



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
Website: 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
 Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF M800351

EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

Staphylococcus aureus es un patógeno oportunista que se transporta como microorganismo comensal en la piel y los orificios nasales de aproximadamente el 30 % de la población normal y puede causar una amplia variedad de enfermedades. SA, y sobre todo SARM, suelen ser una de las principales causas de las infecciones hospitalarias y se asocian a un aumento de la morbimortalidad y de los costes. La aparición de infecciones extrahospitalarias por SARM exige una vigilancia activa de los pacientes ingresados en hospitales u otros centros de salud por SA y SARM con el fin de identificar a aquellos que pueden ser un reservorio de infección para otros pacientes.

El producto «**MRSA/SA ELITE MGB® Kit**» es un ensayo triple basado en la amplificación en tiempo real que se dirige a las regiones conservadoras de un **gen específico de *Staphylococcus aureus*** que permite identificar SA coagulasa positivo. El ensayo también se dirige al **gen *mecA***, inclusive la variante ***mecC***, que ha recibido recientemente la denominación de **gen *mecC*** (Ito T. et al.), que causa resistencia a la metilicina y a otros antibióticos betalactámicos, y a un control interno exógeno para controlar la inhibición de la reacción y la integridad de los reactivos.

El gen específico de *Staphylococcus aureus* identifica de forma inequívoca SA coagulasa positivo, mientras que los genes *mecA* identifican de forma inequívoca la resistencia a la metilicina. La presencia de los dos marcadores a la misma cantidad relativa medida mediante una diferencia en el valor umbral del ciclo es un indicio de la existencia de SARM. En cambio, la existencia de cantidades relativas distintas o la presencia únicamente del marcador del gen específico de *Staphylococcus aureus* es un indicio de la existencia de SA.

Los ensayos basados en la amplificación en tiempo real de SARM/SA reducen considerablemente el tiempo de laboratorio comparado con los análisis de cultivos estándar, lo que mejora la eficacia del procedimiento. Los análisis actuales de detección de SARM mediante PCR en tiempo real se dirigen al lugar de inserción de la isla genómica *SCCmec* (*mecA* que transporta un elemento genético móvil denominado cromosoma de casete estafilocócico), así como al gen *mecA* o al gen *spa*. El producto «**MRSA/SA ELITE MGB® Kit**» se dirige a las regiones conservadoras de los marcadores genéticos de SARM y SA, lo que reduce a un mínimo los resultados falsos negativos debidos a la variabilidad natural del lugar de inserción natural de la *SCCmec* y, además, también reduce a un mínimo los resultados falsos positivos como consecuencia del problema de «casete vacío».

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo consiste en una reacción de amplificación en tiempo real con termostato programable que se suministra con un sistema óptico de detección de fluorescencia.

La sonda específica del gen específico de SA está basada en la tecnología ELITE MGB®, está marcada con el fluoróforo AP554 (similar al TAMRA) y se activa cuando se hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación de *Staphylococcus aureus*.

Las sondas específicas de los genes *mecA* y *mecC* están basadas en la tecnología ELITE MGB®, están marcadas con el fluoróforo FAM y se activan cuando se hibridan con el producto específico de las reacciones de amplificación de genes de resistencia a los antibióticos.

La sonda específica del control interno está basada en la tecnología ELITE MGB®, está marcada con el fluoróforo AP642 (similar al Cy5) y se activa cuando se hibrida con el producto específico de la amplificación del control interno.

A medida que aumenta la cantidad de producto específico de la amplificación, la emisión de fluorescencia también aumenta y el instrumento la mide y la registra. El procesamiento de los datos permite detectar la presencia de ADN de SARM o SA en la muestra inicial.

El ensayo se ha validado con los sistemas descritos en estas instrucciones de uso.

MRSA/SA ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF M800351



INDICE

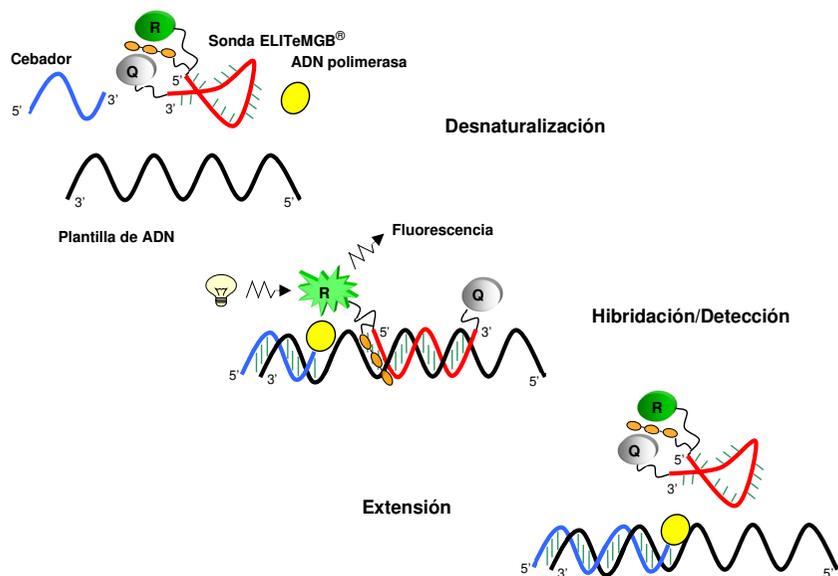
USO PREVISTO	página 1
EXPLICACIÓN DEL ENSAYO	página 2
PRINCIPIO DEL ENSAYO	página 2
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO	página 4
MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO	página 4
MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO	página 4
OTROS PRODUCTOS NECESARIOS	página 5
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	página 6
ELITE INGENIUS®	página 7
MUESTRAS Y CONTROLES	página 7
PROCEDIMIENTO	página 8
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	página 14
OTROS SISTEMAS	página 17
MUESTRAS Y CONTROLES	página 17
PROCEDIMIENTO	página 19
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	página 24
BIBLIOGRAFÍA	página 28
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	página 28
PROBLEMAS Y SOLUCIONES	página 29
SÍMBOLOS	página 30
AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA	página 31

USO PREVISTO

El producto «**MRSA/SA ELITE MGB® Kit**» forma parte de un ensayo cualitativo de amplificación de ácidos nucleicos para la **detección de *Staphylococcus aureus* (SA) y *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina (SARM, inclusive la cepa *mecC* recientemente identificada)** en muestras de ADN extraídas de exudados nasales y hemocultivos.

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

En la siguiente ilustración, se muestra el mecanismo de activación y emisión de fluorescencia de la sonda con tecnología ELITE MGB®. Tener en cuenta que la sonda no se hidroliza durante el ciclo de amplificación.



DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto «**MRSA/SA ELITE MGB® Kit**» incluye la mezcla completa **lista para el uso** para la amplificación en tiempo real en una solución estabilizadora. La mezcla se divide en alícuotas en **cuatro probetas listas para el uso**. Cada probeta contiene **540 µL** de solución, suficiente para **24 análisis** cuando se utiliza el «**ELITE InGenius®**» y para **25 análisis** cuando se utilizan otros sistemas.

Los cebadores y la sonda específicos del gen específico de *Staphylococcus aureus* (estabilizados mediante el grupo MGB®, marcados con el fluoróforo AP554 (AquaPhluor® 554), similar al TAMRA, e inactivados con una molécula no fluorescente) son específicos de una región conservadora de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo.

Los cebadores y las sondas específicos de los genes *mecA* y *mecC* (estabilizados con el grupo MGB®, marcados con el fluoróforo FAM e inactivados con una molécula no fluorescente) son específicos de las regiones conservadoras de los **genes *mecA* y *mecC*** que causan resistencia a la metilina y a otros antibióticos betalactámicos.

