



ELITechGroup S.p.A.  
C.so Svizzera, 185  
10149 Torino ITALIA

Offices: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11  
E-mail: [emd.support@elitechgroup.com](mailto:emd.support@elitechgroup.com)  
Website: [www.elitechgroup.com](http://www.elitechgroup.com)

## NOTICE of CHANGE dated 13/10/2020

### IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

# « MRSA/SA ELITe MGB Kit » Ref. M800351

This new revision of the Instruction for Use (IFU) contains the following changes:

- *Introduction of the new product reference "ELITe InGenius Sonication tubes" (ref. INT032SON) to be used in combination with the product for sample sonication.*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

### PLEASE NOTE



LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT



THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT



CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT



LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT



A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT



DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS



**MRSA / SA ELITe MGB® Kit**  
Reagenz für die DNA-Amplifikation in  
Echtzeit

REF M800351

### ERLÄUTERUNG DES ASSAYS

*Staphylococcus aureus* ist ein opportunistischer Erreger, der als kommensaler Organismus auf der Haut und in den Nasenlöchern von etwa 30 % der Normalbevölkerung vorkommt und ein breites Spektrum von Krankheiten verursachen kann. SA und insbesondere MRSA sind durchweg eine der Hauptursachen für nosokomiale Infektionen und mit einer hohen Morbidität und Mortalität sowie erheblichen Kosten verbunden. Das Auftreten von Community-assoziierten MRSA-Infektionen erfordert eine aktive Überwachung von Patienten, die mit SA und MRSA in Krankenhäuser oder andere Gesundheitseinrichtungen eingewiesen werden, um Patienten zu identifizieren, die ein Infektionsreservoir für andere Patienten darstellen könnten.

Das „MRSA / SA ELITe MGB® Kit“ ist ein auf Echtzeit-Amplifikation basierender Triplex-Assay, der auf die konservativen Regionen in einem **Staphylococcus aureus-spezifischen Gen** abzielt, das für die Identifizierung von Koagulase-positivem SA verantwortlich ist. Der Assay zielt auch auf das **mecA-Gen** ab, einschließlich der **mecC**-Variante, die kürzlich als **mecC-Gen** bezeichnet wurde (Ito T. et al.) und für die Resistenz gegen Methicillin und andere Beta-Lactam-Antibiotika verantwortlich ist, sowie auf eine exogene interne Kontrolle, um die Reaktionshemmung und die Integrität des Reagenzes zu kontrollieren.

Das *Staphylococcus aureus*-spezifische Gen weist eindeutig auf Koagulase-positiven SA hin, und die *mecA*-Gene weisen eindeutig auf Methicillinresistenz hin. Das Vorhandensein beider Marker in der gleichen relativen Menge, gemessen als Differenz beim Zyklussschwellenwert, ist ein Hinweis auf MRSA; unterschiedliche relative Mengen oder das Vorhandensein nur des *Staphylococcus aureus*-spezifischen Genmarkers sind ein Hinweis auf SA.

Auf Echtzeit-Amplifikation basierende MRSA/SA-Assays verkürzen die Laborzeit im Vergleich zu Standard-Kulturtests erheblich und verbessern die Effizienz des Verfahrens. Aktuelle Echtzeit-PCR-MRSA-Nachweistests zielen auf die SCC<sub>mec</sub>-Insertionsstelle (*mecA*-tragendes mobiles genetisches Element, genannt Staphylokokken-Kassetten-Chromosom) und/oder das *mecA*-Gen und/oder das *spa*-Gen ab. Das „MRSA / SA ELITe MGB® Kit“ zielt auf konservative Regionen in den genetischen Markern von MRSA und SA ab, wodurch falsch negative Ergebnisse aufgrund einer natürlichen Variabilität der SCC<sub>mec</sub>-Insertionsstelle und falsch positive Ergebnisse aufgrund des Problems der „leeren Kasette“ auf ein Minimum reduziert werden.

### TESTPRINZIPIEN

Der Assay besteht aus einer Echtzeit-Amplifikationsreaktion mit einem programmierbaren Thermostat, der mit einem optischen System zum Fluoreszenznachweis ausgestattet ist.

Die für das SA-spezifische Gen spezifische Sonde basiert auf der ELITe MGB®-Technologie und ist mit AP554-Fluorophor (ähnlich TAMRA) markiert. Sie wird aktiviert, wenn eine Hybridisierung mit dem spezifischen Produkt der *Staphylococcus aureus*-Amplifikationsreaktion stattfindet.

Die für das *mecA*- und das *mecC*-Gen spezifischen Sonden basieren auf der ELITe MGB®-Technologie und sind mit FAM-Fluorophor markiert. Sie werden aktiviert, wenn eine Hybridisierung mit dem spezifischen Produkt der Antibiotikaresistenzgen-Amplifikationsreaktionen stattfindet.

Die für die Internal Control spezifische Sonde basiert auf der ELITe MGB®-Technologie und ist mit AP642-Fluorophor (ähnlich Cy5) markiert. Sie wird aktiviert, wenn eine Hybridisierung mit dem spezifischen Produkt der Amplifikationsreaktion der Internal Control stattfindet.

Die Fluoreszenzemission erhöht sich mit zunehmender Menge des spezifischen Produkts der Amplifikation und wird vom Gerät gemessen und aufgezeichnet. Durch die Verarbeitung der Daten lässt sich das Vorhandensein von MRSA- oder SA-DNA in der Ausgangsprobe nachweisen.

Der Test ist mit den in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Systemen validiert.

## MRSA/SA ELITe MGB® Kit

Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF M800351



### INHALTSVERZEICHNIS

VERWENDUNGSZWECK	Seite 1
ERLÄUTERUNG DES ASSAYS	Seite 2
TESTPRINZIPIEN	Seite 2
PRODUKTBESCHREIBUNG	Seite 4
IM LIEFERUMFANG DES PRODUKTS ENTHALTENE MATERIALIEN	Seite 4
BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)	Seite 4
SONSTIGE BENÖTIGTE PRODUKTE	Seite 5
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	Seite 6
ELITE INGENIUS®	Seite 7
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 7
VERFAHREN	Seite 8
LEISTUNGSMERKMALE	Seite 14
ANDERE SYSTEME	Seite 17
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 17
VERFAHREN	Seite 19
LEISTUNGSMERKMALE	Seite 24
QUELLENANGABEN	Seite 28
GRENZEN DES VERFAHRENS	Seite 28
FEHLERBEHEBUNG	Seite 29
SYMBOLS	Seite 31
HINWEIS AN DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ	Seite 32

### VERWENDUNGSZWECK

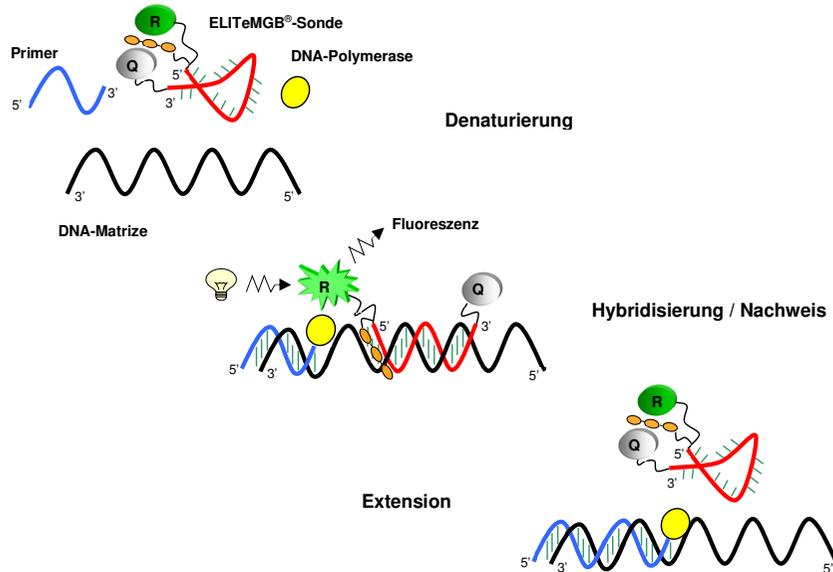
Das Produkt „MRSA/SA ELITe MGB® Kit“ ist teil eines qualitativen Nukleinsäure-Amplifikationstests zum **Nachweis von *Staphylococcus aureus* (SA) und Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA, einschließlich des kürzlich identifizierten *mecC*-Stamms) in DNA-Proben, die aus Nasenabstrichen und Blutkulturen extrahiert wurden.**

Das Produkt dient der Vorbeugung und Kontrolle von MRSA-Infektionen im Gesundheitswesen und soll bei der Diagnose von MRSA-Infektionen helfen, nicht aber die Behandlung von MRSA-Infektionen anleiten oder überwachen. Ein negatives Ergebnis schließt eine nasale MRSA/SA-Kolonisation nicht aus. Begleitende Kulturen sind erforderlich, um Organismen für die epidemiologische Typisierung oder für weitere Empfindlichkeitstests zu gewinnen.

**MRSA / SA ELITe MGB® Kit**  
Reagenz für die DNA-Amplifikation in  
Echtzeit

REF M800351

In der folgenden Abbildung ist der Mechanismus der Aktivierung und Fluoreszenzemission der ELITe MGB®-Technologie-Sonde dargestellt. Bitte beachten Sie, dass die Sonde während des Amplifikationszyklus nicht hydrolysiert wird.



**MRSA / SA ELITe MGB® Kit**  
Reagenz für die DNA-Amplifikation in  
Echtzeit

REF M800351

**PRODUKTBESCHREIBUNG**

Das Produkt „MRSA/SA ELITe MGB® Kit“ liefert das **gebrauchsfertige** Komplettgemisch für die Echtzeit-Amplifikation in einer stabilisierenden Lösung. Das Gemisch ist in **vier gebrauchsfertige Teströhrchen** aliquotiert. Jedes Röhrchen enthält **540 µl** Lösung, die für **24 Tests** mit dem „ELITe InGenius®“ und **25 Tests** mit anderen Systemen ausreicht.

Die *Staphylococcus aureus*-spezifischen genspezifischen Primer und die Sonde (stabilisiert durch die MGB®-Gruppe, markiert mit dem AP554-Fluorophor (AquaPhluor® 554), ähnlich TAMRA, und ausgelöscht mit einem nicht fluoreszierenden Molekül) sind spezifisch für eine konservative Region im Koagulase-positiven *Staphylococcus aureus*.

Die für das *mecA*- und das *mecC*-Gen spezifischen Primer und Sonden (stabilisiert durch die MGB®-Gruppe, markiert mit FAM-Fluorophor und ausgelöscht mit einem nicht-fluoreszierenden Molekül) sind spezifisch für eine konservative Region im *mecA*- und im *mecC*-Gen, die für die Resistenz gegen Methicillin und andere Beta-Laktam-Antibiotika verantwortlich sind.

Die Primer und die Sonde der Internal Control (stabilisiert durch die MGB®-Gruppe, markiert mit dem AP642-Fluorophor, ähnlich Cy5, und ausgelöscht mit einem nicht fluoreszierenden Molekül) sind spezifisch für eine nicht-infektiöse Plasmid-DNA, die künstliche **Internal Control**-Sequenzen enthält.

Das Reaktionsgemisch enthält außerdem Puffer, Magnesiumchlorid, Triphosphatnukelotide, AP593-Fluorophor (ähnlich ROX), das als passive Referenz zur Normalisierung der Fluoreszenz verwendet wird, das Enzym Uracil-N-Glycosidase (UNG) zur Inaktivierung der Kontamination durch das Amplifikationsprodukt sowie die „Warmstart“-DNA-Polymerase.

Das Produkt reicht aus für **96 Tests mit ELITe InGenius** einschließlich Kontrollen.

Das Produkt reicht aus für **100 Tests mit anderen Systemen** einschließlich Kontrollen.

**IM LIEFERUMFANG DES PRODUKTS ENTHALTENE MATERIALIEN**

Komponente	Beschreibung	Menge	Gefahrenklasse
MRSA/SA PCR Mix	Komplettes Reaktionsgemisch	4 x 540 µl	-

**BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)**

- Laminar-Flow-Haube.
- Puderfreie Einweghandschuhe aus Nitril oder einem ähnlichen Material.
- Vortex-Mixer.
- Tisch-Mikrozentrifuge (12.000–14.000 U/min).
- Mikropipetten und sterile Aerosolbarrierespitzen oder sterile Direktverdrängerspitzen (2–20 µl, 5–50 µl, 50–200 µl, 200–1000 µl).
- Hochreines Wasser für die Molekularbiologie.
- Trypticase-Soja-Bouillon.
- Programmierbarer Thermocycler mit optischem Fluoreszenznachweissystem 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems®) oder 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), gemäß den Herstelleranweisungen kalibriert.

