo, SA positivo
MRSADNA10-12	MRCoNS	1×10^7	Negativo	Negativo
MRSADNA10-10	E. coli	5×10^6	Negativo	Negativo
MRSADNA10-11	MHBonly	-	Negativo	Negativo

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente.

15.2.5 Carry-Over / Contaminazione crociata

È stato condotto uno studio analitico per valutare il potenziale di contaminazione crociata tra campioni a elevato contenuto di MRSA (1×10^7 CFU/mL) e campioni negativi durante tutto il flusso di lavoro del **MRSA/SA ELITe MGB Kit**. Due operatori hanno eseguito cinque estrazioni di 24 campioni (11 campioni a elevato contenuto di MRSA, 11 campioni negativi, 1 controllo positivo e 1 controllo negativo per analisi) con uno schema a scacchiera (campioni a elevato contenuto di MRSA interrotti da campioni completamente negativi). I campioni trattati sono stati quindi amplificati in cinque analisi separate usando due diversi schemi a scacchiera. L'analisi di contaminazione crociata ha presentato zero falsi negativi sui 55 campioni positivi con elevato contenuto di MRSA e un falso positivo sui 55 campioni negativi..

I dati di carry-over / Contaminazione crociata sono stati ottenuti utilizzando il sistema di estrazione NucliSENS® easyMAG® e lo strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument con la versione precedente del prodotto **MRSA/SA ELITe MGB Kit**, che rispetto a quella attuale non disponeva di oligonucleotidi specifici per *mecA_{MECC}*.

NOTA

I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nella Sezione 7 del Fascicolo Tecnico di Prodotto "MRSA/SA ELITe MGB® Kit", FTP M800351.

16 BIBLIOGRAFIA

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 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti campioni clinici: tamponi nasali ed emocolture.

Al momento, non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con altri campioni clinici.

Non utilizzare DNA estratto contaminato con mucoproteine, glicole propilenico, etanolo o 2-propanolo con questo prodotto. Queste sostanze inibiscono l'amplificazione degli acidi nucleici e possono causare risultati invalidi.

Con questo prodotto non utilizzare DNA contenente alte quantità di DNA genomico umano che può inibire la reazione di amplificazione degli acidi nucleici.

I risultati ottenuti con questo prodotto dipendono dalla corretta identificazione, raccolta, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni. Per evitare risultati errati è necessario, pertanto, procedere con cautela durante queste fasi e seguire attentamente le istruzioni per l'uso riportate nel manuale fornito con il prodotto.

La metodica di amplificazione Real-Time utilizzata in questo prodotto ha un'elevata sensibilità analitica che la rende soggetta a contaminazioni da campioni clinici positivi, da controlli positivi e dagli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le contaminazioni possono produrre risultati falsi positivi. Il formato del prodotto è in grado di limitare le cross-contaminazioni; tuttavia, questi fenomeni possono essere evitati solo attenendosi alle buone prassi di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni riportate nel presente manuale.

Questo prodotto deve essere utilizzato da personale qualificato e addestrato alla manipolazione di campioni biologici potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati come pericolosi al fine di evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede l'uso di abbigliamento da lavoro e la disponibilità di aree idonee alla lavorazione di campioni biologici potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati come pericolosi al fine di evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e strumenti dedicati alla preparazione delle sessioni di lavoro per evitare risultati falsi positivi.

Questo prodotto deve essere utilizzato da professionisti qualificati e addestrati all'uso di tecniche di biologia molecolare, quali estrazione, amplificazione e rilevazione di acidi nucleici, per evitare risultati errati.

E' necessario disporre di aree separate per l'estrazione/preparazione delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione/rilevazione dei prodotti di amplificazione al fine di prevenire risultati falsi positivi.

A causa di differenze intrinseche tra tecnologie, si raccomanda agli utilizzatori di eseguire studi di correlazione al fine di valutare le differenze a livello tecnologico prima di cambiare prodotto.

Un risultato positivo ottenuto con questo prodotto non indica la presenza di SA o MRSA vitale ma è presuntivo per la presenza di SA or MRSA. Pertanto, un risultato positivo non indica necessariamente un fallimento dell'intervento di eradicazione poiché il DNA non vitale può persistere.

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il DNA di SA o MRSA non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione, ma non si può escludere che il DNA di SA o MRSA abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (si veda [12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius pagina 19](#)). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

Un risultato negativo a seguito di un risultato precedentemente positivo può indicare o meno il successo dell'eradicazione.

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi per via di un difetto del controllo interno. In questo caso il campione dovrà essere analizzato di nuovo, a cominciare dall'estrazione, con conseguente possibile ritardo nel conseguimento dei risultati finali.

Sebbene rari, possibili polimorfismi, nella regione del genoma batterico coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione del DNA target.