Los cebadores y la sonda del control interno (estabilizados con el grupo MGB®, marcados con el fluoróforo AP642, similar al Cy5, e inactivados con una molécula no fluorescente) son específicos de un ADN plasmídico no infeccioso que contiene secuencias artificiales del **control interno**.

La mezcla de reacción también contiene solución tampón, cloruro de magnesio, nucleótidos-trifosfatos, fluoróforo AP593 (similar al ROX) utilizado como referencia pasiva para normalizar la fluorescencia, la enzima uracil N-glucosidasa (UNG) para inactivar la contaminación mediante un producto de amplificación y la enzima ADN polimerasa de activación térmica («hot start»).

El producto permite efectuar **96 análisis cuando se utiliza el ELITE InGenius**, incluidos los controles.

El producto permite efectuar **100 análisis cuando se utilizan otros sistemas**, incluidos los controles.

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de peligros
Mezcla de PCR de SARM/SA	Mezcla completa de reacción	4×540 µL	-

MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Agitadora vorticial.
- Microcentrifugadora de sobremesa (12.000–14.000 rpm).
- Micropipetas y puntas con barrera estéril para aerosoles o puntas estériles de desplazamiento positivo (2–20 µL, 5–50 µL, 50–200 µL, 200–1000 µL).
- Agua de calidad para biología molecular.
- Caldo de soja y triptona.
- Termociclador programable con sistema óptico de detección de fluorescencia, instrumento de PCR en tiempo real 7500 Fast Dx (Applied Biosystems®) o sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems®) calibrado conforme a las instrucciones del fabricante.

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

Los reactivos para la recogida de muestras y la extracción del ADN de las muestras, el control interno, el control positivo de amplificación y los consumibles **no están** incluidos en el volumen de suministro de este producto.

Se recomienda utilizar el producto genérico «**eSwab Collection Kit**» (Copan, ref. 480CE) para recoger las muestras del paciente cuando el ensayo se utiliza en combinación con el «**ELiTe InGenius**».

Se recomienda utilizar el producto genérico «**eNAT™ Kit**» (Copan, ref. 608CS01R) para recoger las muestras del paciente cuando el ensayo se utiliza en combinación con el «**ELiTe InGenius**».

Se recomienda utilizar el producto genérico «**BBL CultureSwab Plus Amies Gel**» **sin exudados de carbón** (Becton-Dickinson, ref. 220116) para recoger las muestras de paciente cuando el ensayo se utiliza en combinación con el sistema de extracción EasyMag y el termociclador de PCR en tiempo real 7500 Fast Dx.

Para la extracción automática del ADN, la amplificación en tiempo real y la interpretación de los resultados de las muestras que deben analizarse, es necesario utilizar el instrumento «**ELiTe InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) y los siguientes protocolos de ensayo específicos:

- parámetros para el control positivo de amplificación «**MRSA-SA ELiTe_PC**» (ELITechGroup S.p.A.),
- parámetros para el control negativo de amplificación «**MRSA-SA ELiTe_NC**» (ELITechGroup S.p.A.),
- parámetros para las muestras que deben analizarse «**MRSA-SA ELiTe_NS_200_50**» y «**MRSA-SA ELiTe_BC_200_100**» (ELITechGroup S.p.A.).

Para el análisis automático de las muestras con el instrumento «**ELiTe InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030), es necesario utilizar los siguientes productos genéricos:

- cartuchos de extracción «**ELiTe InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),
- consumibles para extracción y amplificación «**ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032CS),
- consumibles para la sonicación «**ELiTe InGenius® Sonication tubes**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SON),
- cartuchos de amplificación «**ELiTe InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT035PCR),
- puntas «**300 µL Universal Filter Tips**» (Axygen BioScience Inc., CA, ref. TF-350-L-R-S),
- cajas «**ELiTe InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., ref. F2102-000).

Para la extracción automática de ADN de las muestras que van a analizarse, también está validado el uso de los productos genéricos «**NucliSENS® easyMAG® Strip for Premix**» (bioMérieux SA, ref. 278303), «**bioHit Electronic Multichannel Pipettor**» (bioMérieux SA, ref. 280141), «**Filter tips for bioHit**» (bioMérieux SA, ref. 280146) y «**NucliSENS® easyMAG® Reagents**» (bioMérieux SA, ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135) con el instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**» (bioMérieux SA, ref. 200111).

Como plantilla de control interno de extracción e inhibición, es necesario utilizar el producto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTCPE), que es una solución estabilizada que contiene ADN plasmídicos y el ARN genómico del bacteriófago MS2.

Cuando el sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast Dx se utiliza para la amplificación de ADN, para la amplificación en tiempo real, es preciso utilizar el producto genérico «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., ref. RTSACC02), así como microplacas con pocillos de 0,1 mL y placas de sellado adhesivas.

Cuando el sistema de PCR en tiempo real 7500 se utiliza para la amplificación de ADN, para la amplificación en tiempo real, es preciso utilizar el producto genérico «**Q - PCR Microplates**» (ELITechGroup S.p.A., ref. RTSACC01), así como microplacas con pocillos de 0,2 mL y placas de sellado adhesivas.

El producto principal, «**SARM/SA - ELiTe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. M800356), el control positivo de amplificación de ADN plasmídico debe utilizarse como control positivo de amplificación.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto está diseñado para su uso exclusivo *in vitro*.

Advertencias y precauciones generales

Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si fueran potencialmente infecciosas. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. No derramar ni rociar ningún producto. Los materiales que entran en contacto con las muestras biológicas deben tratarse durante al menos 30 minutos con hipoclorito de sodio al 3 %, o procesarse en autoclave durante una hora a 121 °C antes de su eliminación.

Manipular y eliminar todos los reactivos y materiales utilizados para realizar el ensayo como si fueran potencialmente infecciosos. Evitar el contacto directo con los reactivos. No derramar ni rociar ningún producto. Los residuos deben tratarse y eliminarse conforme a las normas de seguridad aplicables. El material combustible desechable debe incinerarse. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben neutralizarse antes de eliminarlos.

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

No pipetear ninguna solución con la boca.

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

Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.

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

Antes de realizar el ensayo, leer atentamente todas las instrucciones que se incluyen con el producto.

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

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

Utilizar únicamente los reactivos que se suministran con el producto y los recomendados por el fabricante.

No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular

Con el fin de evitar el riesgo de resultados incorrectos, sobre todo debido a la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o a la contaminación de estas con productos de amplificación, para los procedimientos de biología molecular, como la extracción, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos, el proceso debe correr a cargo de personal debidamente formado y cualificado.

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

Cuando la sesión de amplificación se configura manualmente, es necesario disponer de batas de laboratorio, guantes y herramientas que se empleen exclusivamente para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación. No llevar nunca batas de laboratorio, guantes ni herramientas del área asignada a la amplificación/detección de productos de amplificación al área asignada a la extracción/preparación de las reacciones de amplificación.

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

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

Con el fin de evitar el riesgo de contaminación, los productos de amplificación deben manipularse reduciendo en la medida de lo posible la dispersión hacia el entorno. Las pipetas utilizadas para manipular los productos de amplificación deben destinarse exclusivamente a dicho propósito.

Advertencias y precauciones específicas de los componentes

La **mezcla de PCR de SARM/SA** debe conservarse a -20 °C en un lugar protegido de la luz.

La **mezcla de PCR de SARM/SA** puede congelarse y descongelarse un máximo de **cinco veces**; más ciclos de congelación/descongelación pueden reducir el rendimiento del producto.