**SONSTIGE BENÖTIGTE PRODUKTE**

Die Reagenzien für die Probenentnahme und die DNA-Extraktion aus den Proben, die interne Kontrolle, die Positivkontrolle der Amplifikation und die Verbrauchsmaterialien **sind nicht** im Lieferumfang dieses Produkts enthalten.

Das generische Produkt „**eSwab Collection Kit**“ (Copan, Art.-Nr. 480CE) wird für die Entnahme von Patientenproben empfohlen, wenn der Assay in Kombination mit „**ELITe InGenius**“ verwendet wird.

Das generische Produkt „**eNAT™ kit**“ (Copan, Art.-Nr. 608CS01R) wird für die Entnahme von Patientenproben empfohlen, wenn der Assay in Kombination mit „**ELITe InGenius**“ verwendet wird.

Das generische Produkt „**BBL CultureSwab Plus Amies Gel without Charcoal swabs**“ (Becton-Dickinson, Art.-Nr. 220116) wird für die Entnahme von Patientenproben empfohlen, wenn der Assay in Kombination mit dem Extraktionssystem EasyMag und dem 7500 Fast Dx Real-Time PCR Thermocycler verwendet wird.

Für die automatische DNA-Extraktion, Echtzeit-Amplifikation und Ergebnisinterpretation von zu analysierenden Proben werden das Gerät „**ELITe InGenius**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT030) und die folgenden spezifischen Assay-Protokolle benötigt:

- Parameter für die Amplifikations-Positivkontrolle „**MRSA-SA ELITe\_PC**“ (ELITechGroup S.p.A.),
- Parameter für die Amplifikations-Negativkontrolle „**MRSA-SA ELITe\_NC**“ (ELITechGroup S.p.A.),
- Parameter für zu analysierende Proben „**MRSA-SA ELITe\_NS\_200\_50**“ und „**MRSA-SA ELITe\_BC\_200\_100**“ (ELITechGroup S.p.A.).

Für die automatische Probenanalyse mit dem Gerät „**ELITe InGenius**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT030) werden die folgenden generischen Produkte benötigt:

- Extraktionskartuschen „**ELITe InGenius® SP 200**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032SP200),
- Verbrauchsmaterialien für die Extraktion und Amplifikation „**ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032CS),
- Verbrauchsmaterialien für die Sonifikation „**ELITe InGenius® Sonication tubes**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032SON),
- Amplifikationskartuschen „**ELITe InGenius® PCR Cassette**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT035PCR),
- Spitzen „**300 µL Universal Filter Tips**“ (Axygen BioScience Inc., CA, Art.-Nr. TF-350-L-R-S),
- Abfallboxen „**ELITe InGenius® Waste Box**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. F2102-000).

Für die automatische DNA-Extraktion aus zu analysierenden Proben sind generischen Produkte „**NucliSENS® easyMAG® Strip for Premix**“ (bioMérieux SA, Art.-Nr. 278303), „**bioHit Electronic Multichannel Pipettor**“ (bioMérieux SA, Art.-Nr. 280141), „**Filter tips for bioHit**“ (bioMérieux SA, Art.-Nr. 280146) und „**NucliSENS® easyMAG® Reagents**“ (bioMérieux SA, Art.-Nr. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135) zusammen mit dem Gerät „**NucliSENS® easyMAG®**“ (bioMérieux SA, Art.-Nr. 200111) ebenfalls validiert.

Als Vorlage für die Internal Control der Extraktion und Inhibition wird das generische Produkt „**CPE - Internal Control**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. CTCPE) benötigt. Dabei handelt es sich um eine stabilisierte Lösung, die zwei Plasmid-DNAs und die genomische RNA des MS2-Phagen enthält.

Beim Einsatz eines 7500 Fast Dx Real-Time PCR System für die DNA-Amplifikation muss das generische Produkt „**Q - PCR Microplates Fast**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. RTSACC02), Mikrotiterplatten mit 0,1-ml-Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation, verwendet werden.

Beim Einsatz eines 7500 Real-Time PCR System für die DNA-Amplifikation muss das generische Produkt „**Q - PCR Microplates**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. RTSACC01), Mikrotiterplatten mit 0,2-ml-Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation, verwendet werden.

Das Hauptprodukt „**MRSA/SA - ELITe Positive Control**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. M800356), Amplifikations-Positivkontrolle von Plasmid-DNA, wird als Amplifikations-Positivkontrolle benötigt.

**WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

**Dieses Produkt ist ausschließlich für die *In-vitro*-Anwendung bestimmt.**

**Allgemeine Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen**

Alle biologischen Proben sind so zu handhaben und zu entsorgen, als wären sie potenziell infektiös. Direkten Kontakt mit biologischen Proben vermeiden. Verspritzen und Aerosolbildung vermeiden. Die Materialien, die mit biologischen Proben in Kontakt kommen, müssen vor der Entsorgung mindestens 30 Minuten mit 3 % Natriumhypochlorit behandelt oder eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

Alle zur Durchführung des Tests verwendeten Reagenzien und Materialien sind so zu handhaben und zu entsorgen, als wären sie potenziell infektiös. Direkten Kontakt mit den Reagenzien vermeiden. Verspritzen und Aerosolbildung vermeiden. Abfall ist unter Einhaltung angemessener Sicherheitsstandards zu handhaben und zu entsorgen. Brennbares Einwegmaterial muss verbrannt werden. Saurer und basischer Flüssigabfall muss vor der Entsorgung neutralisiert werden.

Geeignete Schutzkleidung und Handschuhe zum Schutz der Augen und des Gesichts tragen.

Lösungen niemals mit dem Mund pipettieren.

Essen, Trinken, Rauchen und Schminken sind in den Arbeitsbereichen verboten.

Die Hände nach der Handhabung von Proben und Reagenzien gründlich waschen.

Übrig gebliebene Reagenzien und Abfälle gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.

Vor Durchführung des Tests alle dem Produkt beiliegenden Anweisungen aufmerksam lesen.

Bei der Durchführung des Tests die dem Produkt beiliegenden Anweisungen befolgen.

Das Produkt darf nach Ablauf des angegebenen Ablaufdatums nicht mehr verwendet werden.

Es dürfen nur die mit dem Produkt bereitgestellten und vom Hersteller empfohlenen Reagenzien verwendet werden.

Reagenzien von anderen Chargen dürfen nicht verwendet werden.

Reagenzien von anderen Herstellern dürfen nicht verwendet werden.

**Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für molekularbiologische Anwendungen**

Molekularbiologische Verfahren, wie die Nukleinsäureextraktion, -amplifikation und -detektion, dürfen nur von qualifiziertem und geschultem Personal durchgeführt werden, um das Risiko von fehlerhaften Ergebnissen zu vermeiden. Dies gilt insbesondere angesichts des Abbaus von in den Proben enthaltenen Nukleinsäuren sowie der Kontamination der Proben durch Amplifikationsprodukte.

Bei manueller Einrichtung des Amplifikationslaufs ist eine räumliche Trennung von Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten zu beachten. Niemals ein Amplifikationsprodukt in den für die Extraktion/Vorbereitung von Amplifikationsreaktionen vorbehaltenen Bereich einführen.

Bei manueller Einrichtung des Amplifikationslaufs müssen Laborkittel, Schutzhandschuhe und Hilfsmittel vorhanden sein, die ausschließlich für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten verwendet werden. Niemals Laborkittel, Schutzhandschuhe oder Hilfsmittel aus dem für die Amplifikation / den Nachweis von Amplifikationsprodukten vorbehaltenen Bereich in den für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen vorbehaltenen Bereich bringen.

Die Proben müssen für diese Analyseart geeignet und, falls möglich, dafür vorgesehen sein. Die Proben müssen unter einer Sicherheitswerkbank verarbeitet werden. Die zur Verarbeitung der Proben verwendeten Pipetten dürfen ausschließlich für diesen Zweck verwendet werden. Die Pipetten müssen nach dem Verdrängungsprinzip arbeiten oder in Verbindung mit Aerosol-Filterspitzen verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril, frei von DNasen und RNasen sowie frei von DNA und RNA sein.

Die Pipetten, die für die Handhabung der Reagenzien verwendet werden, dürfen nur für diesen Zweck verwendet werden. Die Pipetten müssen nach dem Verdrängungsprinzip arbeiten oder in Verbindung mit Aerosol-Filterspitzen verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril, frei von DNasen und RNasen sowie frei von DNA und RNA sein.

Amplifikationsprodukte müssen so verwendet werden, dass eine Freisetzung in die Umgebung weitestgehend reduziert wird, um die Möglichkeit einer Kontamination zu vermeiden. Die Pipetten, die für die Handhabung von Amplifikationsprodukten verwendet werden, dürfen nur für diesen Zweck verwendet werden.

**MRSA / SA ELITe MGB® Kit**  
Reagenz für die DNA-Amplifikation in  
Echtzeit

REF M800351

**Komponentenspezifische Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen**

Der **MRSA/SA PCR Mix** muss bei -20 °C dunkel aufbewahrt werden.

Der **MRSA/SA PCR Mix** darf maximal **fünf Mal** eingefroren und wieder aufgetaut werden; weitere Gefrier- und Auftauzyklen können zu einem Verlust der Produktleistung führen.

**ELITe InGenius®**

**PROBEN UND KONTROLLEN**

**Proben**

Dieses Produkt darf ausschließlich mit aus folgenden klinischen Proben extrahierter DNA verwendet werden:

**Nasenabstrich**

Die für die DNA-Extraktion bestimmten Nasenabstrichproben sollten mit den folgenden Entnahme- und Transportsystemen entnommen werden:

„eNAT™ kit“ (COPAN Italia S.p.A., Art.-Nr. 608CS01R) für die DNA-Extraktion, identifiziert gemäß den Laborrichtlinien. Die Nasenabstriche dürfen bis zu vier Wochen bei +2 / +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; andernfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal sechs Monate aufbewahrt werden. Vor der Analyse mit diesem Produkt müssen 0,2 ml Probe in eNAT™ Medium in das in den „**ELITe InGenius Sonication tubes**“ enthaltene Ultraschallröhrchen überführt werden.

„eSwab Collection Kit“ (COPAN Italia S.p.A., Art.-Nr. 480CE) für die DNA-Extraktion, identifiziert gemäß den Laborrichtlinien und vorzugsweise innerhalb von 2 Stunden nach der Entnahme zu transportieren. Verzögert sich die sofortige Lieferung oder die Verarbeitung, dürfen die Proben bis zu 48 Stunden bei +2 / +8 °C transportiert und gelagert werden; andernfalls müssen sie eingefroren und bei -20 °C für maximal sechs Monate gelagert werden. Vor der Analyse mit diesem Produkt müssen 0,2 ml Probe in eSwab Medium in das in den „**ELITe InGenius Sonication tubes**“ enthaltene Ultraschallröhrchen überführt werden.

**Hinweis:** Wird die DNA-Extraktion aus Nasenabstrichen mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software®**, Version 1.2 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **MRSA-SA ELITe\_NS\_200\_50** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die **CPE** Internal Control bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 50 µl.

**Blutkultur**

Blutkulturproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien entnommen und identifiziert werden. Die Proben dürfen maximal 24 Stunden bei Raumtemperatur transportiert und aufbewahrt werden.

Vor der Analyse mit diesem Produkt die Probe im Verhältnis 1:1000 in hochreinem Wasser (mindestens 10 µl Probe in 10 µl hochreinem Wasser) auflösen, durch Vortexen mischen und 0,2 ml der verdünnten Probe in ein Ultraschallröhrchen (im Lieferumfang von „**ELITe InGenius Sonication tubes**“ enthalten) überführen.

Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen. Bei Verwendung von gefrorenen Proben müssen die Proben unmittelbar vor der Extraktion aufgetaut werden, um einen möglichen Nukleinsäureabbau zu vermeiden.

**Hinweis:** Wird die Nukleinsäureextraktion aus Blutkultur mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software**, Version 1.2 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **MRSA-SA ELITe\_BC\_200\_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt den **CPE** bei 10 µl / Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

**Störende Substanzen**

Es liegen keine Daten zu einer Inhibition durch antivirale, antibiotische und chemotherapeutische oder immunsupprimierende Medikamente vor.

Eine große Menge humaner genomischer DNA in der aus der Probe extrahierten DNA kann die Amplifikationsreaktion hemmen.

