

## RIDA® GENE MRSA

**REF** PG0605



## 1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica *in vitro*. RIDA®GENE MRSA, eseguito sul LightCycler® 480 II Roche, è un test di PCR multiplex in tempo reale per la determinazione qualitativa diretta del DNA di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) e di *Staphylococcus aureus* sensibile alla meticillina (MSSA) in tamponi nasofaringei umani non trattati, tamponi di ferite e colture di soggetti che mostrano segni e sintomi di infezione causata da MRSA.

Il test RIDA®GENE MRSA ha lo scopo di supportare la diagnosi di infezioni da stafilococco (*Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensibile alla meticillina (MSSA)) in pazienti che presentano sintomi di infezione causata da MRSA, in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

I risultati negativi non escludono l'infezione da stafilococco (*Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensibile alla meticillina (MSSA)) e non devono essere usati come unico elemento di diagnosi.

Il prodotto è destinato all'uso da parte di professionisti che lavorano in laboratori ospedalieri, laboratori di riferimento, privati o pubblici.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

Gli stafilococchi sono diffusi come colonizzatori naturali della pelle e della mucosa dell'orofaringe nell'uomo e negli animali. Sono classificati in stafilococchi coagulasi-positivi (*S. aureus*) e coagulasi-negativi (ad esempio, *S. epidermidis*). Lo *Staphylococcus aureus* è uno degli agenti patogeni più significativi delle infezioni nosocomiali negli ospedali e in altre strutture sanitarie.<sup>1,2</sup> L'agente patogeno si trasmette attraverso il personale medico o altri pazienti. Si stima che il 30% della popolazione sana sia colonizzata da *S. aureus* (portatori asintomatici). Lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) è una delle cause più frequenti di infezioni nosocomiali in tutto il mondo (MRSA contratto in ospedale, altrimenti detto HA-MRSA). Oltre alle infezioni contratte in ospedale, esistono anche infezioni da MRSA acquisite in comunità (CA-MRSA) che possono essere contratte fuori dalle strutture ospedaliere.<sup>3,4</sup> Negli ultimi anni sono emerse anche infezioni da MRSA associate con il bestiame, o LA-MRSA, soprattutto nel settore degli animali da ingrasso e in particolare tra gli allevatori di suini.<sup>5,6</sup> La resistenza alla meticillina (oxacillina) di *S. aureus* è mediata dalla proteina legante la penicillina PBP2a, codificata dal gene cromosomico *mecA*. Il gene *mecA* si trova nell'elemento *mec* della cassetta cromosomica stafilococcica SCC*mec*. Ad oggi, sono stati descritti 14 tipi di cassette SCC*mec*, di cui i tipi da I a V sono i più frequenti.<sup>3,7,8</sup> La cassetta SCC*mec* tipo XI (SCC*mec* XI), che contiene un altro omologo di *mecA* (chiamato anche *mecC* o *meCLGA251*, è stata descritta per la prima volta nel 2011. Il gene *mecC* ha solo un'omologia nucleotidica del 70% con *mecA* e non è rilevabile

utilizzando le normali PCR specifiche per *mecA* e i test di agglutinazione per la PBP2a. È stato descritto in isolati di *S. aureus* umani e bovini.<sup>9</sup>

A differenza delle infezioni da MSSA (*Staphylococcus aureus* sensibile alla meticillina), le infezioni da MRSA sono associate a un'elevata morbilità e mortalità, a degenze prolungate e maggiori costi terapeutici.<sup>10,11</sup> I fattori di rischio per l'infezione da MRSA nelle strutture sanitarie sono il contatto con pazienti con un'infezione da MRSA, una storia nota di MRSA, la durata della degenza e la terapia antibiotica a lungo termine.<sup>12</sup>

Ogni infezione da MRSA genera fino a 10.000 dollari di costi aggiuntivi.<sup>13</sup> Nell'Unione europea, più di 150.000 pazienti ricoverati contraggono un'infezione da MRSA. La stima dei costi ospedalieri a carico del sistema sanitario europeo arriva a 380 milioni di euro.<sup>14</sup>

Uno screening precoce, rapido e sistematico dell'MRSA permette di trattare in modo specifico i pazienti infetti e di introdurre metodi igienici appropriati per prevenirne la trasmissione e la diffusione.