ELiTe InGenius®

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe utilizarse con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas:

Exudado nasal

Las muestras de exudado nasal concebidas para la extracción de ADN deben obtenerse con los siguientes sistemas de recogida y transporte:

«eNAT™ kit» (COPAN Italia S.p.A., ref. 608CS01R) para la extracción de ADN, identificado con de acuerdo con las directrices para laboratorios. El exudado nasal debe transportarse y conservarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C durante un máximo de cuatro semanas, o bien congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de seis meses. Antes del antes de realizar el análisis con este producto, es preciso transferir 0,2 mL de muestra del medio eNAT™ a la probeta ultrasónica proporcionada con el producto «**ELiTe InGenius Sonication tubes**».

«eSwab Collection Kit» (COPAN Italia S.p.A., ref. 480CE) para la extracción de ADN, identificado con de acuerdo con las directrices para laboratorios, así como transportado preferiblemente en las 2 horas siguientes a la recogida de la muestra. Si la entrega o el procesamiento inmediato se retrasan, las muestras deben transportarse y conservarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C durante un máximo de 48 horas, o bien congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de seis meses. Antes de realizar el análisis con este producto, es preciso transferir 0,2 mL de muestra del medio eSwab a la probeta ultrasónica proporcionada con el producto «**ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set**».

Nota: Cuando la extracción de ADN de exudados nasales se realiza con el **ELiTe InGenius** y la versión 1.2 del **software ELiTe InGenius®** (o versiones posteriores equivalentes), es preciso utilizar el protocolo de extracción **MRSA-SA ELiTe_NS_200_50**, que procesa 200 µL de muestra, añade el control interno **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 50 µL.

Hemocultivo

Las muestras de hemocultivo para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse e identificarse de acuerdo con las directrices para laboratorios. Las muestras deben transportarse y conservarse a temperatura ambiente durante un máximo de 24 horas.

Antes del antes de realizar el análisis con este producto, diluir la muestra en una proporción 1:1000 en agua ultrapura (al menos 10 µL de muestras en 10 mL de agua ultrapura), mezclarla en una agitadora vortical y transferir 0,2 mL de las muestras diluidas a una probeta ultrasónica proporcionada con el producto «**ELiTe InGenius Sonication tubes**».

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

Nota: cuando la extracción de ácidos nucleicos del hemocultivo se realiza con el **ELiTe InGenius** y la versión 1.2 del **software ELiTe InGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción **MRSA-SA ELiTe_BC_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Sustancias interferentes

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

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

Controles de amplificación

Antes de analizar cualquier muestra, es imprescindible generar y aprobar los controles de amplificación para cada lote de reactivos de amplificación:

Como control positivo de amplificación, utilizar el producto «**SARM/SA - ELiTe Positive Control**» junto con el protocolo «**MRSA-SA ELiTe_PC**».

Como control negativo de amplificación, utilizar agua de calidad para biología molecular (no incluida en el volumen de suministro de este kit) junto con el protocolo «**MRSA-SA ELiTe_NC**».

Nota: El sistema **ELiTe InGenius** necesita resultados aprobados y válidos de los controles de amplificación para cada lote de reactivos guardado en su base de datos.

Los resultados de los controles de amplificación, aprobados y guardados en la base de datos, caducan **después de 15 días**. Al llegar a la fecha de caducidad, es necesario volver a procesar los controles positivo y negativo con el lote de reactivos de amplificación.

Además, los controles de amplificación deben volver a procesarse en los siguientes casos:

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

Controles de calidad

Se recomienda validar el procedimiento entero de análisis, extracción y amplificación analizando los controles del proceso, como una muestra con resultado negativo y una con resultado positivo o un material de referencia calibrado.

Se deben realizar controles externos de acuerdo con los organismos de acreditación locales, estatales o federales, según proceda.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento de uso del producto «**MRSA/SA ELiTe MGB® Kit**» con el sistema **ELiTe InGenius** comprende tres fases:

- Verificación de la disponibilidad del sistema.
- Configuración de la sesión
- Evaluación y aprobación de los resultados

Verificación de la disponibilidad del sistema

Antes de iniciar la sesión, es necesario realizar las siguientes tareas siguiendo las indicaciones de la documentación del instrumento:

- Encender el **ELiTe InGenius** y seleccionar el modo «**CLOSED**».
- Con el lote de reactivos de amplificación que va a utilizarse, verificar que los controles de amplificación (**control positivo de SARM/SA, control negativo de SARM/SA**) se hayan procesado y aprobado y no hayan caducado («Status»). Si no se dispone de controles de amplificación aprobados o válidos, procesarlos tal como se describe en los siguientes apartados.
- Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario para configurar la sesión y utilizando los protocolos de ensayo proporcionados por ELiTechGroup S. p. A. Estos protocolos para diagnóstico *in vitro* se han validado específicamente con los kits **ELiTe MGB**, las matrices correspondientes, el instrumento **ELiTe InGenius** y la matriz mencionada. Los protocolos de ensayo disponibles para el producto «**MRSA/SA ELiTe MGB® Kit**» se describen en la siguiente tabla.

Protocolo de ensayo para el producto « MRSA/SA ELiTe MGB Kit »			
Nombre	Matriz	Informe	Características
MRSA-SA ELiTe_NS_200_50	Exudado nasal	Positivo/ Negativo	Volumen de entrada de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 50 µL Control interno: 10 µL Ultrasonidos: 1 ciclo, 5 seg ON Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de entrada de PCR de la muestra: 10 µL
MRSA-SA ELiTe_BC_200_100	Hemocultivo	Positivo/ Negativo	Volumen de entrada de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Control interno: 10 µL Ultrasonidos: NO Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de entrada de PCR de la muestra: 10 µL

Si el protocolo de ensayo deseado no está cargado en el sistema, contactar con el servicio de atención al cliente de ELiTechGroup más cercano.

Configuración de la sesión

El producto «MRSA/SA ELiTe MGB® Kit» puede utilizarse con el sistema ELiTe InGenius para realizar las siguientes tareas:

- Sesión integrada (modo de procesamiento «Extract + PCR»).
- Sesión de amplificación (modo de procesamiento «PCR Only»).
- Sesión del control positivo y del control negativo de amplificación (modo de procesamiento «PCR Only»).

Todos los parámetros necesarios para la sesión están incluidos en el protocolo de ensayo disponible en el instrumento y se abren automáticamente al seleccionar el protocolo de ensayo.

Nota: El sistema ELiTe InGenius puede conectarse al servidor de información de ubicaciones (LIS, «Location Information Server»), que permite enviar la información de la sesión de trabajo. Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del instrumento.

A continuación, se describen los pasos principales para configurar los cuatro tipos de sesión.

A. Sesión integrada

Para configurar la sesión integrada, seguir las instrucciones de la interfaz de usuario que se indican a continuación.

- Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla de PCR de SARM/SA para la sesión. Cada probeta es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar cuidadosamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Descongelar las probetas de CPE para la sesión. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones. Mezclar cuidadosamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
- Si se están procesando muestras de exudado nasal, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Eluate Volume», a 50 µL.
- Si se están procesando muestras de hemocultivo, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Eluate Volume», a 100 µL.
- Para cada pista deseada, rellenar el ID de la muestra («SampleID» o SID) escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
- En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., MRSA-SA ELiTe_NS_200_50).
- Asegurarse de que el protocolo que se muestra sea «Extract + PCR».
- En la columna «Sample Position», seleccionar la posición de carga de la muestra y elegir «Sonication Tube». Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar el CPE y la mezcla de PCR de SARM/SA en el bloque de inventario seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar los cartuchos de PCR, los cartuchos de extracción «ELiTe InGenius SP 200», todos los consumibles necesarios y las muestras que van a extraerse en las posiciones indicadas en el paso 8, siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cerrar la puerta del instrumento.
- Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el sistema ELiTe InGenius permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: Al finalizar la sesión, la muestra extraída que queda puede extraerse del instrumento, así como taparse, identificarse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar la muestra extraída.