La rilevazione di MRSA in presenza di quantità in eccesso di meticillina sensibile SA or coagulase-negative *mecA*-carriers potrebbe essere compromessa.

Gli *Staphylococcus aureus* Borderline Oxacillin Resistant (BORSA) che non portano il gene *mecA*, non vengono rilevati dal prodotto.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati insieme a tutte le osservazioni cliniche rilevanti e agli esiti degli esami di laboratorio.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, vi è un rischio residuo di ottenere con questo prodotto risultati non validi, falsi positivi e falsi negativi. Tale rischio residuo non può essere eliminato né ulteriormente ridotto. In taluni casi, potrebbe indurre decisioni sbagliate con effetti potenzialmente pericolosi per il paziente. Comunque, questo rischio residuo associato all'uso previsto del prodotto è stato valutato in rapporto ai benefici potenziali per il paziente ed è stato considerato accettabile.

18 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

Tabella 41

Reazione del Controllo Positivo non valida

Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix e del Controllo Positivo. Controllare i volumi della PCR Mix e del Controllo Positivo.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la PCR Mix per più di 5 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non utilizzare la PCR Mix per più di 5 sessioni consecutive (nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione del Controllo Positivo.	Non utilizzare il Controllo Positivo per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione o nel blocco refrigerato). Utilizzare nuove aliquote di Controllo Positivo.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A.

Tabella 42

Reazione del Controllo Negativo non valida

Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix e del Controllo Negativo. Controllare i volumi della PCR Mix e del Controllo Negativo.
Contaminazione del Controllo Negativo.	Non utilizzare il Controllo Negativo per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.

Tabella 42 (segue)

Reazione del Controllo Negativo non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack e dell'area reagenti o dell'unità refrigerata.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

Tabella 43

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix, del Controllo Interno e del campione. Controllare i volumi della PCR Mix, del Controllo Interno e del campione.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la PCR Mix per più di 5 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non utilizzare la PCR Mix per più di 5 sessioni consecutive (nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione del Controllo Interno.	Utilizzare una nuova aliquota di Controllo Interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR). Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione in una sessione in modalità "Extract + PCR".
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

Tabella 44

Curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	Soluzioni
Assenza di un picco definito. Picco definito ma Tm differenti da quelle degli altri campioni e da quelle del Controllo Positivo.	Controllare che il Ct del target sia inferiore a 30. Elevate quantità del prodotto di amplificazione alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di dissociazione. Ripetere l'amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Il target nel campione deve essere sequenziato per confermare la mutazione.

Tabella 45

Errore nel calcolo del Ct	
Possibili cause	Soluzioni
Concentrazione troppo elevata del target nel campione o campione con anomala forma del plot.	<p>Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa selezionare il track relativo al campione e approvare manualmente il risultato come positivo.</p> <p>Se nel PCR plot non appare nessuna amplificazione selezionare il rack relativo al campione e approvare manualmente il risultato come negativo o lasciarlo invalido.</p> <p>Se è richiesto un valore di Ct:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ripetere la reazione di amplificazione del campione eluito con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR) oppure - ripetere l'estrazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "Extract + PCR" (Estrazione + PCR).

Tabella 46

Alto tasso anormale di risultati positivi nella stessa sessione (reazioni con valori Ct tardivi simili)	
Possibili cause	Soluzioni
Contaminazione da campione a campione durante le fasi preanalitiche.	<p>Pulire la micropipetta, con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o un detergente per DNA/RNA, dopo aver pipettato ciascun campione</p> <p>Non utilizzare pipette Pasteur. Le pipette devono essere del tipo a spostamento positivo o utilizzate con puntali con filtro per aerosol.</p> <p>Introdurre campioni nelle ultime posizioni degli strumenti, come indicato dalla GUI. Seguire la sequenza di caricamento indicata dal software.</p>
Contaminazione ambientale di laboratorio	<p>Pulire tutte le superfici a contatto con l'operatore e i campioni (comprese le pipette) con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o un detergente per DNA/RNA</p> <p>Eseguire un ciclo di decontaminazione UV.</p> <p>Utilizzare una nuova provetta di PCR Mix e / o CTR CPE</p>

Piattaforme aperte

Tabella 47

DNA Target non rilevato nella reazione del Controllo Positivo	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastra.	<p>Prestare attenzione quando si dispensano le reazioni nei pozzetti della micropiastra e attenersi al foglio di lavoro.</p> <p>Controllare i volumi della PCR Mix e del Controllo Positivo dispensati.</p>
Degradazione della PCR Mix	Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Degradazione del Controllo Positivo	Utilizzare nuove aliquote di Controllo Positivo.
Errata impostazione dello strumento	<p>Controllare la posizione della PCR Mix, e del Controllo Positivo nello strumento.</p> <p>Controllare il ciclo termico impostato sullo strumento.</p>

Tabella 48

DNA Target non rilevato nella reazione del Controllo Negativo	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastra.	Evitare di versare il contenuto della provetta del campione. Cambiare sempre i puntali tra un campione e l'altro Fare attenzione quando si dispensano campioni, controlli negativi, controlli positivi nei pozzetti della micropiastra e attenersi al foglio di lavoro.
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix, del Controllo Negativo, del Controllo positivo sullo strumento
Micropiastra sigillata male	Sigillare con attenzione la micropiastra.
Contaminazione dell'acqua per biologia molecolare	Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack e dell'area reagenti o dell'unità refrigerata.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.