Usando i metodi di coltura convenzionali, per rivelare l'MRSA sono necessarie da 48 a 72 ore. I test di PCR real-time consentono uno screening rapido e tempestivo dell'MRSA il giorno del ricovero nel quadro di un programma di prevenzione delle infezioni (strategia "search and destroy").<sup>15</sup>

### 3. Principio del test

RIDA®GENE MRSA è un test di PCR multiplex real-time per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione tra *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) e *Staphylococcus aureus* sensibile alla meticillina (MSSA) in colture di campioni da tamponi nasofaringei e nasali umani. Dopo aver isolato il DNA, si amplificano i frammenti genici specifici (se presenti) di MRSA (il gene *mecA/mecC*-, la giunzione *SCCmec/orfX* e il gene *SA442*). Le sequenze target amplificate vengono rivelate con sonde a idrolisi etichettate con un quencher a un'estremità e un colorante reporter fluorescente (fluoroforo) all'altra estremità. In presenza di una sequenza target le sonde ibridano con l'amplicone. Durante l'estensione, la **Taq-Polymerase** separa il reporter dal quencher. Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA®GENE MRSA contiene **Internal Control DNA** (ICD) per controllare la preparazione del campione e/o qualsiasi potenziale inibizione della PCR.

#### 4. Contenuto della confezione

**Tabella 1:** Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1100 µl	Giallo
2	Taq Polymerase	1x	11 µl	Rosso
D	Internal Control DNA	2x	1800 µl	Marrone
L	Lysis Buffer 1	2x	12 ml	Incolore
N	PCR Water	1x	500 µl	Bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	Blu

#### 5. Istruzioni di conservazione

- Tutti i reagenti devono essere conservati lontano dalla luce a una temperatura di -20 °C, e prima dell'apertura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- Tutti i reagenti devono essere scongelati con cura prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2-8 °C).
- Il congelamento/scongelo ripetuto fino a 15 volte non influisce sulla proprietà del test (se necessario, creare aliquote dopo il primo scongelamento e ricongelare i reagenti immediatamente).
- Raffreddare adeguatamente tutti i reagenti durante la preparazione della PCR (da 2 a 8 °C).

## 6. Reagenti necessari ma non in dotazione

Il test di PCR multiplex real-time RIDA®GENE MRSA può essere utilizzato con i seguenti dispositivi per PCR real-time:

**Tabella 2:** Attrezzatura necessaria

Strumenti di PCR real-time	
Roche	LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™

Prima di utilizzare altri strumenti per la PCR real-time contattare R-Biopharm all'indirizzo [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de) per verificarne la compatibilità.

- Sistema di raccolta di tamponi sterili (ad esempio, eSwab®, Copan Diagnostic Inc.)
- RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) per LightCycler® 480II
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, cuvette di reazione, pellicole)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione o piastre
- Agitatore a vortice
- Thermoshaker
- Pipette (0,5-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- Puntali per pipette con filtri
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (priva di nucleasi)

## 7. Avvertenze e misure precauzionali

- Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.
- Nell'esecuzione del test, attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso.
- Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Evitare il contatto con lesioni cutanee e mucose.
- Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test.
- Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.
- Assicurarsi che l'estrazione, la preparazione della PCR e la PCR avvengano in locali separati per evitare contaminazioni incrociate.
- I campioni clinici devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere smaltiti in modo appropriato, come tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi.
- Dopo la data di scadenza smaltire il kit.

- Gli operatori sono responsabili del corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

Per ulteriori dettagli, consultare le schede dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Raccolta e conservazione dei campioni

### 8.1 Preparazione del DNA da tamponi

Per isolare il DNA dai tamponi si raccomanda il metodo illustrato di seguito:  
Aggiungere 200 µl di tampone di lisi 1 in una cuvetta di preparazione. Immergere la punta del tampone nel tampone di lisi 1 pipettato in precedenza e spezzare o tagliare il bastoncino. Se si usano tamponi con terreno di trasporto, è possibile aggiungerne 100 µl ai 200 µl di tampone di lisi e procedere con il trattamento. Sigillare ermeticamente la provetta di preparazione e agitare vigorosamente per 60 secondi. Riscaldare per 10 minuti a 95 °C in un modulo riscaldante continuando ad agitare. Centrifugare per 1 minuto a 13.000 x g e usare il surnatante come campione.