**MRSA / SA ELITe MGB® Kit**  
Reagenz für die DNA-Amplifikation in  
Echtzeit

REF M800351

**Amplifikationskontrollen**

Vor der Analyse von Proben ist es unbedingt erforderlich, die Amplifikationskontrollen für jede Amplifikationsreagenz-Charge zu generieren und zu genehmigen:

- als Amplifikations-Positive Control ist **MRSA/SA - ELITe Positive Control** zusammen mit dem Protokoll „**MRSA-SA ELITe\_PC**“ zu verwenden,
- als Amplifikations-Negative Control ist hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht in diesem Kit enthalten) zusammen mit dem Protokoll „**MRSA-SA ELITe\_NC**“ zu verwenden.

**Hinweis:** Das System **ELITe InGenius** benötigt für jede in seiner Datenbank gespeicherte Amplifikationsreagenzcharge genehmigte und gültige Ergebnisse aus Amplifikationskontrollen. Die genehmigten und in der Datenbank gespeicherten Ergebnisse der Amplifikationskontrolle laufen nach **15 Tagen** ab. Am Ablaufdatum müssen die Positiv- und die Negativkontrolle zusammen mit der Amplifikationsreagenzcharge erneut verarbeitet werden.

Darüber hinaus müssen die Amplifikationskontrollen erneut generiert werden, wenn:

- eine neue Charge von Amplifikationsreagenzien gestartet wird,
- die Ergebnisse der Qualitätskontrollanalyse (siehe nächster Abschnitt) außerhalb der Spezifikation liegen,
- eine größere Wartung am **ELITe InGenius**-Gerät durchgeführt wird.

**Qualitätskontrollen**

Es wird empfohlen, das gesamte Analyseverfahren, Extraktion und Amplifikation, durch Testen von Prozesskontrollen, d. h. einer negativ getesteten Probe und einer positiv getesteten Probe oder eines kalibrierten Referenzmaterials, zu validieren.

Externe Kontrollen sind gemäß den einschlägigen Anforderungen der lokalen, staatlichen und föderalen Akkreditierungsorganisationen zu verwenden.

**VERFAHREN**

Das beim Gebrauch des „**MRSA/SA - ELITe MGB® Kit**“ mit dem System **ELITe InGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

- Prüfung der Systembereitschaft
- Einrichtung des Laufs
- Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

**Prüfung der Systembereitschaft**

Vor Beginn des Laufs gemäß der Gerätedokumentation muss Folgendes durchgeführt werden:

- **ELITe InGenius** einschalten und den Modus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen.
- prüfen, ob die Amplifikationskontrollen (**MRSA/SA - Positive Control**, **MRSA/SA Negative Control**) zusammen mit der verwendeten Amplifikationsreagenzcharge ausgeführt werden und genehmigt und noch nicht abgelaufen sind (Status). Liegen keine genehmigten oder gültigen Amplifikationskontrollen vor, sind diese wie in den folgenden Abschnitten beschrieben auszuführen.
- den Typ des Laufs auswählen, dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche zur Einrichtung des Laufs befolgen und die von ELITechGroup S.p.A. bereitgestellten Assay-Protokolle verwenden. Diese IVD-Protokolle wurden speziell mit **ELITe MGB Kits**, Matrizes und dem Gerät **ELITe InGenius** sowie der genannten Matrix validiert. Die für das „**MRSA/SA ELITe MGB® Kit**“ verfügbaren Assay-Protokolle sind in der nachfolgenden Tabelle beschrieben.

Assay-Protokoll für MRSA/SA ELITe MGB Kit			
Name	Matrix	Maßeinheit	Eigenschaften
MRSA-SA ELITe_NS_200_50	Nasenabstrich	Positiv/negativ	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 50 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: 1 Zyklus, 5 s EIN Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 10 µl

Assay-Protokoll für MRSA/SA ELITe MGB Kit			
Name	Matrix	Maßeinheit	Eigenschaften
MRSA-SA ELITe_BC_200_100	Blutkultur	Positiv/negativ	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: NEIN Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 10 µl

Falls das betreffende Assay-Protokoll nicht im System geladen ist, wenden Sie sich an Ihren ELITechGroup Kundendienstvertreter vor Ort.

#### Einrichtung des Laufs

Das Produkt **MRSA/SA ELITe MGB® Kit** kann mit dem System **ELITe InGenius** für die Durchführung der folgenden Läufe verwendet werden:

- Integrierter Lauf (Extraktion + PCR),
- Amplifikationslauf (nur PCR),
- Lauf für Amplifikations-Positive und/oder Negative Control (nur PCR).

Alle für den Lauf benötigten Parameter sind in dem auf dem Gerät verfügbaren Assay-Protokoll enthalten und werden bei Auswahl des Assay-Protokolls automatisch abgerufen.

**Hinweis:** Das ELITe InGenius System kann mit dem Laborinformationssystem (LIS, Laboratory Information System) verbunden werden, über das die Arbeitslauf-Informationen gesendet werden können. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

Die wichtigsten Schritte für die Einrichtung der vier Durchlaufstypen sind nachfolgend beschrieben.

#### A. Integrierter Lauf

Gehen Sie zum Einrichten des integrierten Laufs wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche:

- Die MRSA/SA PCR Mix-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
- Die CPE-Röhrchen für den Lauf auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
- Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
- Wenn Nasenabstrichproben verarbeitet werden, sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen 200 µl und das extrahierte Eluatvolumen 50 µl beträgt.
- Wenn Blutkulturproben verarbeitet werden, sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen 200 µl und das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
- Für jede relevante Spur unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
- Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. MRSA-SA ELITe\_NS\_200\_50).
- Sicherstellen, dass unter „Protocol“ (Protokoll) Folgendes angezeigt wird: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).
- Die Proben-Ladepositionen in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) auswählen und „Sonication Tube“ (Ultraschallröhrchen) auswählen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- CPE und MRSA/SA PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.

- Die „PCR Cassettes“ (PCR-Kassetten), die Extraktionskartuschen „ELITe InGenius SP 200“, alle benötigten Verbrauchsmaterialien und die zu extrahierenden Proben in die unter Schritt 8 angegebenen Positionen laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Gerätetür schließen.
- Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

Nach Beendigung des Vorgangs ermöglicht das System **ELITe InGenius** es dem Benutzer, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

**Hinweis:** Am Ende des Laufs kann die übrige extrahierte Probe aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen, gekennzeichnet und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

**Hinweis:** Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassetten mit den Reaktionsprodukten und anderen Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt beseitigt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

**Hinweis:** Der PCR Mix kann für bis zu **15 Stunden** (5 Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden) im gekühlten Block des Geräts verbleiben.

#### B. Amplifikationslauf

Zum Einrichten des Amplifikationslaufs die folgenden Schritte ausführen, wie auf der grafischen Benutzeroberfläche angegeben:

- Für den Lauf eine ausreichende Anzahl MRSA/SA PCR Mix-Röhrchen auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
- Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
- Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird und wenn Nasenabstrichproben verarbeitet werden, sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl und das extrahierte Elutionsvolumen („Extracted Elute Volume“) 50 µl beträgt.
- Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird und wenn Blutkulturproben verarbeitet werden, sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl und das extrahierte Elutionsvolumen („Extracted Elute Volume“) 100 µl beträgt.
- Für jede relevante Spur die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
- Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. MRSA-SA ELITe\_NS\_200\_50).
- In der Spalte „Protocol“ (Protokoll) „PCR Only“ (nur PCR) auswählen.
- Sicherstellen, dass die Ladeposition der eluierten Probe in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) „ExtraTube (bottom row)“ (Zusatzröhrchen (untere Reihe)) lautet. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Den MRSA/SA PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die PCR-Kassetten („PCR Cassettes“) und die extrahierte Nukleinsäure-Proben gemäß den Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche laden. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Gerätetür schließen.
- Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

Nach Beendigung des Vorgangs ermöglicht **ELITe InGenius** es, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

**Hinweis:** Am Ende des Laufs kann die übrige extrahierte Probe aus dem Gerät herausgenommen,

verschlossen und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

**Hinweis:** Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassetten mit den Reaktionsprodukten und anderen Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

**Hinweis:** Der PCR Mix kann für bis zu **15 Stunden** (5 Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden) im gekühlten Block des Geräts verbleiben.

### C. Amplifikationslauf für Positive Control und Negative Control

Gehen Sie zum Einrichten des Amplifikationslaufs für die Positive Control und Negative Control wie folgt vor und führen Sie die folgenden Schritte gemäß der grafischen Benutzeroberfläche durch:

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl MRSA/SA PCR Mix-Röhrchen auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. Das MRSA SA Positive Control- und das LGA251/SA Positive Control-Röhrchen für den Lauf auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Mindestens 30 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie in ein Elutionsröhrchen (im Lieferumfang des ELITe InGenius SP Consumable Set enthalten) überführen.
4. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
5. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl und das extrahierte Elutionsvolumen 100 µl beträgt.
6. In der relevanten Spur das zu verwendende Assay Protocol in der Spalte „Assay“ auswählen.
7. Für die Positivkontrolle „MRSA-SA ELITe\_PC“ in der Spalte „Assay“ auswählen und die Chargennummer und das Ablaufdatum für die MRSA/SA Positive Control eintragen.
8. Für die Negativkontrolle „MRSA-SA ELITe\_NC“ auswählen und die Chargennummer und das Ablaufdatum für das hochreine Wasser für die Molekularbiologie eingeben.
9. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. Den MRSA/SA Q-PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. Die Spitzenänder in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
12. „PCR Reaction Cassettes“ (PCR-Reaktionskassetten), die 2 Positive Control-Röhrchen (MRSA/SA und LGA251/SA) oder das Negative Control-Röhrchen gemäß den Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche laden. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
13. Die Gerätetür schließen.
14. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

Nach Beendigung des Vorgangs ermöglicht das System **ELITe InGenius** es dem Benutzer, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

**Hinweis:** Die Ergebnisse der Amplifikationsläufe für die Positiv- und Negativkontrolle werden von der Gerätesoftware verwendet, um die Regelkarten („Control Charts“) einzurichten. Zum Einrichten der Regelkarte sind vier Ergebnisse der Positiv- und der Negativkontrolle aus vier verschiedenen Läufen erforderlich. Anschließend werden die Ergebnisse der Positivkontrolle und der Negativkontrollen zur Überwachung der Leistung der Amplifikationsstufen herangezogen. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

**Hinweis:** Am Ende des Laufs können die übrigen Positive Controls aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C gelagert werden. Die übrige Negative Control muss entsorgt werden.

**Hinweis:** Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassetten mit den Reaktionsprodukten und die übrigen Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

**Hinweis:** Der PCR Mix kann für bis zu **15 Stunden** (5 Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden) im gekühlten Block des Geräts verbleiben.

### Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

Am Ende des Laufs wird der Bildschirm „Results Display“ (Ergebnisanzeige) automatisch angezeigt. Auf diesem Bildschirm werden die Proben-/Kontrollergebnisse sowie die Informationen zum Lauf angezeigt. Über diesen Bildschirm kann das Ergebnis genehmigt und können die Berichte („Sample Report“ (Probenbericht) oder „Track Report“ (Spurbericht)) ausgedruckt oder gespeichert werden. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

**Hinweis:** Das ELITe InGenius System kann mit dem LIS (Location Information Server) verbunden werden, über den die Arbeitslauf-Ergebnisse an das Rechenzentrum des Labors gesendet werden können. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

Das **ELITe InGenius** System generiert die Ergebnisse mithilfe des Produkts „**MRSA/SA ELITe MGB® Kit**“ und geht dabei folgendermaßen vor:

- A. Validierung der Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und Negative Control,
- B. Validierung der Probenergebnisse,
- C. Ausgabe des Probenergebnisberichts.

#### A. Validierung der Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und Negative Control

Die von der für das mecA- und das mecC-Gen spezifische Sonde (mecA) und der für das SA-Gen (SA) spezifischen Sonde in der Amplifikationsreaktion der Positive Controls und der Negative Control ausgesendeten Fluoreszenzsignale werden automatisch analysiert und von der Gerätesoftware mit den in den Assay-Protokollen „MRSA-SA ELITe\_PC“ und „MRSA-SA ELITe\_NC“ enthaltenen Parametern interpretiert.

Die für die Amplifikationsreagenzcharge spezifischen Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und die Negative Control werden in der Datenbank („Controls“) gespeichert, nachdem der „Administrator“ oder „Analyst“ unter Befolgung der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche die Genehmigung dazu erteilt hat.

Die für die Amplifikationsreagenzcharge spezifischen Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und Negative Control laufen **nach 15 Tagen** ab.

Vor der Analyse von Proben ist es unbedingt erforderlich zu prüfen, ob die Amplifikation der Positiv- und der Negativkontrolle mit der zu verwendenden Amplifikationsreagenzcharge durchgeführt wurde und genehmigte und gültige Ergebnisse vorliegen. Die Verfügbarkeit der Ergebnisse der Amplifikation der Positiv- und der Negativkontrolle mit dem Status „Approved“ (Genehmigt) wird im Fenster „Controls“ (Kontrollen) auf der grafischen Benutzeroberfläche angezeigt. Fehlen die Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und Negative Control, so sind sie wie oben beschrieben zu generieren.