Tabella 49

Presenza di fluorescenza di fondo irregolare o elevata nelle reazioni	
Possibili cause	Soluzioni
Errata dispensazione del campione.	Controllare i volumi dei reagenti e dei campioni dispensati nelle micropiastre di Q-PCR.
Errore nell'impostazione della "baseline".	Impostare l'intervallo di calcolo della "baseline" in un ambito di cicli in cui la fluorescenza di fondo sia già stabilizzata (controllare le registrazioni "Results", "Component") e la fluorescenza del segnale non abbia ancora cominciato a crescere, per esempio dal ciclo 6 al ciclo 15. Impostare il calcolo automatico della "baseline" selezionando l'opzione "Auto Baseline".

Tabella 50

Curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	Soluzioni
Assenza di un picco definito. Picco definito ma Tm differente da quella degli altri campioni, degli Standard o del Controllo Positivo.	Controllare che il Ct del detector FAM sia minore di 30. Quantità elevate di prodotto di amplificazione presenti alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di dissociazione. Ripetere l'amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Per confermare la presenza di una mutazione il DNA bersaglio presente nel campione dovrebbe essere sequenziato.

19 LEGENDA DEI SIMBOLI

REF	Numero di catalogo
	Limite superiore di temperatura
LOT	Codice del lotto.
	Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).
IVD	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i> .
	Conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98/79/EC relativa ai dispositivi medici diagnostici <i>in vitro</i> .
UDI	Numero Unico Identificativo del dispositivo
	Contenuto sufficiente per "N" test.
	Consultare le istruzioni per l'uso
CONT	Contenuto.
	Tenere lontano dalla luce solare.
	Fabbricante.

20 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

Questo prodotto contiene reagenti fabbricati da Thermo Fisher Scientific e venduti sulla base di accordi di licenza stipulati tra ELITechGroup S.p.A. e le sue affiliate e Thermo Fisher Scientific. Il prezzo d'acquisto di questo prodotto include diritti non trasferibili, limitati a utilizzare solo questa quantità di prodotto esclusivamente per attività dell'acquirente direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sulla licenza d'acquisto per questo prodotto per fini diversi da quelli dichiarati sopra, rivolgersi a Licensing Department, Thermo Fisher Scientific. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

I reagenti di rilevazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. numero 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, e brevetti EP numero 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161. Sono state poi presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

Le tecnologie ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® sono coperte da brevetti e oggetto di domande di brevetto.

Questa licenza limitata permette all'individuo o alla persona giuridica alla quale il prodotto è stato fornito di utilizzarlo unitamente ai dati generati dal suo utilizzo solo per la diagnostica umana. Né ELITechGroup S.p.A. né i suoi licenziatari concedono altre licenze, esplicite o implicite, per altri scopi.

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, il logo ELITe MGB®, ELITe InGenius® ed ELITe BeGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup all'interno dell'Unione Europea.

Appendix A MRSA/SA ELITe MGB Kit used in association with Genius series® platforms



CAUTION

This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com

INTENDED USE

The **MRSA/SA ELITe MGB® Kit** is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as a qualitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the detection of the DNA of *Staphylococcus aureus* (SA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA, including the meC strain), extracted from clinical specimens.

The assay is validated in association with the **ELITe InGenius®** and **ELITe BeGenius®** instruments, automated and integrated systems for extraction, Real-Time PCR and results interpretation, using human specimens of nasal swabs and blood culture.

The assay is also validated in association with the **7500 Real-Time PCR Instrument**, using human specimens of nasal swabs and blood culture.

The product is intended for use as an aid in prevention and control of MRSA infections in healthcare settings and is intended to aid in the diagnosis of MRSA infections, not to guide or monitor treatment for MRSA infections. A negative result does not preclude MRSA/SA nasal colonization. Concomitant cultures are necessary to recover organisms for epidemiological typing or for further susceptibility testing.

The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observations and laboratory outcomes.

Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target 1	conservative region in the coagulase positive <i>Staphylococcus aureus</i> gene	AP554	SA
Target 2	conservative regions in the meC and meC genes (responsible for resistance to methicillin and other beta-lactam antibiotics)	FAM	MeCA
Internal Control	artificial sequence IC2	AP642	IC

Validated matrix

- Nasal swab collected in eNAT™ kit
- Nasal swabs collected in eSwab Collection Kit
- Blood Culture

Kit content and related products

MRSA/SA ELITe MGB Kit (M800351)	MRSA/SA ELITe - Positive Control (M800356)
 X 4	 X 2  X 2
MRSA/SA PCR Mix 4 tubes of 540 µL 24 reactions per tube 96 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles per tube	MRSA/SA - Positive Control and LGA251/ SA Positive Control 2 tubes of 160 µL for MRSA/SA 2 tubes of 160 µL for LGA251/SA 5 reactions per tube 10 reactions per kit 12 freeze-thaw cycles
Maximum shelf-life:	24 months
Storage temperature	≤ -20°C

Other products required not provided in the kit

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

ELITe InGenius and ELITe BeGenius protocol

› Sample volume	200 µL	› Eluate PCR input volume	10 µL
› CPE volume	10 µL	› Q—PCR Mix volume	20 µL
› Total elution volume	100 µL (with BC) or 50 µL (with NS)	› Frequency of controls	15 days

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Sensitivity	Specificity
Nasal Swab	1000 copies / mL	MSSA: 93% (56/60) MRSA: 98% (40/41)	100 % (48/48)
Blood Culture	2000 copies / mL	MSSA: 100% (39/39) MRSA: 100% (31/31)	100 % (34/34)

Sample preparation

This product is intended for use on the **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** with the following clinical specimens identified according to laboratory guidelines, and collected, transported, and stored under the following conditions.

Table 51

Specimen	Collection requirements	Transport/Storage conditions			
		+16 / +26 °C (room temperature)	+2° / +8°C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
nasal swab	collected with eNAT™ kit	-	≤ 4 weeks	≤ 6 months	-
nasal swab	collected with eSwab Collection Kit	≤ 2 hours	≤ 48 hours	≤ 6 months	-
blood culture	-	≤ 24 hours	-	-	-

ELITe InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface of ELITe InGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Three operational modes are available: complete run, PCR only or extraction only.

Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius. Log in with username and password. Select the mode “CLOSED”.	2. Verify controls: Positive Control and Negative Control in the “Controls” menu. Note: Both must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the PCR Mix and the CTRCPE tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.
-------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR (e.g., samples)

1. Select “Perform Run” on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: “200 µL”, elution: “50 µL” (with NS) or “100 µL” (with BC)	3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the “Assay Protocol” of interest: MRSA-SA ELITe_NS_200_50 or MRSA-SA ELITe_BC_200_100.	5. Select the method “Extract + PCR” and the sample position: Extraction Tube	6. Load the PCR Mix and the Internal Control in the Inventory Block
7. Load: PCR Cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

NOTE

If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user’s manual for procedure.

Procedure 2: PCR only (e.g., eluates, controls)

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "50 µL" (with NS) or "100 µL" (with BC)	3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay Protocol" of interest: MRSA-SA ELITe_NS_200_50 or MRSA-SA ELITe_BC_200_100, MRSA-SA ELITe_PC_200_100 or MRSA-SA ELITe_PC_200_50, MRSA-SA ELITe_NC_200_100 or MRSA-SA ELITe_NC_200_50	5. Select the method "PCR Only" and the sample position "Elution Tube"	6. Load the PCR Mix in the Inventory Block
7. Load: PCR Cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

ELITe BeGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface of ELITe BeGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Three operational modes are available: complete run, PCR only or extraction only.

Before analysis

1. Switch on ELITe BeGenius. Log in with username and password. Select the mode "CLOSED".	2. Verify controls: Positive Control and Negative Control in the "Controls" menu. Note: Both must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the PCR Mix and the CTRCPE tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.
-------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR (e.g., samples)

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extract and PCR»	2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the Cooler Unit. The barcode scan is already active	3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "50 µL" (with NS) or "100 µL" (with BC)
4. Select the "Assay Protocol" of interest: MRSA-SA ELITe_Be_NS_200_50 or MRSA-SA ELITe_Be_BC_200_100. Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4	5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load the PCR Mix and the Internal Control in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
7. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette" and the "Extraction Basket" with the "ELITe InGenius SP 200" extraction cartridges and the required extraction consumables	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

NOTE

If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user's manual for procedure.

Procedure 2: PCR only (e.g., eluates, controls)

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «PCR Only»	2. Load the extracted nucleic acid or controls barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "50 µL" (with NS) or "100 µL" (with BC)
4. Select the "Assay Protocol" of interest: MRSA-SA ELITe_Be_NS_200_50 or MRSA-SA ELITe_Be_BC_200_100, MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_100 or MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_50 MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_100 or MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_50	5. Load the PCR-Mix in the Reagent/ Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette"
7. Close the door. Start the run	8. View, approve and store the results	

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