**Nota:** Ripetere se il preparato diventa molto opaco durante la centrifugazione.

Il test RIDA®GENE MRSA contiene un **Internal Control DNA** che indica l'inibizione potenziale della PCR, verifica l'integrità dei reagenti e conferma l'avvenuta estrazione dell'acido nucleico. L' **Internal Control DNA** può essere utilizzato come controllo di inibizione oppure come controllo di estrazione per la preparazione del campione e controllo di inibizione.

Se l' **Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione, è necessario aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix di ogni reazione (vedere la Tabella 4).

Se l' **Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, è necessario aggiungere 20 µl di **Internal Control DNA** per ogni campione durante l'estrazione. L' **Internal Control DNA** deve essere aggiunto alla miscela di campione/tampone di lisi e **non** direttamente al materiale del campione. Raccomandiamo di pipettare 1 µl di **Internal Control DNA** per reazione alla PCR Mix del controllo negativo e del controllo positivo.

### 8.2 Preparazione del DNA da campioni in coltura

Il metodo di isolamento illustrato di seguito è raccomandato per isolare il DNA dai campioni in coltura: Aggiungere 200 µl di tampone di lisi 1 in una cuvetta di preparazione. Usando un'ansa da inoculo, raccogliere diverse colonie e sospenderle nel tampone di lisi 1 pipettato in precedenza. Spezzare o tagliare il bastoncino dell'ansa da inoculo. Sigillare ermeticamente la provetta di preparazione e agitare vigorosamente per 60 secondi. Riscaldare per 10 minuti a 95 °C in un modulo

riscaldante continuando ad agitare. Centrifugare per 1 minuto a 13.000 x g e usare il surnatante come campione.

**Nota:** Ripetere se il preparato diventa molto opaco durante la centrifugazione.

Il test RIDA®GENE MRSA contiene un **Internal Control DNA** che indica l'inibizione potenziale della PCR, verifica l'integrità dei reagenti e conferma l'avvenuta estrazione dell'acido nucleico. L' **Internal Control DNA** può essere utilizzato come controllo di inibizione oppure come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione.

Se l' **Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione, è necessario aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix di ogni reazione (vedere la Tabella 4).

Se l' **Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, è necessario aggiungere 20 µl di **Internal Control DNA** per ogni campione durante l'estrazione. L' **Internal Control DNA** deve essere aggiunto alla miscela di campione/tampone di lisi e **non** direttamente al materiale del campione. Raccomandiamo di pipettare 1 µl di **Internal Control DNA** per reazione alla PCR Mix del controllo negativo e del controllo positivo.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1 Preparazione della Master Mix

Per la PCR è necessario calcolare il numero totale di reazioni (campioni e reazioni di controllo). Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

L'aggiunta di un ulteriore 10% di volume alla Master Mix è consigliata per compensare la perdita della pipetta (vedere Tabella 3 e Tabella 4). Prima dell'uso, scongelare, mescolare e centrifugare brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq polymerase**, il **Positive Control**, la **PCR Water** e l' **Internal Control DNA**. Raffreddare adeguatamente i reagenti durante le fasi di lavoro (2-8 °C).

**Tabella 3:** Esempio di calcolo e produzione della Master Mix per 10 reazioni (estrazione di ICD e controllo di inibizione)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10%)
1	Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq polymerase	0,1 µl	1,1 µl
	<b>Totale</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mescolare la Master Mix e quindi centrifugare per breve tempo.

**Tabella 4:** Esempio di calcolo e produzione della Master Mix per 10 reazioni (ICD solo come controllo di inibizione)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10 %)
1	Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq polymerase	0,1 µl	1,1 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	<b>Totale</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Mescolare la Master Mix e quindi centrifugare per breve tempo.



## 9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (cuvetta o piastra).

**Controllo negativo:** Aggiungere 5 µl di **PCR Water** alla Master Mix pipettata in precedenza.

**Nota:** Si consiglia di pipettare 1 µl di **Internal Control DNA** nella PCR Mix per il controllo negativo quando si utilizza l' **Internal Control DNA** come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione.