**Hinweis:** Erfüllt das Ergebnis der Positive Control bzw. Negative Control nicht die Annahmekriterien, wird die Meldung „not passed“ (nicht bestanden) im Bildschirm „Controls“ angezeigt und das Ergebnis kann nicht genehmigt werden. In diesem Fall muss die Amplifikationsreaktion der Positive Control bzw. Negative Control wiederholt werden.

**Hinweis:** Wird die Positive Control bzw. Negative Control zusammen mit zu testenden Proben ausgeführt und ist ihr Ergebnis ungültig, so ist der gesamte Lauf ungültig. In diesem Fall muss die Amplifikation aller Proben ebenfalls wiederholt werden.

#### B. Validierung der Probenergebnisse

Die von der für das mecA- und das mecC-Gen spezifische Sonde (mecA), der für das SA-Gen (SA) spezifischen Sonde und der für die Internal Control spezifischen Sonde in den jeweiligen Amplifikationsreaktionen ausgesendeten Fluoreszenzsignale werden automatisch analysiert und von der Gerätesoftware mit den im Assay-Protokollen enthaltenen Parametern interpretiert.

**Hinweis:** Vor der Analyse von Proben ist zu prüfen, ob die Amplifikation der Kontrollen mit der zu verwendenden Amplifikationsreagenzcharge durchgeführt wurde und genehmigte und gültige Ergebnisse

**MRSA / SA ELITe MGB® Kit**  
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF M800351

vorliegen. Die Verfügbarkeit der Ergebnisse der Amplifikation der Kontrollen mit dem Status „Approved“ (Genehmigt) wird im Fenster „Controls“ (Kontrollen) auf der grafischen Benutzeroberfläche angezeigt. Fehlen die Ergebnisse des Amplifikationslaufs für Kontrollen, so sind sie wie oben beschrieben zu generieren.

Die Ergebnisse werden in den vom Gerät generierten Berichten („Result Display“ (Ergebnisanzeige)) angezeigt.

Der Probenlauf kann genehmigt werden, wenn die zwei in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Bedingungen erfüllt sind.

1) Positive Control	Status
MRSA/SA Positive Control	APPROVED (Genehmigt)
LGA251/SA Positive Control	APPROVED (Genehmigt)
2) Negative Control	Status
MRSA/SA - Negative Control	APPROVED (Genehmigt)

Das System interpretiert das Assay-Ergebnis für jede Probe automatisch gemäß dem Algorithmus der **ELITe InGenius Software** und den Parametern des Assay-Protokolls.

Die möglichen Ergebnismeldungen einer Probe sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Ergebnis des Probenlaufs	Interpretation
MRSA Detected (MRSA nachgewiesen)	In der Probe wurde <b>MRSA-DNA nachgewiesen</b> .
MRSA/SA Not Detected or below LoD (MRSA/SA nicht nachgewiesen oder unter Nachweisgrenze)	In der Probe wurde <b>keine MRSA/SA-DNA nachgewiesen</b> . Die Probe wurde negativ auf diese Zielsequenzen getestet oder ihre Konzentration liegt unter der Nachweisgrenze des Assays.
MRSA Not Detected or below LoD, SA Detected (MRSA nicht nachgewiesen oder unter Nachweisgrenze, SA nachgewiesen)	In der Probe wurde <b>keine MRSA-DNA nachgewiesen</b> . Die Probe wurde negativ auf diese Zielsequenz getestet oder ihre Konzentration liegt unter der Nachweisgrenze des Assays. <b>SA wurde nachgewiesen</b>
Invalid - Retest Sample (Ungültig - Probe erneut testen)	<b>Ungültiges Testergebnis</b> aufgrund von fehlerhafter Internal Control (falsche Extraktion oder Verschleppung des Inhibitors).

Nicht für die Ergebnisinterpretation geeignete Proben werden von der **ELITe InGenius Software** als „Invalid - Retest Sample“ (Ungültig - Probe erneut testen) ausgegeben. In diesem Fall wurde die Internal Control-DNA aufgrund von Problemen beim Amplifikations- oder Extraktionsschritt nicht effizient erkannt (Abbau von DNA, Verlust von DNA während der Extraktion oder Verschleppung des Inhibitors im extrahierten Eluat), was zu falschen und falsch-negativen Ergebnissen führen kann.

Wenn das Eluatvolumen ausreicht, kann die extrahierte Probe mithilfe eines Amplifikationslaufs im Modus „PCR Only“ (nur PCR) erneut getestet werden. Ist auch das zweite Ergebnis ungültig, muss die Probe beginnend mit der Extraktion eines neuen Aliquots im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) erneut getestet werden.

Proben, die sich für die Analyse eignen, in denen jedoch keine MRSA/SA-DNA nachgewiesen werden konnte, werden ausgegeben mit: „MRSA/SA: DNA Not Detected or below LoD“ (MRSA/SA-DNA nicht nachgewiesen oder unter Nachweisgrenze). In diesem Fall kann nicht ausgeschlossen werden, dass die MRSA/SA-DNA bei einer Konzentration unter der Nachweisgrenze des Tests vorhanden ist (siehe „Leistungsmerkmale“).

**Hinweis:** Bei der Interpretation der mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse müssen alle klinischen Daten und sonstigen Laborbefunde des Patienten berücksichtigt werden.

Die Ergebnisse des Probenlaufs werden in der Datenbank gespeichert und können, falls gültig, von Mitarbeitern, die als „Administrator“ oder „Analyst“ qualifiziert sind, unter Befolgung der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche unter „Result Display“ (Ergebnisanzeige) genehmigt werden. Über das Fenster

**MRSA / SA ELITe MGB® Kit**  
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF M800351

„Result Display“ können die Ergebnisse des Probenlaufs als „Sample Report“ (Probenbericht) und „Track Report“ (Spurbericht) ausgedruckt und gespeichert werden.

**C. Ausgabe des Probenergebnisberichts**

Die Probenergebnisse werden in der Datenbank gespeichert und können als „Sample Report“ (Probenbericht) und „Track Report“ (Spurbericht) exportiert werden.

Der „Sample Report“ zeigt die Details eines Arbeitslaufs sortiert nach ausgewählter Probe (SID, „Sample ID“) an.

Der „Track Report“ zeigt die Details eines Arbeitslaufs nach ausgewählter Spur an.

Der „Sample Report“ und der „Track Report“ können ausgedruckt und von autorisiertem Personal unterschrieben werden.

**LEISTUNGSMERKMALE**

**Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze**

Die analytische Sensitivität dieses Assays, ausgedrückt als Nachweisgrenze (LoD, Limit of Detection) der DNA-Amplifikation, ermöglicht den Nachweis von zirka 20 Kopien in 10 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde mithilfe von Plasmid-DNA getestet. Diese enthielt die Amplifikationsprodukte, deren Ausgangskonzentrationen mit einem Spektrophotometer gemessen wurden. Die Plasmid-DNA wurde auf einen Titer von zirka 20 Kopien / 10 µl bei Vorhandensein von 40.000 Kopien von Internal Control (IC) / 10 µl verdünnt. Diese Proben wurden in 18 Wiederholungen getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. auf zwei verschiedenen Geräten durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Proben	Anzahl	positiv	negativ	Mec A Mittlerer Ct-Wert	SA Mittlerer Ct-Wert
20 Kopien Plasmid-MRSA/SA-DNA + 40.000 Kopien IC	18	17	1	35,04	34,43
20 Kopien Plasmid-LGA251/SA-DNA + 40.000 Kopien IC	18	18	0	34,75	34,12

**Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial**

Für die Bewertung der analytischen Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit des Werts eines kalibrierten Referenzmaterials wurde das „QCMD 2014 Methicillin Resistant S. aureus EQA Panel“ (Qnostics, Ltd, Vereinigtes Königreich), eine Reihe von MRSA/SA-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration, als Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit «**ELITe InGenius**» und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und „ELITe InGenius“			
Probe	Probeninhalt	Erwartetes Ergebnis	Tatsächliches Ergebnis
MRSADNA14-01	MRSA N315	MRSA Detected (MRSA nachgewiesen)	MRSA Detected (MRSA nachgewiesen)
MRSADNA14-02	MSSA ATCC 29213	MRSA negativ	MRSA negativ
MRSADNA14-03	MSSA 29213 + MRCoNS 634	MRSA negativ	MRSA negativ
MRSADNA14-04	E. coli ATCC 35218	MRSA negativ	MRSA negativ
MRSADNA14-05	MRSA N315	MRSA Frequently Detected (MRSA häufig nachgewiesen)	MRSA Detected (MRSA nachgewiesen)

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und „ELITe InGenius“			
Probe	Probeninhalt	Erwartetes Ergebnis	Tatsächliches Ergebnis
MRSADNA14-06	Nur MHB	MRSA negativ	MRSA negativ
MRSADNA14-07	MRSA N315	MRSA Infrequently Detected (MRSA selten nachgewiesen)	MRSA Detected (MRSA nachgewiesen)
MRSADNA14-08	MRSA mecC	MRSA Infrequently Detected (MRSA selten nachgewiesen)	MRSA Detected (MRSA nachgewiesen)
MRSADNA14-09	MRCoNS 634	MRSA negativ	MRSA negativ
MRSADNA14-10	MRSA ST398	MRSA Detected (MRSA nachgewiesen)	MRSA Detected (MRSA nachgewiesen)
MRSADNA14-11	MRSA N315	MRSA Frequently Detected (MRSA häufig nachgewiesen)	MRSA Detected (MRSA nachgewiesen)
MRSADNA14-12	MRSA N315	MRSA Detected (MRSA nachgewiesen)	MRSA Detected (MRSA nachgewiesen)

Alle Proben wurden richtig erkannt.

Für die Bewertung der analytischen Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit des Werts eines kalibrierten Referenzmaterials wurde außerdem das „NATrol™ MRSA/SA Panel“ (Zeptomatrix, USA), eine Reihe von *S. aureus* oder *S. epidermidis*, als Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit «**ELITe InGenius**» und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und „ELITe InGenius“		
Probe	Erwartetes Ergebnis	Tatsächliches Ergebnis
<i>S. aureus</i> _MRSA Community Strain	MRSA-positiv	MRSA Detected (MRSA nachgewiesen)
<i>S. aureus</i> _MRSA Hospital Strain	MRSA-positiv	MRSA Detected (MRSA nachgewiesen)
<i>S. aureus</i> _MSSA	MSSA-positiv	MSSA Detected (MRSA nachgewiesen)
<i>S. aureus</i> _MSSA – leere Kassette	MSSA-positiv	MSSA Detected (MRSA nachgewiesen)
<i>S. epidermidis</i> _MSSE HER 1292	Negativ	Negativ

Alle Proben wurden richtig erkannt.

**Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben**

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Bestätigung positiver klinischer Proben wurde durch Analyse von MRSA- und MSSA-positiven klinischen Nasenabstrich- und Blutkulturproben bewertet.

Die diagnostische Sensitivität wurde anhand von 60 MSSA-positiven Nasenabstrichproben, 21 MRSA-positiven Nasenabstrichproben und 20 Nasenabstrichproben, die durch Hinzufügen von „MRSA BAA-1556“ (ATCC) bei einem Titer von 100.000 KbE/ml dotiert waren, bewertet.

Die diagnostische Sensitivität wurde bewertet anhand von 39 MSSA-positiven Blutkulturproben, 21 MRSA-positiven Blutkulturproben und 10 mit MRSA-Isolaten dotierten Blutkulturproben, da es bei einigen MRSA-Zielgenen schwierig ist, eine signifikante Anzahl positiver klinischer Proben zu finden.

Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit „**ELITe InGenius**“ und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
MSSA-DNA-positive Nasenabstrichproben	60	56	4
MRSA-DNA-positive Nasenabstrichproben	41	40	1
MSSA-DNA-positive Blutkulturproben	39	39	0
MRSA-DNA-positive Blutkulturproben	31	31	0

Bei den Nasenabstrichproben wurden 56 von 60 MSSA-Proben korrekt nachgewiesen. Vier (4) Proben waren negativ. 40 von 41 MRSA-Proben wurden korrekt nachgewiesen. Eine Probe war MSSA-positiv.

Die diagnostische Sensitivität des Assays in Verbindung mit Nasenabstrichen betrug 93 % bei MSSA und 98 % bei MRSA.

Bei den Blutkulturproben wurden alle Proben korrekt nachgewiesen.

Die diagnostische Sensitivität des Assays in Verbindung mit Blutkultur betrug 100 % bei MSSA und 100 % bei MRSA.

Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug bei diesem Test 96 % bei MSSA und 99 % bei MRSA.

**Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben**

Die diagnostische Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer Proben wurde durch Analyse von 48 MRSA/SA-negativen klinischen Nasenabstrichproben und 34 klinischen Blutkulturproben bewertet.

Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit „**ELITe InGenius**“ und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
MRSA/SA-DNA-negative Nasenabstrichproben	48	0	48
MRSA/SA-DNA-negative Blutkulturproben	34	0	34

Alle Proben wurden richtig erkannt.

Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 100 %.

**ANDERE SYSTEME**

**PROBEN UND KONTROLLEN**

**Proben**

Dieses Produkt darf ausschließlich mit aus klinischen Nasenabstrichproben extrahierter DNA verwendet werden.

Die für die DNA-Extraktion bestimmten Nasenabstrichproben sollten mit „BBL Culture Swab Plus Amies Gel without Charcoal swabs“ (Becton-Dickinson) entnommen und gemäß den Laborrichtlinien identifiziert werden. Die Nasenabstrichproben dürfen maximal einen Tag bei +18 bis +25 °C transportiert und aufbewahrt werden; andernfalls müssen sie bei +2 bis +8 °C für maximal sieben Tage aufbewahrt werden. Die Nasenabstrichproben müssen in 1 ml Trypticase-Soja-Bouillon (TSB) getaucht und vor Beginn des Extraktionsverfahrens 10 Sekunden lang gevortext werden.

**Hinweis:** Beim Extrahieren von DNA mit dem System „NucliSENS® easyMAG®“ sind die folgenden Einstellungen zu verwenden.

- Die Extraktionsparameter wie folgt definieren:
- Matrix = Sonstige;
  - Protokoll = Generic 2.0.1;
  - Volumen (ml) = 1,0 ml;
  - Eluat (µl) = 50 µl;
  - Typ = Primär.

1 ml jeder TSB-Probe in das 8-Well-Einweg-Probengefäß überführen, wie in der Arbeitsliste des Geräts angegeben, und den Lysispuffer dispensieren. Während der 10-minütigen Inkubation die Magnetic Silica-Suspension für 8 Proben vorbereiten; hierzu **550 µl NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica, 545 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie** und **5 µl CPE** mischen. Für jede Probe den BioHit-Pipettierer verwenden, um 125 µl der Magnetic Silica-Suspension in den NucliSENS easyMAG Strip for Premix zu geben. Den BioHit-Pipettierer verwenden, um 100 µl der Magnetic Silica-Suspension in jede Probe im 8-Well-Einweg-Probengefäß zu geben, durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren gut mischen und anschließend das Extraktionsverfahren starten.

**Störende Substanzen**

Zu den Substanzen, die den Nachweis von SA und MRSA mit dem „MRSA/SA ELITE MGB® Kit“ beeinträchtigen und möglicherweise zu ungültigen Ergebnissen führen können, gehören Propylenglykol und übermäßige Mengen von Nasensekret/Schleim.

Die unten aufgeführten exogenen Substanzen, die Bestandteile von Dekongestiva und Substanzen zur Linderung von Nasentrockenheit und/oder -reizung sind, beeinträchtigen mit Ausnahme von Propylenglykol den Nachweis von MRSA/SA mit dem „MRSA/SA ELITE MGB® Kit“ nachweislich nicht. Das Vorhandensein von menschlichem Blut in der Probe hat nachweislich keine Auswirkungen auf den Nachweis von MRSA/SA mit dem „MRSA/SA ELITE MGB® Kit“, das in Verbindung mit NucliSENS® easyMAG® verwendet wird.

Potenziell interferierende Substanz (Art)	Wirkstoff	Interferenzen?
Mucin, Submaxillardrüse vom Rind, Typ I-S	Gereinigtes Mucin-Protein	Nein
Blut (human)	Hämoglobin	Nein
	Phenylephrin	Nein
Nasensprays oder -tropfen	Oxymetazolin	Nein
	Natriumchlorid mit Konservierungsmitteln	Nein
	Benzalkoniumchlorid	Nein
	Natriumphosphat	Nein
	Phenylmethanol	Nein
	Propylenglykol	<b>Ja</b>
	Sorbitol, Benzylalkohol	Nein
	Dinatriumedetat, Hypromellose	Nein
	Phosphorsäure	Nein
	Nasale Kortikosteroide	Dexamethason
Triamcinolon		Nein
Beclometason		Nein
Flunisolid		Nein
Budesonid		Nein
Mometason		Nein
Nasengel	Fluticason	Nein
	Luffa operculata, Schwefel	Nein
Homöopathisches Allergiemittel	Galphimia glauca	Nein
	Histaminum hydrochloricum	Nein
Impfstoff	Intranasaler Lebendimpfstoff gegen das Influenzavirus	Nein
Halstabletten, orales Anästhetikum und Analgetikum	Benzocain, Menthol	Nein
Antivirale Medikamente	Zanamivir, Oseltamivirphosphat	Nein
Antibiotikum, Nasensalbe	Mupirocin	Nein
Antibakterium, systemisch	Tobramycin	Nein

Zur Gewinnung der experimentellen Interferenzdaten wurden das Extraktionssystem NucliSENS® easyMAG® und die Detektionsplattform 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument mit einer früheren Version des Assays „MRSA/SA ELITE MGB® Kit“ verwendet, die mit dem aktuellen Assay identisch ist, mit der Ausnahme, dass sie keine mecC-spezifischen Oligonukleotide enthält.

Es liegen keine Daten zu einer Inhibition durch andere antivirale, antibiotische, chemotherapeutische oder immunsupprimierende Medikamente vor.

Eine große Menge humaner genomischer DNA in der aus der Probe extrahierten DNA kann die Amplifikationsreaktion hemmen.

**Amplifikationskontrollen**

Es ist erforderlich, jeden Amplifikationslauf mit einer Negativkontrolle und einer Positivkontrolle zu validieren.

Für die Negativkontrolle hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht enthalten) verwenden.

Für die Positivkontrolle die zwei Lösungen des Produkts „MRSA/SA - ELITE Positive Control“ (nicht im Lieferumfang enthalten) verwenden.

**Qualitätskontrollen**

Es wird empfohlen, das gesamte Analyseverfahren für jeden Extraktions- und Amplifikationslauf durch Verarbeiten einer negativ getesteten Probe und einer positiv getesteten Probe oder eines kalibrierten Referenzmaterials, zu validieren.

**VERFAHREN**

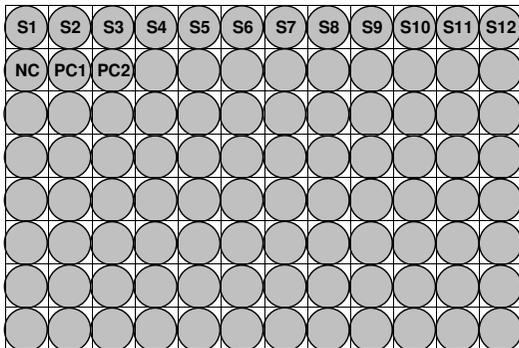
**Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs**

(Im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten durchzuführen)

Vor Beginn des Laufs die in der Dokumentation des Geräts enthaltenen Herstellerempfehlungen befolgen und:

- Computer einschalten, Echtzeit-Thermocycler einschalten, dedizierte Software ausführen, einen Lauf für die „absolute Quantifizierung“ öffnen;
- bei Verwendung des **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** „Run mode: Fast 7500“ (Laufmodus: Fast 7500) einstellen;
- ein neues Detektor-Set („detector“) erstellen oder durch Auswahl des Detector Manager den entsprechenden Detektor im Menü „Tool“ (Werkzeug) einstellen:
  - den Detektor („detector“) für die SA-spezifische Gensonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „TAMRA“ (AP554 ähnelt TAMRA) und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „SA“ nennen;
  - den Detektor („detector“) für die *mecA*- und die *mecC*-Gensonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „mecA“ nennen;
  - den Detektor („detector“) für die Internal-Control-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „Cy5“ (AP642 ähnelt Cy5) und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „IC“ nennen;
- in das Menü „View“ (Ansicht) gehen, den Well Inspector auswählen und für jede in der Mikrotiterplatte verwendete Vertiefung den Detektor („detector“) (zu messender Fluoreszenztyp), die „passive reference“ (passive Referenz) = „ROX“ (AP593 ist analog zu ROX, Normalisierung der gemessenen Fluoreszenz) und den Reaktionstyp (Probe, Amplifikations-Negativkontrolle, Amplifikations-Positivkontrolle) einrichten. Diese Informationen zum **Arbeitsblatt** am Ende dieser Gebrauchsanweisung hinzufügen oder die Mikrotiterplatten-Einrichtung ausdrucken. Das **Arbeitsblatt** muss bei der Überführung des Reaktionsgemischs und der Proben in die Vertiefungen sorgfältig befolgt werden.

Nachstehend ist ein Beispiel aufgeführt, wie eine qualitative Analyse von 12 Proben organisiert werden kann.



**Legende:** S1 - S12: Zu analysierende Proben; NC: Amplifikations-Negative Control; PC1: MRSA/SA-Amplifikations-Positive Control; PC2: LGA251/SA Amplifikations-Positive Control

Gemäß der Gerätedokumentation in der dedizierten Software („Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile“ (Gerät > Thermocycler-Protokoll > Temperaturprofil)) die Parameter des **Temperaturzyklus**

festlegen:

- zur Amplifikationsphase den **Schritt zur Verlängerung bei 72 °C** hinzufügen („Add Step“ (Schritt hinzufügen));

**Hinweis:** Die Fluoreszenzerfassung („Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection“ (Gerät > Thermocycler-Protokoll > Einstellungen > Datenerfassung)) muss während des Hybridisierungsschritts auf 56 °C eingestellt sein.

- die Zeitsteuerung wie in der nachstehenden Tabelle „**Temperaturzyklus**“ angegeben ändern;
- die Anzahl Zyklen auf **45** einstellen;
- das Reaktionsvolumen auf **30 µl** einstellen.

Temperaturzyklus		
Phase	Temperaturen	Zeitsteuerung
Dekontamination	50 °C	2 min
Erste Denaturierung	93 °C	2 min
Amplifikation und Detektion (45 Zyklen)	93 °C	10 s
	56 °C (Datenerfassung)	30 s
	72 °C	15 s

**Einrichten der Amplifikation**

(Im Bereich für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen durchzuführen)

Vor Beginn des Laufs muss Folgendes durchgeführt werden:

- die Röhrcchen mit den zu analysierenden Proben auftauen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrcchen auf Eis lagern;
- die für den Lauf benötigten **MRSA/SA PCR Mix** Röhrcchen auftauen und beachten, dass jedes Röhrcchen für die Vorbereitung von **25 Reaktionen** ausreicht. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrcchen maximal vier Stunden auf Eis lagern;
- ein **MRSA/SA Positive Control** Röhrcchen (Positivkontrolle der Echtzeit-Amplifikationsreaktionen für das SA-spezifische Gen und für das *mecA*-Gen) auftauen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und maximal vier Stunden auf Eis lagern;
- ein **LGA251/SA Positive Control**-Röhrcchen (Positivkontrolle der Echtzeit-Amplifikationsreaktionen für das *mecC*-Gen) auftauen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und maximal vier Stunden auf Eis lagern;
- die während des Laufs verwendete **Amplifikations-Mikrotiterplatte** zur Hand nehmen; dabei puderfreie Handschuhe tragen und darauf achten, dass die Vertiefungen nicht beschädigt werden.

1. **20 µl MRSA/SA PCR Mix** präzise auf den Boden der Vertiefungen der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** geben, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Bläschenbildung vermeiden.

**Hinweis:** Wenn das Reaktionsgemisch nicht vollständig aufgebraucht wird, das Restvolumen maximal einen Monat bei -20 °C dunkel aufbewahren. Das Reaktionsgemisch maximal **fünf** Gefrier- und Auftauzyklen unterziehen.