Nota: Al finalizar la sesión, los cartuchos de PCR que contienen los productos de reacción y demás consumibles deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: La mezcla de PCR puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de **15 horas** (5 sesiones de trabajo de 3 horas cada una).

B. Sesión de amplificación

Para configurar la sesión de calibración, seguir las instrucciones de la interfaz de usuario que se indican a continuación:

- Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla de SARM/SA para la sesión. Cada probeta es suficiente para 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar cuidadosamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
- Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, si se están procesando muestras de exudado nasal, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 50 µL.
- Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, si se están procesando muestras de hemocultivo, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
- Para cada pista deseada, rellenar el SID escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
- En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., MRSA-SA ELiTe_NS_200_50).
- En la columna «Protocol», seleccionar «PCR Only».
- Asegurarse de que la posición de carga de la muestra del eluido en la columna «Sample Position» sea «ExtraTube» (fila inferior). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar la mezcla de PCR de SARM/SA en el bloque de inventario seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar los cartuchos de PCR y las muestras del ácido nucleico extraído siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cerrar la puerta del instrumento.
- Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el ELiTe InGenius permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: Al finalizar la sesión, la muestra extraída que queda puede extraerse del instrumento, así como taparse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar la muestra extraída.

Nota: Al finalizar la sesión, los cartuchos de PCR que contienen los productos de reacción y demás consumibles deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: La mezcla de PCR puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de **15 horas** (5 sesiones de trabajo de 3 horas cada una).

C. Sesión de amplificación para los controles positivo y negativo

Para configurar las sesiones de control positivo y control negativo de amplificación, seguir las instrucciones de la interfaz de usuario que se indican a continuación:

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla de PCR de SARM/SA para la sesión. Cada probeta es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar cuidadosamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar el control positivo de SARM/SA y las probetas de control positivo de LGA251/SA para la sesión. Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar cuidadosamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter al menos 30 µL de agua de calidad para biología molecular en una probeta de elución, incluida en el volumen de suministro del producto «ELITe InGenius SP Consumable Set».
4. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
5. Aunque no se vaya a realizar ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», en 100 µL.
6. En la pista deseada, seleccionar en la columna «Assay» el protocolo de ensayo que va a utilizarse.
7. Para el control positivo, seleccionar MRSA-SA ELITe_PC en la columna «Assay» e introducir el código de lote y la fecha de caducidad del control positivo de SARM/SA.
8. Para el control negativo, seleccionar MRSA-SA ELITe_NC e introducir el código de lote y la fecha de caducidad del agua de calidad para biología molecular.
9. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar la mezcla de Q-PCR de SARM/SA en el bloque de inventario seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cargar los cartuchos «PCR Reacción Cassette», las dos probetas de control positivo (SARM/SA y LGA251/SA) o la probeta del control negativo siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cerrar la puerta del instrumento.
14. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el sistema **ELITe InGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: El software del instrumento utiliza los resultados de las sesiones de amplificación del control positivo y del control negativo para configurar los gráficos de control. Para configurar el gráfico de control, se necesitan cuatro resultados de control positivo y de control negativo de cuatro sesiones diferentes. Después de esto, los resultados de los controles positivo y negativo se utilizan para controlar el rendimiento del paso de amplificación. Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del instrumento.

Nota: Al finalizar la sesión, los controles positivos que quedan pueden extraerse del instrumento, así como taparse y conservarse a -20 °C. El control negativo que queda debe eliminarse.

Nota: Al finalizar la sesión, los cartuchos de PCR que contienen los productos de reacción y demás consumibles deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: La mezcla de PCR puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de **15 horas** (5 sesiones de trabajo de 3 horas cada una).

Evaluación y aprobación de los resultados

Al finalizar la sesión, aparece automáticamente la pantalla «Results Display», en la que se muestran los resultados de la muestra/los controles y la información relativa a la sesión. En esta pantalla, es posible aprobar el resultado, así como imprimir o guardar los informes («Sample Report» o «Track Report»). Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del instrumento.

Nota: El sistema ELITe InGenius puede conectarse al servidor de información de ubicaciones (LIS, «Location Information Server»), que permite enviar los resultados de la sesión de trabajo al centro de datos del laboratorio. Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del instrumento.

El sistema **ELITe InGenius** genera los resultados utilizando el producto «**MRSA/SA ELITe MGB® Kit**» con el siguiente procedimiento:

- A. Validación de los resultados de los controles positivo y negativo de la amplificación
- B. Validación de los resultados de las muestras
- C. Generación del informe de resultados de la muestra

A. Validación de los resultados de los controles positivo y negativo de la amplificación

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por la sonda específica de los genes *mecA* y *mecC* (*mecA*) y por la sonda específica del gen de SA (SA) en la reacción de amplificación de los controles positivo y negativo utilizando los parámetros incluidos en los protocolos de ensayo «MRSA-SA ELITe_PC» y «MRSA-SA ELITe_NC».

Tras la aprobación por parte del administrador o del analista, los resultados de los controles positivo y negativo de la amplificación, específicos del lote de reactivos de amplificación, se guardan en la base de datos («Controls»), siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario.

Los resultados de los controles positivo y negativo de la amplificación, específicos del lote de reactivos de amplificación, caducan **después de 15 días**.

Antes de analizar cualquier muestra, es imprescindible verificar que el control positivo y el control negativo de la amplificación se hayan procesado con el lote de reactivos de amplificación pertinente y que los resultados se hayan aprobado y sean válidos. La disponibilidad de los resultados aprobados («Approved») del control positivo y del control negativo de amplificación («Status») se muestra en la ventana «Controls» de la interfaz de usuario. Si no se dispone de resultados del control positivo y del control negativo de amplificación, es necesario generarlos como se ha descrito anteriormente.

Nota: Si el resultado del procesamiento de los controles positivo o negativo no cumple los criterios de aceptación, el instrumento muestra el mensaje «Not passed» en la pantalla «Controls» y no es posible aprobarlo. En este caso, es necesario repetir la reacción de amplificación de los controles positivo o negativo.

Nota: Cuando el control positivo o el control negativo se procesan junto con las muestras que van a analizarse y el resultado no es válido, se invalida la sesión entera. En este caso, también es necesario repetir la amplificación de todas las muestras.

B. Validación de los resultados de las muestras

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por la sonda específica de los genes *mecA* y *mecC* (*mecA*), por la sonda específica del gen de SA (SA) y por la sonda específica del control interno (IC) en cada reacción de amplificación de la muestra utilizando los parámetros incluidos en el protocolo del ensayo.

Nota: Antes de analizar una muestra, comprobar que los controles de amplificación se hayan procesado con el lote de reactivos de amplificación pertinente y que los resultados se hayan aprobado y sean válidos. La disponibilidad de los resultados aprobados («Approved») de los controles de amplificación («Status») se muestra en la ventana «Controls» de la interfaz de usuario. Si no se dispone de resultados de los controles de amplificación, es necesario generarlos como se ha descrito anteriormente.

Los resultados se muestran en los informes generados por el instrumento («Result Display»).

La sesión de la muestra puede aprobarse cuando se cumplen las dos condiciones que se muestran en la siguiente tabla.