**Campioni:** Aggiungere 5 µl di eluato nella Master Mix pipettata in precedenza.

**Controllo positivo:** Aggiungere 5 µl di **Positive Control** alla Master Mix pipettata in precedenza.

**Nota:** Si consiglia di pipettare 1 µl di **Internal Control DNA** nella PCR Mix per il controllo positivo quando si utilizza l' **Internal Control DNA** come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione.

Chiudere le cuvette o le piastre di reazione, centrifugare brevemente a bassa velocità e trasferire nello strumento di PCR real-time. Avviare la PCR in base alle impostazioni dello strumento usato (vedere Tabella 5 e Tabella 6).

## 9.3 Impostazione dello strumento di PCR

### 9.3.1 Profilo PCR real-time per DNA

**Tabella 5:** Profilo della PCR real-time del DNA per il LightCycler® 480II

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura/velocità di rampa	Durata di conservazione

**Nota:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

**Tabella 6:** Profilo PCR real-time DNA per Mx3005P, ABI 7500 e CFX96™

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
PCR Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura/velocità di rampa	Durata di conservazione

**Nota:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

#### 9.4 Impostazione del canale di rivelazione

**Tabella 7:** Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento di PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Commento
Roche LightCycler® 480II	Giunzione SCCmec/orfX	465/510	<b>È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)</b>
	ICD	533/580	
	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	533/610	
	mecA/mecC	618/660	
Agilent Technologies Mx3005P	Giunzione SCCmec/orfX	FAM	<b>Impostare il colorante di riferimento su none (nessuno).</b>
	ICD	HEX	
	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	ROX	
	mecA/mecC	Cy5	
ABI 7500	Giunzione SCCmec/orfX	FAM	<b>Impostare il colorante di riferimento passivo ROX su none (nessuno).</b>
	ICD	VIC	
	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	ROX	
	mecA/mecC	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	Giunzione SCCmec/orfX	FAM	-
	ICD	VIC	
	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	ROX	
	mecA/mecC	Cy5	

## 10. Controllo qualità

I campioni vengono valutati utilizzando il software di analisi dello strumento di PCR real-time in base alle istruzioni del produttore. Il controllo negativo e il controllo positivo devono mostrare i risultati corretti (vedere la Tabella 8, Figura 1, Figura 2 e Figura 3).

Il **Positive Control** arriva a una concentrazione di  $10^3$  copie per  $\mu\text{l}$ . Viene utilizzato in una quantità totale di  $5 \times 10^3$  copie in ogni esecuzione di PCR.

**Tabella 8:** Un ciclo di PCR valido deve soddisfare le seguenti condizioni:

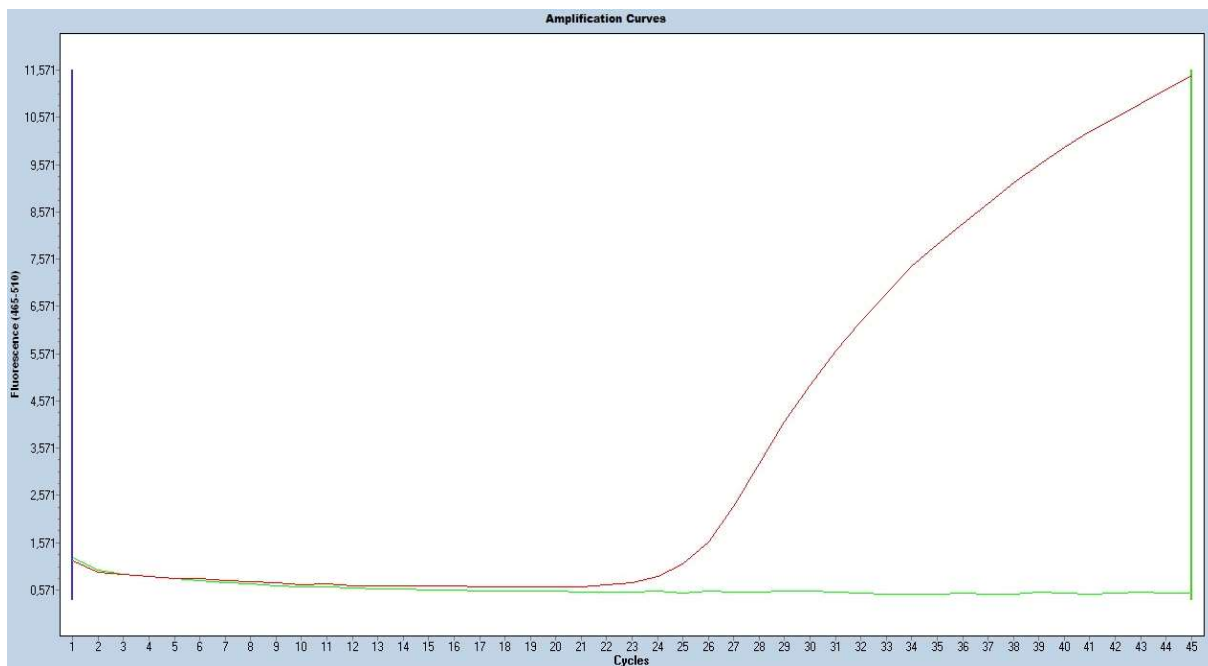
Campione	Risultato	Ct ICD	Gene Ct target
Controllo positivo	Positivo	N/A *1	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct >20	Non rivelabile