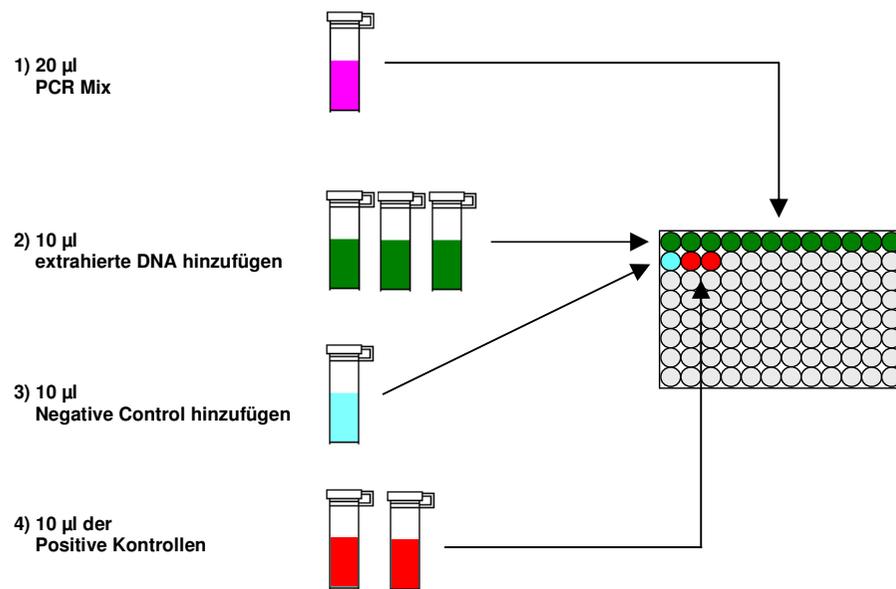
2. Zum Reaktionsgemisch **10 µl** der ersten verarbeiteten Probe in die dafür vorgesehene Vertiefung hinzufügen, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Probe gut mischen, dazu die **extrahierte DNA** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den übrigen extrahierten Proben auf die gleiche Weise verfahren.
3. Zum Reaktionsgemisch **10 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie** (nicht mitgeliefert) in der Vertiefung für die Negativkontrolle hinzufügen, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Negativkontrolle gut mischen, dazu das **hochreine Wasser für die Molekularbiologie** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.
4. Zum Reaktionsgemisch **10 µl MRSA/SA Positive Control** in die entsprechende Vertiefung hinzufügen, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Den Standard gut mischen, dazu die **MRSA/SA Positive Control** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.
5. Zum Reaktionsgemisch **10 µl LGA251/SA Positive Control** in die entsprechende Vertiefung hinzufügen,

wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Den Standard gut mischen, dazu die **LGA251/SA Positive Control** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.

- Die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit der **Amplifikations-Klebefolie** dicht verschließen.
- Die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** in den Echtzeit-Thermocycler im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten transferieren und den Temperaturzyklus für die Amplifikation starten. Die Laufeinstellung mit einem eindeutigen und wiedererkennbaren Dateinamen (z. B. „Jahr-Monat-Tag-MRSA/SA-EGSpA“) speichern.

**Hinweis:** Am Ende des Temperaturzyklus muss die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit den Reaktionsprodukten aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Um ein Verschütten der Reaktionsprodukte zu vermeiden **darf die Amplifikations-Klebefolie nicht von der Amplifikations-Mikrotiterplatte entfernt werden.**

Die folgende Abbildung zeigt den Ablauf der Amplifikationsreaktion.



#### Qualitative Analyse der Ergebnisse

Die aufgezeichneten Werte der von der SA-spezifischen Gensonde (TAMRA-Detektor „SA“), der *mecA*- und der *mecC*-Gensonde (FAM-Detektor „*mecA*“) und der Internal Control-Sonde (CY5-Detektor „IC“) während der Amplifikationsreaktionen ausgesendeten Fluoreszenz müssen von der Gerätesoftware analysiert werden.

Vor Beginn der Analyse die in der Dokumentation des Geräts enthaltenen Herstellerempfehlungen befolgen und:

- unter „Results > Amplification plot > delta Rn vs. Cycle“ (Ergebnisse > Amplifikationsdarstellung > Delta Rn vs. Zyklus) die **Analyseeinstellungen** („**Analysis Settings**“) für alle Detektoren auf „**Auto Baseline**“ (**Auto-Baseline**) und „**Manual Ct**“ (**manueller Ct-Wert**) sowie den **Schwellenwert** („**Threshold**“) auf 0,1 einstellen. Die Schaltfläche **Analyze** drücken und die Ergebnisse **speichern**.

Die Werte der von den spezifischen Sonden während der Amplifikationsreaktion ausgesendeten Fluoreszenz und der **Schwellenwert** („**Threshold**“) der Fluoreszenz ermöglichen die Bestimmung des **Schwellenwertzyklus** („**Threshold cycle (Ct)**“). Der Ct ist der Zyklus, in dem die Fluoreszenz den

**Schwellenwert** erreicht und ist proportional zur anfänglichen Zielmenge.

In den Amplifikationsreaktionen der **MRSA/SA Positive Control** und der **LGA251/SA Positive Control** dienen die **Ct**-Werte des SA- und des *mecA*-Detektors („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Reaktion der Positive Control TAMRA-Detektor „SA“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct ≤ 35	POSITIV	KORREKT

Reaktion der Positive Control FAM-Detektor „ <i>mecA</i> “	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct ≤ 35	POSITIV	KORREKT

Wenn das Ergebnis der Amplifikation der **Positive Controls** beim SA- und beim *mecA*-Detektor **Ct > 35** oder **Ct Undetermined (Ct unbestimmt)** ist, wurde die Ziel-DNA nicht korrekt nachgewiesen. Das heißt, dass während des Amplifikations- oder des Detektionsschritts Probleme aufgetreten sind (falsches Dispensieren des Reaktionsgemischs oder der Positivkontrollen, Abbau des Reaktionsgemischs oder der Positivkontrollen, falsche Einstellung der Position der Positivkontrollen, falsche Einstellung des Temperaturzyklus), die zu falschen Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab dem Amplifikationsschritt wiederholt werden.

In der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** dienen die **Ct**-Werte des SA-, des *mecA*- und des IC-Detektors („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Reaktion der Negative Control TAMRA-Detektor „SA“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct unbestimmt oder Ct > 35	NEGATIV	KORREKT

Reaktion der Negative Control FAM-Detektor „ <i>mecA</i> “	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct unbestimmt oder Ct > 35	NEGATIV	KORREKT

Reaktion der Negative Control Cy5-Detektor „IC“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct unbestimmt oder Ct ≥ 34	NEGATIV	KORREKT

Wenn das Ergebnis der Amplifikation der **Negative Control** **Ct ≤ 35** beim SA- oder beim *mecA*-Detektor bzw. **Ct < 34** beim IC-Detektor ist, wurde die Ziel-DNA nicht korrekt nachgewiesen. Das heißt, dass während des Amplifikationsschritts Probleme aufgetreten sind (Kontamination), die zu falschen und falsch-positiven Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab dem Amplifikationsschritt wiederholt werden.

Bei jeder **Proben**-Amplifikationsreaktion werden die **Ct**-Werte des *mecA*- und des SA-Detektors zum Nachweis der Ziel-DNA herangezogen, während der **Ct**-Wert der Internal Control zur Validierung der Extraktion, Amplifikation und Detektion dient.

**Hinweis:** Überprüfen Sie über die Gerätesoftware („Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle“ (Ergebnisse > Amplifikationsdarstellung > Delta Rn vs. Zyklus)), dass der **Ct**-Wert anhand eines prompten und regelmäßigen Anstiegs der Fluoreszenz und nicht anhand von Spitzen oder eines Anstiegs des Hintergrunds (unregelmäßiger oder hoher Hintergrund) ermittelt wurde.

Die Ct-Werte der Amplifikationsreaktionen jeder Probe („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) werden wie in der folgenden Tabelle beschrieben verwendet:

Probenreaktion				Assayergebnis	
TAMRA-Detektor „SA“ (Ct1)	FAM-Detektor „mecA“ (Ct2)	ΔCt  Ct1 – Ct2	Cy5-Detektor „C“	SA-Ergebnis	MRSA-Ergebnis
Unbestimmt oder Ct > 35	Unbestimmt oder Ct > 35	n. z.	Ct < 34	Negativ	Negativ
		n. z.	Unbestimmt oder Ct ≥ 34	Ungültig	Ungültig
Bestimmt, Ct ≤ 35	Unbestimmt oder Ct > 35	n. z.	n. z.	Positiv	Negativ
		ΔCt ≥ 2	n. z.	Positiv	Negativ
	Bestimmt, Ct ≤ 35	ΔCt < 2	n. z.	Positiv	Positiv
Unbestimmt oder Ct > 35	Bestimmt, Ct ≤ 35	n. z.	n. z.	Negativ	Negativ

Assayergebnis		Ergebnisinterpretation
SA-Ergebnis	MRSA-Ergebnis	
Negativ	Negativ	Kein SA, einschließlich MRSA, DNA nachgewiesen. Vermutlich negativ für alle SA, einschließlich MRSA, oder Anzahl der Organismen kann unterhalb der Nachweisgrenze liegen.
Ungültig	Ungültig	Ungültiges Ergebnis. Lauf mit der Extraktion der Probe oder einer neuen Probe wiederholen.
Positiv	Negativ	Keine MRSA-DNA nachgewiesen. Vermutlich negativ für MRSA, oder MRSA-Anzahl kann unterhalb der Nachweisgrenze liegen. SA-DNA nachgewiesen. Vermutlich positiv auf SA.
Positiv	Positiv	MRSA-DNA nachgewiesen. Vermutlich positiv auf MRSA.

NA = Nicht anwendbar

Das Vorhandensein beider Marker (SA-Gen und *mecA*), gemessen anhand des Ct-Werts, in der gleichen relativen Menge (eine Differenz beim Ct-Wert von weniger als 2) ist ein Hinweis auf MRSA (einschließlich des kürzlich identifizierten LGA251-Stamms); unterschiedliche relative Mengen (eine Differenz beim Ct-Wert von 2 oder mehr) oder das Vorhandensein nur des *Staphylococcus aureus*-spezifischen Genmarkers sind ein Hinweis auf SA.

Lautet das Ergebnis der Proben-Amplifikationsreaktion Ct **Undetermined (Ct unbestimmt)** oder Ct > 35 beim SA- und beim *mecA*-Detektor und Ct **Undetermined (Ct unbestimmt)** oder Ct ≥ 34 beim IC-Detektor, bedeutet dies, dass es nicht möglich war, die Internal-Control-DNA effizient nachzuweisen. In diesem Fall sind während des Amplifikationsschritts (ineffiziente oder keine Amplifikation) oder während des Extraktionsschritts (Abbau von DNA, Verlust von DNA während der Extraktion oder Vorhandensein von Inhibitoren in der extrahierten DNA) Probleme aufgetreten, die zu falschen und falsch-negativen Ergebnissen führen können. Die Probe ist ungeeignet, der Assay ist ungültig und muss ab der Extraktion der Probe oder einer neuen Probe desselben Patienten wiederholt werden.

Lautet das Ergebnis der Proben-Amplifikation Ct **Undetermined (Ct unbestimmt)** oder Ct > 35 beim SA-Detektor und Ct < 34 beim IC-Detektor, bedeutet dies, dass die SA (einschließlich MRSA)-DNA in der verarbeiteten Probe nicht nachgewiesen wurde. Die Probe ist vermutlich negativ oder die Anzahl der Organismen in der Probe liegt unter der Nachweisgrenze des Produkts (siehe „Leistungsmerkmale“, Seite 15). In diesem Fall kann das Ergebnis falsch-negativ sein.

**Hinweis:** Wenn SA- oder MRSA-DNA in einer Probe nachgewiesen wird, kann der IC-Detektor Ct **Undetermined (Ct unbestimmt)** oder Ct ≥ 34 sein. Tatsächlich kann die hohe Effizienz der SA- oder MRSA-Amplifikation mit der geringen Effizienz der Internal Control-Amplifikation konkurrieren. In diesem Fall ist die Probe geeignet und das positive Ergebnis des Assays gültig.

### LEISTUNGSMERKMALE

#### Klinische Leistungsfähigkeit

Die Leistungsmerkmale des „MRSA/SA ELITE MGB® Kit“ wurden durch den Vergleich des „MRSA/SA ELITE MGB® Kit“ in Verbindung mit NucliSENS® easyMAG® einerseits und Remel Spectra™ MRSA und/oder Agglutinations-/Empfindlichkeitstests bestimmt. Eine echte kulturpositive MRSA-Probe wurde definiert als eine Probe, bei der MRSA durch eine der verwendeten Kulturtechniken identifiziert wurde. Eine echte Methicillinempfindliche SA-Kultur-positive Probe wurde definiert als eine Probe, die für alle verwendeten Kulturtechniken mit Ausnahme des Latex-Agglutinationstests negativ war.

Von jedem Patienten wurde ein Nasenabstrich entnommen und zur Beimpfung einer selektiven chromogenen MRSA-Screening-Agarplatte (Remel Spectra™ MRSA) verwendet. Im Anschluss wurde der Abstrichtupfer in ein Röhrchen mit Trypticase-Soja-Bouillon gegeben und gründlich gemischt, bevor das gesamte Volumen der Zellsuspension wie oben beschrieben verarbeitet wurde. Jeder Tupfer wurde dann in Trypticase-Soja-Bouillon mit 6,5 % NaCl angereichert. Die angereicherten Kulturproben wurden auf Trypticase-Soja-Blutagarplatten beimpft. Die Kolonien von den Trypticase-Soja-Blutagar-Platten wurden für den Latex-Agglutinationstest (Remel Staphaurex®) verwendet. Positiv auf Latex-Agglutination getestete Proben wurden für den Cefoxitin-Empfindlichkeitstest (BD BBL™ Sensi-Disc™ Susceptibility Test Disc Cefoxitin 20) gemäß der jeweiligen Gebrauchsanweisung verwendet.