1) Control positivo	Estado
Control positivo de SARM/SA	APROBADO
Control positivo de LGA251/SA	APROBADO
2) Control negativo	Estado
Control negativo de SARM/SA	APROBADO

Para cada muestra, el sistema interpreta automáticamente el resultado del ensayo según el algoritmo del **software ELITE InGenius** y los parámetros del protocolo del ensayo.

En la siguiente tabla, se muestran posibles mensajes de los resultados de una muestra.

Resultado de la sesión de la muestra	Interpretación
MRSA Detected	Se ha detectado ADN de SARM en la muestra.
MRSA/SA Not Detected or below LoD	No se ha detectado ADN de SARM/SA en la muestra. La muestra es negativa para estas dianas o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo.
MRSA Not Detected or below LoD, SA Detected	No se ha detectado ADN de SARM en la muestra. La muestra es negativa para estas dianas o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo. Se ha detectado SA.
Invalid - Retest Sample	Resultado del ensayo no válido debido a un error del control interno (extracción incorrecta o arrastre de inhibidores).

Las muestras no aptas para la interpretación de los resultados se indican como «Invalid - Retest Sample» en el **software ELITE InGenius**. En este caso, el ADN del control interno no ha podido detectarse correctamente debido a problemas en el paso de amplificación o de extracción (degradación del ADN, pérdida de este durante la extracción o arrastre de inhibidores en el eluido), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y a falsos negativos.

Si el volumen del eluido es suficiente, la muestra extraída puede volver a analizarse con una sesión de amplificación en el modo de procesamiento «PCR Only». Si se produce un segundo resultado no válido, la muestra debe volver a analizarse a partir del paso de la extracción de una nueva alícuota en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Las muestras aptas para el análisis en las que no ha sido posible detectar el ADN de SARM/SA se indican como: «MRSA/SA: DNA Not Detected or below LoD». En este caso, no se puede descartar que el ADN de SARM/SA esté presente en una concentración inferior al límite de detección del ensayo (consultar el apartado «Características de rendimiento»).

Nota: Los resultados obtenidos con este ensayo deben interpretarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Los resultados de la sesión de la muestra se guardan en la base de datos y, si son válidos, pueden ser aprobados («Result Display») por personal que tenga la cualificación de administrador («Administrator») o analista («Analyst») y siga las instrucciones de la interfaz de usuario. La ventana «Result Display» permite imprimir y guardar los resultados de la sesión de la muestra como «Sample Report» y como «Track Report».

C. Generación del informe de los resultados de las muestras

Los resultados de las muestras se guardan en la base de datos y pueden exportarse como «Sample Report» y como «Track Report».

En «Sample Report», se muestran los detalles de una sesión de trabajo ordenados por la muestra seleccionada (SID).

En «Track Report», se muestran los detalles de una sesión de trabajo ordenados por la pista seleccionada.

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad analítica: Límite de detección

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

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

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas	Mec A Ct medio	SA Ct medio
20 copias de ADN plasmídico de SARM/SA + 40.000 copias del control interno	18	17	1	35,04	34,43
20 copias de ADN plasmídico de LGA251/Sa + 40.000 copias del control interno	18	18	0	34,75	34,12

Sensibilidad analítica: reproducibilidad con material de referencia certificado

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

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el «ELITE InGenius»			
Muestra	Contenido de la muestra	Resultado esperado	Resultado real
MRSADNA14-01	MRSA N315	SARM detectado	SARM detectado
MRSADNA14-02	MSSA ATCC 29213	Negativo para SARM	Negativo para SARM
MRSADNA14-03	MSSA 29213 + MRCoNS 634	Negativo para SARM	Negativo para SARM
MRSADNA14-04	E. coli ATCC 35218	Negativo para SARM	Negativo para SARM
MRSADNA14-05	MRSA N315	SARM detectado con frecuencia	SARM detectado
MRSADNA14-06	MHB solo	Negativo para SARM	Negativo para SARM
MRSADNA14-07	MRSA N315	SARM detectado con poca frecuencia	SARM detectado
MRSADNA14-08	SARM mecC	SARM detectado con poca frecuencia	SARM detectado
MRSADNA14-09	MRCoNS 634	Negativo para SARM	Negativo para SARM
MRSADNA14-10	MRSA ST398	SARM detectado	SARM detectado
MRSADNA14-11	MRSA N315	SARM detectado con frecuencia	SARM detectado
MRSADNA14-12	MRSA N315	SARM detectado	SARM detectado

Todas las muestras se detectaron correctamente.

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

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el «ELITE InGenius»		
Muestra	Resultado esperado	Resultado real
S. aureus_MRSA, cepa extrahospitalaria	Positivo para SARM	SARM detectado
S. aureus_MRSA, cepa hospitalaria	Positivo para SARM	SARM detectado
S. aureus_MSSA	Positivo para SARM	SARM detectado
S. aureus_MSSA, cartucho vacío	Positivo para SARM	SARM detectado
S. epidermidis_MSSE HER 1292	Negativo	Negativo

Todas las muestras se detectaron correctamente.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, como confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando muestras clínicas de exudado nasal y hemocultivo positivas para SARM y SASM.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando 60 muestras de exudado nasal positivas para SASM, 21 muestras de exudado nasal positivas para SARM y 20 muestras de exudado nasal enriquecidas para ADN de SARM añadiendo SARM BAA-1556 (ATCC) a un título de 100.000 ufc/mL.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando 39 muestras de hemocultivo positivas para SASM, 21 muestras de hemocultivo positivas para SARM y 10 muestras de hemocultivo enriquecidas con cepas aisladas de SARM, dada la dificultad de encontrar un número reseñable de muestras clínicas positivas para algunos genes diana de SARM.

Cada muestra se analizó realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados, con el «**ELITE InGenius**» y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Muestras de exudado nasal positivas para ADN de SASM	60	56	4
Muestras de exudado nasal positivas para ADN de SARM	41	40	1
Muestras de hemocultivo positivas para ADN de SASM	39	39	0
Muestras de hemocultivo positivas para ADN de SARM	31	31	0

En el caso de las muestras de exudado nasal, se detectaron correctamente 56 de 60 muestras de SASM. Cuatro (4) muestras presentaron un resultado negativo. Se detectaron correctamente 40 de 41 muestras de SARM. Una muestra presentó un resultado positivo para SASM.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo asociada al exudado nasal fue del 93 % en el caso de SASM y del 98 % en el caso de SARM.

En el caso de las muestras de hemocultivo, todas las muestras se detectaron correctamente.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo asociada al hemocultivo fue del 100 %, tanto en el caso de SASM como en el de SARM.

En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 96 % en el caso de SASM y del 99 % en el caso de SARM.

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, como confirmación de las muestras negativas, se evaluó analizando 48 muestras clínicas de exudado nasal y 34 muestras clínicas de hemocultivo negativas para SARM/SA.

Cada muestra se analizó realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados, con el «**ELITE InGenius**» y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Muestras de exudado nasal negativas para ADN de SARM/SA	48	0	48
Muestras de hemocultivo negativas para ADN de SARM/SA	34	0	34

Todas las muestras se detectaron correctamente.

En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

OTROS SISTEMAS

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe utilizarse con ADN extraído de muestras clínicas de exudado nasal.

Las muestras de exudado nasal concebidas para la extracción de ADN deben recogerse con el producto «BBL Culture Swab Plus Amies Gel» sin exudados de carbón (Becton-Dickinson) e identificarse de acuerdo con las directrices para laboratorios. Las muestras de exudado nasal deben transportarse y conservarse a una temperatura comprendida entre +18 °C y +25 °C durante un máximo de un día, o bien congelarse y conservarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C durante un máximo de siete días. Las muestras de exudado nasal se sumergieron 1 mL de caldo de soja y triptona (TSB) y se mezclaron en la agitadora vorticial durante 10 segundos antes de comenzar el procedimiento de extracción.

Nota: Si la extracción de ADN se realiza con el sistema «NucliSENS® easyMAG®», utilizar la configuración siguiente.

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

- Matriz: otra.
- Protocolo: genérico 2.0.1.
- Volumen (mL): 1,0 mL.
- Eluido (µL): 50 µL.
- Tipo: primario.

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

Sustancias interferentes

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

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

Sustancia potencialmente interferente (tipo)	Ingrediente activo	¿Interfiere?
Mucina, glándula submandibular bovina	Proteína mucina purificada	No
Sangre (humana)	Hemoglobina	No
Aerosoles o gotas nasales	Fenilefrina	No
	Oximetazolina	No
	Cloruro de sodio con conservantes	No
	Cloruro de benzalconio	No
	Fosfato de sodio	No
	Fenilcarbinol	No
	Propilenglicol	Sí
	Sorbitol, alcohol bencílico	No
	Edetato disódico, hipromelosa	No
	Ácido fosfórico	No
Corticoides nasales	Dexametasona	No
	Triamcinolona	No
	Beclometasona	No
	Flunisolida	No
	Budesonida	No
	Mometasona	No
	Fluticasona	No
Gel nasal	Luffa operculata, sulfuro	No
Medicamentos homeopáticos para aliviar la alergia	Galfimia glauca	No
	Hidrocloruro de histamina	No
Vacuna	Vacuna intranasal contra la gripe elaborada con virus vivos	No
Pastillas para la garganta, anestésicos y analgésicos orales	Benzocaína, mentol	No
Fármacos antivíricos	Zanamivir, fosfato de oseltamivir	No
Antibiótico, pomada nasal	Mupirocina	No
Antibacteriano, sistémico	Tobramicina	No

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

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

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

Controles de amplificación

Cada sesión de amplificación debe validarse con una reacción del control negativo y una del control positivo.

Para el control negativo, utilizar agua de calidad para biología molecular (no incluida en el volumen de suministro).

Para el control positivo, utilizar las dos soluciones del producto «SARM/SA - ELite Positive Control» (no incluidas en el volumen de suministro).

Controles de calidad

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

PROCEDIMIENTO

Configuración de la sesión de amplificación en tiempo real

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

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

- Encender el ordenador, encender el termociclador de tiempo real, ejecutar el software dedicado y abrir una sesión de «cuantificación absoluta».
- Si se utiliza el **instrumento de PCR en tiempo real 7500 Fast Dx**, seleccionar «Run mode: Fast 7500».
- Crear un nuevo conjunto de «detectores» o establecer el «detector» apropiado en el menú «Tool» seleccionando el gestor de detectores.
 - Establecer el «detector» para la sonda del gen específico de SA con el «reporter» = «TAMRA» (AP554 es similar a TAMRA), el inactivador («quencher») = «none» (no fluorescente) y llamarlo «SA».
 - Establecer el «detector» para las sondas de los genes *mecA* y *mecC* con el «reporter» = «FAM», el inactivador («quencher») = «none» (no fluorescente) y llamarlo «mecA»;
 - Establecer el «detector» para la sonda del control interno con el «reporter» = «Cy5» (AP642 es similar al Cy5) y el inactivador («quencher») = «none» (no fluorescente) y llamarlo «IC».

Ir al menú «View», seleccionar «Well Inspector» y, para cada pocillo en uso en la microplaca, establecer el «detector» (tipo de fluorescencia que va a medirse), la «referencia pasiva» = «ROX» (AP593 es similar al ROX, normalización de la fluorescencia medida) y el tipo de reacción (muestra, control negativo de amplificación, control positivo de amplificación). Añadir esta información a la **hoja de trabajo** adjunta al final de este manual o imprimir la configuración de la microplaca. La **hoja de trabajo** debe seguirse estrictamente al transferir la mezcla de reacción y las muestras a los pocillos.

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

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
NC	PC1	PC2									

Leyenda: S1–S12: Muestras que deben analizarse. NC: control negativo de amplificación.
 PC1: control positivo de SARM/SA de amplificación. PC2: control positivo de LGA251/SA de amplificación.

Siguiendo las indicaciones de la documentación del instrumento, utilizar el software dedicado («Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile») para definir los parámetros del **ciclo térmico**:
 - Añadir a la fase de amplificación un **paso de extensión a 72 °C** (opción «Add Step»).

Nota: La adquisición de la fluorescencia («Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection») debe establecerse durante el paso de hibridación a 56 °C.

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

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

Configuración de la amplificación

Debe realizarse en el área de extracción/preparación de la reacción de amplificación.

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

- Tomar y descongelar las probetas que contienen las muestras que van a analizarse. Mezclar cuidadosamente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo.
- Tomar y descongelar las probetas de la **mezcla de PCR de SARM/SA** necesarias para la sesión, recordando que cada una de ellas es suficiente para preparar **25 reacciones**. Mezclar cuidadosamente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo durante un máximo de cuatro horas.
- Tomar y descongelar una probeta de **control positivo de SARM/SA** (control positivo de las reacciones de amplificación en tiempo real para el gen específico de SA y para el gen *mecA*). Mezclar cuidadosamente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo durante un máximo de cuatro horas.
- Tomar y descongelar una probeta de **control positivo de LGA251/SA** (control positivo de las reacciones de amplificación en tiempo real para el gen *mecC*). Mezclar cuidadosamente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo durante un máximo de cuatro horas.
- Tomar la **microplaca de amplificación** que se utilizará durante la sesión, manipulándola con guantes sin talco y teniendo cuidado de no dañar los pocillos.

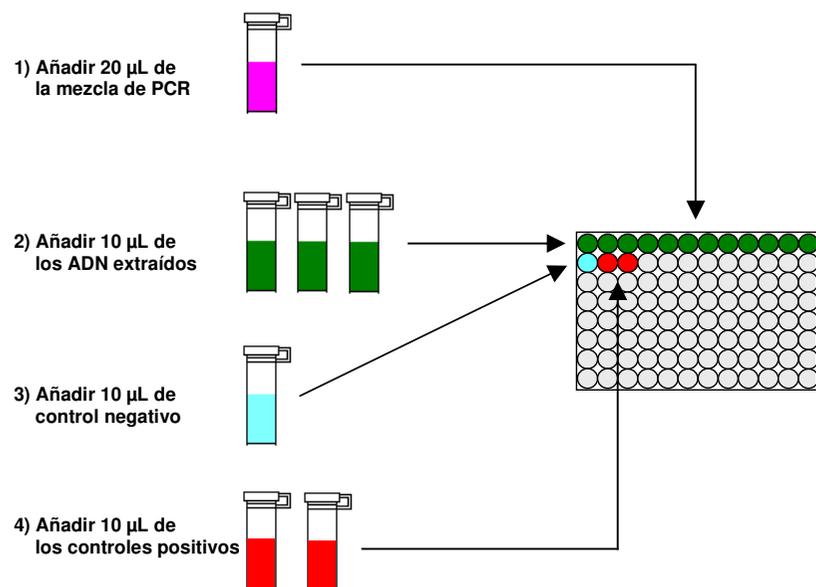
1. Distribuir de forma precisa **20 µL** de la **mezcla de PCR de SARM/SA** en la parte inferior de los pocillos de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Evitar la formación de burbujas.

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

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

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

La siguiente figura muestra la configuración de la reacción de amplificación.