Die Leistung des „MRSA/SA ELITE MGB® Kit“ wurde in Bezug auf die Kombination aus direkter chromogener Kultur und Bouillon-Kultur mit anschließenden Latex-Agglutinations- und Cefoxitin-Empfindlichkeitstest-Ergebnissen berechnet.

Nasenabstrichproben wurden durch eine Gesundheitseinrichtung von gesunden Spendern entnommen und wie oben beschrieben mit einer Kombination von Kulturmethoden untersucht. Auf diese Weise wurden 20 MRSA-Kultur-positive, 20 MSSA-Kultur-positive und 40 SA-Kultur-negative Proben identifiziert. Von den 40 SA-Kultur-negativen Proben wurden 20 Proben mit dem MRSA-Stamm BAA-2312 (mit *mecC*-Gen) etwa bis zur Nachweisgrenze aufgestockt.

Im Vergleich zur Referenz-Kulturmethode identifizierte das „MRSA/SA ELITE MGB® Kit“ 100 % der MRSA- und MRSA *mecC*-positiven Proben mit der Referenzmethode (diagnostische Sensitivität), und 97,5 % der negativen Proben (diagnostische Spezifität). Bei den getesteten Proben lag der positive Vorhersagewert (PPV, positive predictive value) für MRSA bei 97,6 % und der negative Vorhersagewert (NPV, negative predictive value) für MRSA bei 100 %.

#### Mit dem „MRSA/SA ELITE MGB® Kit“ erhaltene MRSA-Ergebnisse im Vergleich zur Referenzmethode.

	Diagnostische Sensitivität MRSA <i>mecA</i>	Diagnostische Sensitivität MRSA <i>mecC</i>	Diagnostische Spezifität MRSA
7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument	100 %	100 %	97,5 %
7500 Real Time PCR System	100 %	100 %	97,5 %

Im Vergleich zur Referenz-Kulturmethode identifizierte das „MRSA/SA ELITE MGB® Kit“ 95 % der SA-positiven Proben mit der Referenzmethode (diagnostische Sensitivität), und 100 % der negativen Proben (diagnostische Spezifität). Bei den getesteten Proben lag der positive Vorhersagewert (PPV, positive predictive value) für SA bei 100 % und der negative Vorhersagewert (NPV, negative predictive value) für SA bei 95 %.

**MRSA / SA ELITE MGB® Kit**  
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF M800351

Mit dem „MRSA/SA ELITE MGB® Kit“ erhaltene SA-Ergebnisse im Vergleich zur Referenzmethode.

	Diagnostische Sensitivität SA	Diagnostische Spezifität SA
7500 Fast dx Real Time PCR Instrument	95 %	100 %
7500 Real Time PCR System	95 %	100 %

**Nachweisgrenze**

Die Nachweisgrenze des „MRSA/SA ELITE MGB® Kit“ bei Verwendung mit NucliSENS® easyMAG® wurde anhand der nachfolgend aufgeführten Stämme bestimmt. Die Kulturen dieser Stämme wurden quantifiziert, in simulierter Nasenmatrix auf Werte im Bereich von etwa 5 bis 1500 koloniebildenden Einheiten (KbE) verdünnt und auf Abstrichtupfer aufgetragen. Alle Verdünnungen wurden getestet, und die Nachweisgrenze wurde mittels Probit-Analyse bestimmt. Die Nachweisgrenze für jeden Stamm stellt die niedrigste Anzahl von KBE/Abstrich dar, bei der mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit und mit mindestens 95 %iger Sicherheit ein positives Ergebnis erhalten wird. Die Nachweisgrenze wurde anschließend durch Testen von mindestens 20 Wiederholungen für jeden Stamm überprüft.

**Liste der Bakterienstämme für Untersuchungen zur Bestimmung der Nachweisgrenze**

Stamm-Nr.	Bezeichnung	Beschreibung	Arzneimittelresistenz
ATCC 29213	Wichita	QC-Stamm	MSSA
ATCC BAA-1556	MRSA252	im Krankenhaus erworben, UK	MRSA
ATCC BAA-2312	M10/0061	LGA251	MRSA

**Ergebnisse Nachweisgrenze (KbE/Abstrich)**

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

**Effizienz des Genotypnachweises (Inklusivität)**

Die Leistungsfähigkeit des „MRSA/SA ELITE MGB® Kit“ bei Verwendung mit NucliSENS® easyMAG® wurde mit der MRSA/SA QCMD-Ringversuchsreihe getestet. Alle Stämme wurden korrekt identifiziert. Darüber hinaus wurde der Assay<sup>1</sup> an 75 gut charakterisierten MRSA- und Methicillin-empfindlichen SA-Isolaten getestet, die für die weltweite genetische Vielfalt repräsentativ sind, einschließlich Klonkomplexe und Sequenztypen sowie verschiedener PFGE-Typen und MHK-Werte (minimale Hemmkonzentration). Die Stämme wurden über das Programm „Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA)“ und von der „American Tissue Culture Collection“ (ATCC) bezogen oder waren ein Geschenk des Medical College of Wisconsin<sup>2</sup>. Alle Stämme wurden auf Tupfern nahe der Nachweisgrenze absorbiert und getestet. Darüber hinaus wurden alle Methicillin-empfindlichen SA-Stämme mit 1x10<sup>6</sup> KbE/Tupfer getestet. Alle Methicillin-empfindlichen SA-Stämme wurden positiv auf SA und negativ auf MRSA getestet. Alle MRSA-Stämme wurden positiv auf MRSA getestet. Zwei BORSA (Borderline Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus*)-Isolate, denen das *mecA*-Gen fehlt, wurden SA-positiv und MRSA-negativ getestet, was eine Gesamteffizienz des Genotypnachweises (Inklusivität) von 97,3 % ergibt.

Die Analyse der für die Hybridisierung der Primer und Fluoreszenzmarker ausgewählten Regionen in der Anordnung der in der Datenbank für die SSC *mecA*-Elemente, einschließlich *mecC*, verfügbaren Sequenzen ergab eine Erhaltung und ein Nichtvorhandensein von signifikanten Mutationen.

<sup>1</sup> Zur Gewinnung der experimentellen Daten wurden das Extraktionssystem NucliSENS® easyMAG® und das 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument mit einer früheren Version des Assays verwendet, die mit der aktuellen identisch ist, mit der Ausnahme, dass sie keine *mecA*<sub>LGA251</sub>-spezifischen Oligonukleotide enthält.

<sup>2</sup> Geschenk von Dr. Nathan A. Ledebouer, Medical College of Wisconsin, Wisconsin, USA; die Stämme sind beschrieben in: Buchan, B.W., Ledebouer, 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; S. 921-927

**MRSA / SA ELITE MGB® Kit**  
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF M800351

**Analytische Spezifität (Kreuzreaktivität)**

Die Analyse der Anordnung der Sequenzen der SA-Primer und des Fluoreszenzmarkers mit den Sequenzen von Arten, die phylogenetisch mit *Staphylococcus aureus*, pathogenen Mikroorganismen und in der normalen nasalen Mikroflora häufig vorkommenden und in Datenbanken für andere Organismen als SA aufgeführten Mikroorganismen verwandt sind, zeigte deren Spezifität und das Fehlen einer signifikanten Homologie für das „MRSA/SA ELITE MGB® Kit“.

**Durch Sequenzdatenbankanalyse auf Kreuzreaktivität getestete Arten**

Staphylokokken-Arten	Andere Organismen	Viren	
<i>Staphylococcus arlettae</i>	CoNS	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Adenovirus Typ 1, 7</i>
<i>Staphylococcus capitis</i>	CoNS	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Humanes Coronavirus 229E; OC 43</i>
<i>Staphylococcus carnosus</i>	CoNS	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Cytomegalovirus</i>
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	CoNS	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Coxsackievirus A21</i>
<i>Staphylococcus delphini</i>	MSCoPS	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Epstein-Barr-Virus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MSCoNS	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	<i>Humanes Influenzavirus A, B</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MRCoNS	<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Humanes Parainfluenzavirus 1, 2, 3, 4</i>
<i>Staphylococcus equorum</i>	CoNS	<i>Corynebacterium flavescens</i>	<i>Humanes Metapneumovirus</i>
<i>Staphylococcus felis</i>	CoNS	<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Masernvirus</i>
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	CoNS	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Mumpsvirus</i>
<i>Staphylococcus hyicus</i>	CoPS	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Respiratorisches Synzytialvirus</i>
<i>Staphylococcus intermedius</i>	CoPS	<i>Enterococcus flavescens</i>	<i>Rhinovirus</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>	
		<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>	

**MRSA / SA ELITe MGB® Kit**  
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF M800351

Staphylokokken-Arten	Andere Organismen	Viren
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
	<i>Homo sapiens</i>	

CoNS = Koagulase-negativer *Staphylococcus* (Coagulase Negative *Staphylococcus*)  
 MSCoNS = Methicillin-empfindlicher Koagulase-negativer *Staphylococcus* (methicillin-sensitive Coagulase Negative *Staphylococcus*)  
 MRCoNS = Methicillin-resistenter Koagulase-negativer *Staphylococcus* (methicillin-resistant Coagulase Negative *Staphylococcus*)  
 CoPS = Koagulase-positiver *Staphylococcus* (Coagulase Positive *Staphylococcus*)

**Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial**

Die analytische Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen, die verglichen wurden mit Ergebnissen, die mit anderen Assays in verschiedenen Laboren erhalten wurden, wurde durch Testen von zertifiziertem Referenzmaterial überprüft.

Die Tests wurden unter Verwendung einer MRSA-Verdünnungsreihe (QCMD 2010 Methicillin Resistant *S. aureus* EQA Panel) als kalibriertes und zertifiziertes Referenzmaterial durchgeführt. Das Panel besteht aus sechs Proben mit verschiedenen MRSA-Konzentrationen, drei Proben mit Methicillin-empfindlichem *Staphylococcus aureus* (MSSA), einer Probe mit Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokken (MRCoNS), einer Probe mit *Escherichia coli* (*E. coli*) und einer echt negativen Probe. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion mit NucliSENS® easyMAG® und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit zertifiziertem Referenzmaterial				
Proben-ID	Inhalt	Probenkonz. KbE/ml	Erwartetes Ergebnis	Tatsächliches Ergebnis
MRSADNA10-04	MRSA	1 x 10 <sup>8</sup>	Häufig erkannt	Erkannt
MRSADNA10-03	MRSA	5 x 10 <sup>7</sup>	Häufig erkannt	Erkannt
MRSADNA10-01	MRSA	5 x 10 <sup>6</sup>	Häufig erkannt	Erkannt
MRSADNA10-09	MRSA	5 x 10 <sup>5</sup>	Häufig erkannt	Erkannt
MRSADNA10-08	MRSA	5 x 10 <sup>5</sup>	Häufig erkannt	Erkannt
MRSADNA10-02	MRSA	5 x 10 <sup>5</sup>	Erkannt	Erkannt
MRSADNA10-05	MSSA	5 x 10 <sup>6</sup>	MRSA negativ	MRSA-negativ, SA-positiv
MRSADNA10-06	MSSA	1 x 10 <sup>7</sup>	MRSA negativ	MRSA-negativ, SA-positiv
MRSADNA10-07	MSSA	5 x 10 <sup>6</sup>	MRSA negativ	MRSA-negativ, SA-positiv
MRSADNA10-12	MRCoNS	1 x 10 <sup>7</sup>	Negativ	Negativ
MRSADNA10-10	<i>E. coli</i>	5 x 10 <sup>6</sup>	Negativ	Negativ
MRSADNA10-11	MHBonly	-	Negativ	Negativ

Alle Proben wurden richtig erkannt.

**Verschleppung / Kreuzkontamination**

Zur Bewertung des Potenzials für eine Kreuzkontamination zwischen Proben mit einer hohen MRSA (1x10<sup>7</sup> KbE/ml)-Konzentration und negativen Proben wurde mit dem „MRSA/SA ELITe MGB® Kit“ eine analytische Studie durchgeführt. Zwei Bediener führten fünf Extraktionsläufe mit 24 Proben (11 hochtitrige MRSA-Proben, 11 negative Proben, 1 Positive-Control-Probe und 1 Negative-Control-Probe pro Lauf) in einem Schachbrettmuster durch (hochtitrige MRSA-Proben unterbrochen von vollständig negativen Proben). Die verarbeiteten Proben wurden dann in fünf separaten Läufen amplifiziert, wobei mit zwei verschiedene Schachbrettmuster angewendet wurden. Die Kreuzkontaminationstests ergaben null falsch-negative Ergebnisse bei 55 hoch MRSA-positiven Proben und eine falsch-positiv Probe bei 55 negativen Proben.