Análisis cualitativo de los resultados

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

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

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

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

En las reacciones de amplificación del **control positivo de SARM/SA** y del **control positivo de LGA251/SA**, los valores **Ct** de los detectores de SA y *mecA* («Results > Report») se utilizan para validar la amplificación y la detección, tal como se describe en la siguiente tabla:

Reacción del control positivo detector TAMRA «SA»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct ≤35	POSITIVO	CORRECTA

Reacción del control positivo detector FAM «mecA»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct ≤35	POSITIVO	CORRECTA

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

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

Reacción del control negativo detector TAMRA «SA»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct no determinado o Ct > 35	NEGATIVO	CORRECTA

Reacción del control negativo detector FAM «mecA»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct no determinado o Ct > 35	NEGATIVO	CORRECTA

Reacción del control negativo detector Cy5 «IC»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct no determinado o Ct ≥34	NEGATIVO	CORRECTA

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

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

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

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

Reacción de la muestra				Resultado del ensayo	
Detector «TAMRA» «SA» (Ct1)	Detector «FAM» «mecA» (Ct2)	ΔCt [Ct1 –Ct2]	Detector Cy5 «IC»	Resultado de SA	Resultado de SARM
No determinado o Ct >35	No determinado o Ct > 35	NA	Ct <34	Negativo	Negativo
		NA	No determinado o Ct ≥34	No válido	No válido
Determinado, Ct ≤35	No determinado o Ct > 35	NA	NA	Positivo	Negativo
	Determinado, Ct ≤35	ΔCt ≥2	NA	Positivo	Negativo
		ΔCt <2	NA	Positivo	Positivo
No determinado o Ct > 35	Determinado, Ct ≤35	NA	NA	Negativo	Negativo

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

NA: no aplicable

La presencia de ambos marcadores (gen SA y *mecA*) medida mediante el valor Ct a la misma cantidad relativa (una diferencia en Ct inferior a 2) es un indicio de la presencia de SARM (inclusive la cepa de LGA251 recientemente identificada); la existencia de diferentes cantidades relativas (una diferencia en Ct igual a 2) o la presencia únicamente del marcador del gen específico de *Staphylococcus aureus* es un indicio de la existencia de SA.

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

Si el resultado de la amplificación de la muestra es **Ct no determinado** o **Ct >35** para el detector de SA y **Ct <34** para el detector del control interno, significa que el ADN de SA (inclusive SARM) no se ha detectado en la muestra procesada. La muestra es supuestamente negativa o algunos microorganismos de la muestra se encuentran por debajo del límite de detección del producto (consultar el apartado «Características de rendimiento» en la página 15). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

Nota: Cuando se detecta ADN de SA o SARM en una muestra, puede que el detector del control interno sea **Ct no determinado** o **Ct ≥34**. De hecho, la alta eficacia de la amplificación de SA o SARM puede competir con la baja eficacia de la amplificación del control interno. En este caso, la muestra es apta y el resultado positivo del ensayo es válido.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Rendimiento clínico

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

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

El rendimiento del producto «**MRSA/SA ELiTe MGB® Kit**» se calculó en relación con la combinación del cultivo cromogénico directo y el cultivo en caldo, seguidos de los resultados del ensayo de aglutinación en látex y del análisis de sensibilidad a la cefoxitina.

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

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

Resultados para SARM obtenidos con el producto «MRSA/SA ELiTe MGB® Kit» comparado con el método de referencia.

	Sensibilidad diagnóstica para <i>mecA</i> de SARM	Sensibilidad diagnóstica para <i>mecC</i> de SARM	SARM Especificidad diagnóstica
Instrumento de PCR en tiempo real 7500 Fast Dx	100 %	100 %	97,5 %
Sistema de PCR en tiempo real 7500	100 %	100 %	97,5 %

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

Resultados de SA obtenidos con el producto «MRSA/SA ELiTe MGB® Kit» comparado con el método de referencia.

	SA Sensibilidad diagnóstica	SA Especificidad diagnóstica
Instrumento de PCR en tiempo real 7500 Fast Dx	95 %	100 %
Sistema de PCR en tiempo real 7500	95 %	100 %

Límite de detección

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

Lista de cepas bacterianas para estudios de determinación del LoD

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

Resultados del límite de detección (ufc/exudado)

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

Eficacia de detección del genotipo (inclusividad)

El rendimiento del producto «**MRSA/SA ELiTe MGB® Kit**» utilizado junto con el sistema **NucliSENS® easyMAG®** se analizó con el panel de eficacia SARM/SA QCMD. Todas las cepas se identificaron correctamente. Aparte de esto, el ensayo¹ se analizó con 75 cepas aisladas bien caracterizadas de SA sensibles a la metilina y de SARM, que eran representativas de la diversidad genética global, inclusive complejos clónicos y tipos de secuencias, así como varios tipos de electroforesis en gel con campo pulsado (PFGE) y valores de CIM (concentración inhibitoria mínima). Las cepas se obtuvieron a través del programa de la Network on Antimicrobial Resistance en *Staphylococcus aureus* (NARSA) y de la American Tissue Culture Collection (ATCC), o bien fueron un regalo del Medical College of Wisconsin². Todas las cepas se absorbieron en exudados cerca del límite de detección y se analizaron. Además, todas las cepas de SA sensibles a la metilina se analizaron a 1x10⁶ ufc/exudado. Todas las cepas de SA sensibles a la metilina dieron un resultado positivo para SA y negativo para SARM. Todas las cepas de SARM dieron un resultado positivo para SARM. Dos cepas aisladas de BORSA (*Staphylococcus aureus* con resistencia limitrofe a la oxalilina) que no contenían el gen *mecA* dieron un resultado positivo para SA y negativo para SARM, lo que representa una eficacia global de detección de genotipos (inclusividad) del 97,3 %.

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

Especificidad analítica (reactividad cruzada)

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

¹ Los datos experimentales se obtuvieron utilizando el sistema de extracción NucliSENS® easyMAG® y el instrumento de PCR en tiempo real 7500 Fast Dx con una versión anterior del ensayo, que era idéntico, con la excepción de que no contenía los oligonucleótidos específicos de *mecA*_{LGA251}.

² Regalo del Dr. Nathan A. Ledebouer, Medical College of Wisconsin, WI; las cepas se describen en: 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;134:921-927

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

Especies de <i>Staphylococci</i>	Otros microorganismos	Virus	
<i>Staphylococcus arlettae</i>	SCoN	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Adenovirus tipo 1, 7
<i>Staphylococcus capitis</i>	SCoN	<i>Bacillus cereus</i>	Coronavirus humano 229E, OC 43
<i>Staphylococcus carnosus</i>	SCoN	<i>Bordetella pertussis</i>	Citomegalovirus
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	SCoN	<i>Citrobacter freundii</i>	Virus de Coxsackie A21
<i>Staphylococcus delphini</i>	SCoPSM	<i>Citrobacter koseri</i>	Virus de Epstein Barr
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SCoNSM	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	Virus de la gripe A, B
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SCoNRM	<i>Corynebacterium bovis</i>	Virus paragripal 1, 2, 3, 4
<i>Staphylococcus equorum</i>	SCoN	<i>Corynebacterium flavescens</i>	Human metapneumovirus
<i>Staphylococcus felis</i>	SCoN	<i>Corynebacterium genitalium</i>	Virus del sarampión
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	SCoN	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Virus de la parotiditis
<i>Staphylococcus hyicus</i>	SCoP	<i>Enterococcus faecalis</i>	Virus respiratorio sincicial
<i>Staphylococcus intermedius</i>	SCoP	<i>Enterococcus flavescens</i>	Rinovirus
<i>Staphylococcus kloosii</i>	SCoN	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
<i>Staphylococcus lentus</i>	SCoN	<i>Enterococcus hirae</i>	
<i>Staphylococcus pulvereri</i>	SCoN	<i>Escherichia coli</i>	
<i>Staphylococcus simulans</i>	SCoN	<i>Klebsiella oxytoca</i>	
<i>Staphylococcus warneri</i>	SCoN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Staphylococcus xylosum</i>	SCoNSM	<i>Listeria monocytogenes</i>	
		<i>Micrococcus luteus</i>	
		<i>Moraxella catarrhalis</i>	
		<i>Pasteurella aerogenes</i>	
		<i>Proteus mirabilis</i>	
		<i>Proteus vulgaris</i>	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
		<i>Salmonella typhimurium</i>	
		<i>Serratia marcescens</i>	
		<i>Shigella sonnei</i>	
		<i>Streptococcus mitis</i>	
		<i>Streptococcus salivarius</i>	
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	
		<i>Candida albicans</i>	
		<i>Candida glabrata</i>	
		<i>Cryptococcus neoformans</i>	
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
		<i>Legionella pneumophila</i>	
		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
		<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
		<i>Neisseria meningitidis</i>	
		<i>Streptococcus mutans</i>	
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
		<i>Streptococcus pyogenes</i>	
		<i>Homo sapiens</i>	

SCoN: *Staphylococcus coagulasa* negativo.

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

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

SCoP: *Staphylococcus coagulasa* positivo.

Reproducibilidad con material de referencia certificado

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

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

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con material de referencia certificado				
ID de la muestra	Contenido	Concentración de la muestra ufc/mL	Resultado esperado	Resultado real
MRSADNA10-04	SARM	1×10 ⁸	Detectado con frecuencia	Detectado
MRSADNA10-03	SARM	5×10 ⁷	Detectado con frecuencia	Detectado
MRSADNA10-01	SARM	5×10 ⁶	Detectado con frecuencia	Detectado
MRSADNA10-09	SARM	5×10 ⁵	Detectado con frecuencia	Detectado
MRSADNA10-08	SARM	5×10 ⁵	Detectado con frecuencia	Detectado
MRSADNA10-02	SARM	5×10 ⁵	Detectado	Detectado
MRSADNA10-05	SASM	5×10 ⁶	Negativo para SARM	Negativo para SARM Positivo para SA
MRSADNA10-06	SASM	1×10 ⁷	Negativo para SARM	Negativo para SARM Positivo para SA
MRSADNA10-07	SASM	5×10 ⁶	Negativo para SARM	Negativo para SARM Positivo para SA
MRSADNA10-12	SCoNRM	1×10 ⁷	Negativo	Negativo
MRSADNA10-10	<i>E. coli</i>	5×10 ⁶	Negativo	Negativo
MRSADNA10-11	MHOnly	-	Negativo	Negativo

Todas las muestras se detectaron correctamente.

Arrastre/Contaminación cruzada

Se realizó un estudio analítico para evaluar el potencial de contaminación cruzada entre muestras de SARM de alta concentración (1×10⁷ ufc/mL) y muestras negativas a lo largo de todo el flujo de trabajo del producto «MRSA/SA ELiTe MGB® Kit». Dos operarios realizaron 24 series de extracción de muestras (11 muestras de SARM de alta concentración, 11 muestras negativas, 1 muestra de control positiva y 1 muestra de control negativa por serie) en un patrón de damero (muestras de SARM de alta concentración interrumpidas por muestras completamente negativas). A continuación, las muestras procesadas se amplificaron en cinco series independientes utilizando dos patrones de damero diferentes. El análisis de contaminación cruzada dio lugar a cero falsos negativos de 55 muestras positivas para SARM de alta concentración y una muestra falsa positiva de 55 muestras negativas.

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

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

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

García-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_{LAGA251}*. Clin Microbiol Infect 2012; 18:395-400.

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

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Utilizar este producto únicamente en combinación con el sistema de extracción de ácidos nucleicos y los instrumentos de PCR en tiempo real recomendados.

Utilizar este producto únicamente con ADN extraído de exudados nasales humanos.

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

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

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

Dada su alta sensibilidad analítica, el método de amplificación en tiempo real utilizado en este producto es propenso a desarrollar contaminación cruzada con las muestras clínicas positivas para SA o SARM, los controles positivos y los productos de la propia amplificación. La contaminación cruzada da lugar a resultados falsos positivos. El formato del producto puede limitar la contaminación cruzada. No obstante, esta solo puede evitarse procediendo conforme a las prácticas correctas de laboratorio y siguiendo estrictamente estas instrucciones de uso.

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

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

Con el fin de evitar resultados incorrectos, este producto debe ser manipulado por personal debidamente formado y cualificado en técnicas de biología molecular, como la extracción, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos.

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

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, este producto requiere el uso de ropa de trabajo e instrumentos especiales para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación.

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

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

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

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

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

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

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

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

Los resultados deben interpretarse en combinación con otras pruebas analíticas y otros datos clínicos de los que disponga el médico y, además, deben utilizarse como complemento a los esfuerzos para controlar las infecciones hospitalarias e identificar a pacientes que precisan precauciones especiales.

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

ADN diana no detectado en la reacción del control positivo	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	Distribuir con cuidado los reactivos en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo. Revisar los volúmenes de la mezcla de reacción distribuida. Comprobar los volúmenes del control positivo distribuido.
Degradación de la sonda.	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla de reacción.
Degradación del estándar.	Utilizar una nueva alícuota de control positivo.
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la configuración del instrumento para las reacciones del control positivo. Comprobar la configuración del instrumento para el ciclo térmico.

ADN diana detectado en la reacción del control negativo	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	Evitar derramar el contenido de la probeta de la muestra. Cambiar siempre las puntas entre una muestra y otra. Distribuir con cuidado las muestras, el control negativo y el control positivo en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo.
Error al configurar el instrumento.	Comprobar la configuración de las posiciones de las muestras, del control negativo y del control positivo en el instrumento.
Sellado incorrecto de la microplaca.	Prestar atención al sellar la microplaca.
Contaminación del agua de calidad para biología molecular	Utilizar una nueva alícuota de agua de calidad para biología molecular.
Contaminación de la mezcla de reacción.	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla de reacción.
Contaminación del área de extracción/preparación para las reacciones de amplificación.	Limpiar las superficies y los instrumentos con detergentes acuosos, lavar las batas de laboratorio y sustituir las probetas y las puntas utilizadas.

Fluorescencia de fondo irregular o alto en las reacciones	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta o mezcla insuficiente de la muestra.	Mezclar con cuidado, pipeteando tres veces las muestras, el control negativo y el control positivo en la mezcla de reacción. Evitar la creación de burbujas durante el paso de distribución de la muestra.

SÍMBOLOS

-  Número de catálogo
-  Límite superior de temperatura
-  Código de lote
-  Fecha de caducidad (último día del mes)
-  Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*
-  Cumple los requisitos de la Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*.
-  Contenido suficiente para «N» análisis.
-  Atención: Consúltense las instrucciones de uso.
-  Contenido
-  Fabricante

AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

Los reactivos de detección ELITe MGB® están cubiertos por una o varias patentes de EE. UU., 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, 9,169,256, así como por patentes europeas, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 y por solicitudes de patentes actualmente pendientes.

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

«ELITe MGB» y el logotipo de «ELITe MGB» son marcas registradas en la Unión Europea.

ELITe InGenius® es una marca comercial registrada de ELITechGroup.

NucliSENS® y easyMAG® son marcas registradas de bioMérieux SA.

eNAT™ es una marca registrada de COPAN Italia S.p.A.