Zur Gewinnung der Verschleppungs-/Kreuzkontaminationsdaten wurden das Extraktionssystem NucliSENS® easyMAG® und das 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument mit einer früheren Version des Assays „MRSA/SA ELITe MGB® Kit“ verwendet, die mit der aktuellen identisch ist, mit der Ausnahme, dass sie

**MRSA / SA ELITe MGB® Kit**  
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF M800351

keine *mecC*-spezifischen Oligonukleotide enthält.

**Hinweis:** Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Produkts mit Geräten durchgeführt wurden, sind im Abschnitt 7 der technischen Dokumentation „MRSA/SA ELITe MGB® Kit“, FTP M800351, aufgeführt.

**QUELLENANGABEN**

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 *mecA<sub>LAGA251</sub>*. Clin Microbiol Infect 2012; 18:395-400.

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

**GRENZEN DES VERFAHRENS**

Verwenden Sie dieses Produkt nur in Verbindung mit dem empfohlenen Nukleinsäure-Extraktionssystem und Real-Time-PCR-Geräten.

Dieses Produkt darf nur mit DNA verwendet werden, die aus humanen Nasenabstrichen extrahiert wurde.

Keine extrahierte DNA, die mit Mucoproteinen, Propylenglykol, Ethanol oder 2-Propanol kontaminiert ist, mit diesem Produkt verwenden. Diese Substanzen hemmen die Amplifikation von Nukleinsäuren und können zu ungültigen Ergebnissen führen.

Keine extrahierte DNA, die große Mengen an humaner genomischer DNA enthält, mit diesem Produkt verwenden, da diese die Amplifikationsreaktion von Nukleinsäuren hemmen kann.

Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse hängt von der korrekten Durchführung von Identifizierung, Entnahme, Transport, Lagerung und Verarbeitung der Proben ab. Zur Vermeidung falscher Ergebnisse ist es notwendig, bei diesen Schritten vorsichtig vorzugehen und die den Produkten beiliegende Gebrauchsanweisung sorgfältig zu befolgen.

Aufgrund ihrer hohen analytischen Sensitivität ist die bei diesem Produkt verwendete Methode zur Echtzeit-Amplifikation empfindlich für Kreuzkontamination mit SA oder MRSA aus positiven klinischen Proben, aus Positivkontrollen und aus Produkten derselben Amplifikation. Kreuzkontamination führt zu falsch-positiven Ergebnissen. Durch das Produktformat wird die Kreuzkontamination begrenzt. Trotzdem kann Kreuzkontamination nur durch Beachtung der guten Laborpraxis und sorgfältiger Befolgung der vorliegenden Gebrauchsanweisung vermieden werden.

Dieses Produkt darf nur von qualifiziertem Personal, das im Umgang mit potenziell infektiösen biologischen Proben und als gefährlich klassifizierten chemischen Präparaten geschult ist, verwendet werden. Dadurch sollen Unfälle mit möglicherweise ernststen Folgen für den Anwender und andere Personen vermieden werden.

Die Verwendung dieses Produkts erfordert Arbeitskleidung und Arbeitsbereiche, die für den Umgang mit potenziell infektiösen biologischen Proben und als gefährlich klassifizierten chemischen Präparaten geeignet sind, um Unfälle mit möglicherweise ernststen Folgen für den Anwender und andere Personen zu vermeiden.

Dieses Produkt darf nur von qualifiziertem Personal, das im Umgang mit molekularbiologischen

**MRSA / SA ELITe MGB® Kit**  
**Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit**

REF M800351

Techniken, wie Extraktion, Amplifikation und Nachweis von Nukleinsäuren geschult ist, verwendet werden. Dadurch sollen falsche Ergebnisse vermieden werden.

Eine räumliche Trennung von Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten ist zu beachten, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Für die Verwendung des Produkts werden Spezialkleidung und Instrumente für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten benötigt, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Vor einer Umstellung auf eine neue Technologie sollten die Anwender aufgrund von inhärenten Unterschieden zwischen verschiedenen Technologien Korrelationsstudien zu den Methoden durchführen, um die Unterschiede zwischen den Technologien abschätzen zu können.

Ein mit diesem Produkt erhaltenes positives Ergebnis weist nicht auf das Vorhandensein von lebensfähigem SA oder MRSA hin, sondern lässt das Vorhandensein von SA oder MRSA vermuten. Daher bedeutet ein positives Ergebnis nicht unbedingt, dass die Eradikation fehlgeschlagen ist, da nicht lebensfähige DNA vorhanden sein kann.

Ein mit diesem Produkt erhaltenes negatives Ergebnis bedeutet, dass die SA- oder MRSA-DNA nicht in der DNA, die aus der Probe extrahiert wurde, nachgewiesen wurde. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Erregerlast unter dem Detektionslimit des Produkts liegt (siehe „Leistungsmerkmale“, Seite 15). In diesem Fall kann das Ergebnis falsch-negativ sein.

Ein negatives Ergebnis, das auf ein vorheriges positives Ergebnis folgt, kann auf einen Eradikationserfolg hindeuten, muss es aber nicht.

Die mit diesem Produkt erhaltenen Ergebnisse können manchmal aufgrund von Ausfällen der internen Kontrolle ungültig („Invalid“) sein und eine Wiederholung des Tests erfordern. Eine erneute Testung kann zu einer Verzögerung der endgültigen Testergebnisse führen.

Wenn auch selten, können Polymorphismen in der Primer- oder Sondenbindungsregion des bakteriellen Genoms den Nachweis beeinträchtigen.

Der Nachweis von MRSA bei Vorhandensein von übermäßigen Mengen Methicillin-empfindlicher SA- oder Coagulase-negativer *mecA*-Träger könnte beeinträchtigt sein.

Borderline-Oxacillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (BORSA)-Stämme, die das *mecA*-Gen nicht tragen, werden von dem Produkt nicht erkannt.

Die Ergebnisse sollten in Verbindung mit anderen Labor- und klinischen Daten interpretiert werden, die dem Arzt zur Verfügung stehen, und sollten als Ergänzung zu den Bemühungen zur Bekämpfung nosokomialer Infektionen verwendet werden, um Patienten zu identifizieren, für die verstärkte Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden müssen.

**FEHLERBEHEBUNG**

<b>Ziel-DNA nicht in der Reaktion der Positive Control erkannt</b>	
<b>Mögliche Ursachen</b>	<b>Abhilfemaßnahmen</b>
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Beim Dispensieren von Reagenzien in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen. Volumina des dispensierten Reaktionsgemischs kontrollieren. Volumina der dispensierten Positivkontrolle überprüfen.
Abbau der Sonde.	Ein neues Aliquot des Reaktionsgemischs verwenden.
Abbau des Standards.	Ein neues Aliquot der Positive Control verwenden.
Einstellfehler des Geräts.	Geräteeinstellungen auf Reaktionen der Positivkontrolle hin überprüfen. Geräteeinstellungen auf Temperaturzyklus hin überprüfen.

**MRSA / SA ELITe MGB® Kit**  
**Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit**

REF M800351

<b>Ziel-DNA in der Reaktion der Negative Control erkannt</b>	
<b>Mögliche Ursachen</b>	<b>Abhilfemaßnahmen</b>
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Verschütten des Inhalts des Proben-Teströhrchens vermeiden. Zwischen den Proben immer die Spitzen wechseln. Beim Dispensieren von Proben, Negativkontrolle und Positivkontrolle in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen.
Fehler beim Einstellen des Geräts.	Positionseinstellungen für Proben, Negativkontrolle und Positivkontrolle auf dem Gerät überprüfen.
Mikrotiterplatte schlecht versiegelt.	Beim Versiegeln der Mikrotiterplatte vorsichtig vorgehen.
Kontamination des hochreinen Wassers für die Molekularbiologie.	Ein neues Aliquot hochreines Wasser für die Molekularbiologie verwenden.
Kontamination des Reaktionsgemischs.	Ein neues Aliquot des Reaktionsgemischs verwenden.
Kontamination des Bereichs für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen.	Oberflächen und Geräte mit wässrigen Reinigungsmitteln reinigen, Laborkittel waschen, verwendete Teströhrchen und Spitzen austauschen.

<b>Unregelmäßige oder hohe Hintergrundfluoreszenz in den Reaktionen</b>	
<b>Mögliche Ursachen</b>	<b>Abhilfemaßnahmen</b>
Falsches Dispensieren oder unzureichendes Mischen der Probe.	Beim Einmischen von Proben, Negativkontrolle und Positivkontrolle in das Reaktionsgemisch vorsichtig vorgehen und dabei dreimal pipettieren. Beim Dispensierschritt Bläschenbildung vermeiden.

<b>Ungewöhnlich hoher Anteil positiver Ergebnisse innerhalb ein und desselben Laufs (Reaktionen mit ähnlich späten Ct-Werten)</b>	
<b>Mögliche Ursachen</b>	<b>Abhilfemaßnahmen</b>
Kontamination von Probe zu Probe bei Präanalyseschritten	Kontakt zwischen Mikropipette und Röhrchenwand vermeiden. Mikropipette nach dem Pipettieren jeder Probe mit frischer 3%iger Natriumhypochloritlösung oder DNA/RNA-Cleaner reinigen. Keine Pasteur-Pipetten verwenden. Die Pipetten müssen entweder Direktverdrängungspipetten sein oder zusammen mit Aerosolfilterspitzen verwendet werden. Proben in die letzten Positionen der Geräte einsetzen, wie in der Gebrauchsanweisung von ELITe InGenius angegeben. Die von der Software angegebene Ladefolge beachten
Kontamination der Laborumgebung	Alle Oberflächen, die mit dem Bediener und den Proben (einschließlich Pipetten) in Kontakt kommen, mit frischer 3%iger Natriumhypochloritlösung oder DNA/RNA-Cleaner reinigen. Einen UV-Dekontaminationszyklus durchführen. Ein neues Röhrchen mit PCR Mix und/oder KbE verwenden.

**SYMBOLE**

-  Katalognummer.
-  Temperaturobergrenze.
-  Chargenbezeichnung.
-  Verwendbar bis (letzter Tag des Monats).
-  *In-vitro*-Diagnostikum.
-  Erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79/EG über *In-vitro*-Diagnostika.
-  Genügend für „n“ Tests.
-  Achtung, Gebrauchsanweisung beachten.
-  Inhalt.
-  Hersteller.

**HINWEIS AN DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE  
LIZENZ**

Dieses Produkt enthält Reagenzien, die von Life Technologies Corporation hergestellt wurden und im Rahmen von Lizenzvereinbarungen zwischen ELITechGroup S.p.A. und deren Tochtergesellschaften und Life Technologies Corporation vertrieben werden. Im Kaufpreis dieses Produkts eingeschlossen sind eingeschränkte, nicht übertragbare Rechte zum Gebrauch nur dieser Produktmenge ausschließlich für Aktivitäten des Käufers mit direktem humandiagnostischem Bezug. Informationen zum Kauf einer Lizenz für dieses Produkt zu anderen als den oben genannten Zwecken sind erhältlich bei Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008, USA. Tel.: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-Mail: [outlicensing@thermofisher.com](mailto:outlicensing@thermofisher.com).

ELITe® MGB Nachweisreagenzien sind durch eines oder mehrere der US-Patente mit den Nummern 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800 und 9,169,256 und der EP-Patente mit den Nummern 1068358, 1144429, 1232157, 1261616 1430147, 1781675, 1789587, 1975256 und 2714939 sowie durch anhängige Patentanmeldungen geschützt.

Diese eingeschränkte Lizenz gestattet es der natürlichen oder juristischen Person, der dieses Produkt zur Verfügung gestellt wurde, das Produkt zu verwenden und die mithilfe des Produkts generierten Daten nur für humandiagnostische Zwecke zu verwenden. Weder die ELITechGroup S.p.A. noch deren Lizenzgeber gewähren weitere, ausdrückliche oder stillschweigende Lizenzen für andere Zwecke.

„ELITe MGB“ und das „ELITe MGB“-Gerätelogo sind eingetragene Marken in der Europäischen Union.

ELITe InGenius® ist eine eingetragene Marke der ELITechGroup.

NucliSENS® easyMAG® sind eingetragene Marken von bioMérieux SA.

eNAT™ ist eine Marke von COPAN Italia S.p.A.