*\*1 Un valore Ct per l'ICD non è essenziale per ottenere un risultato positivo per il controllo positivo.*

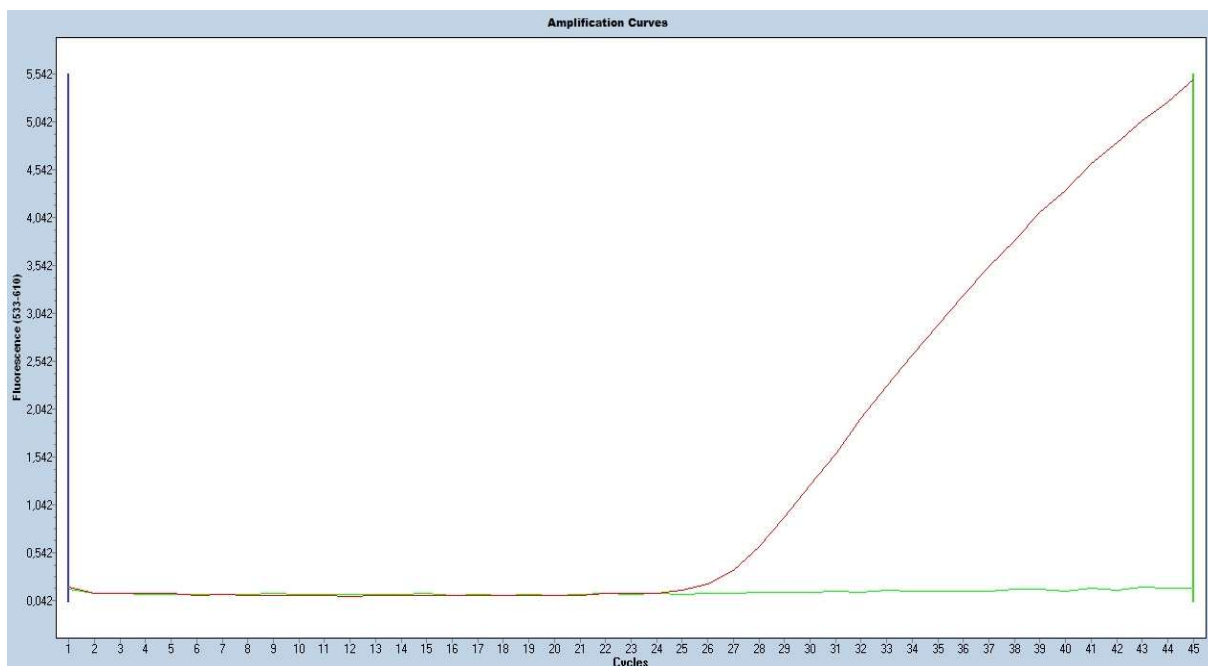
I controlli positivi e negativi sono validi quando soddisfano le condizioni specificate nella tabella. L'intervallo Ct per il controllo positivo è specificato nel Certificato di garanzia di qualità accluso al prodotto. Se uno dei due controlli non soddisfa le condizioni per un'esecuzione valida, è necessario analizzare nuovamente tutte le reazioni, compresi i controlli.

Se i valori specificati non sono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare quanto segue:

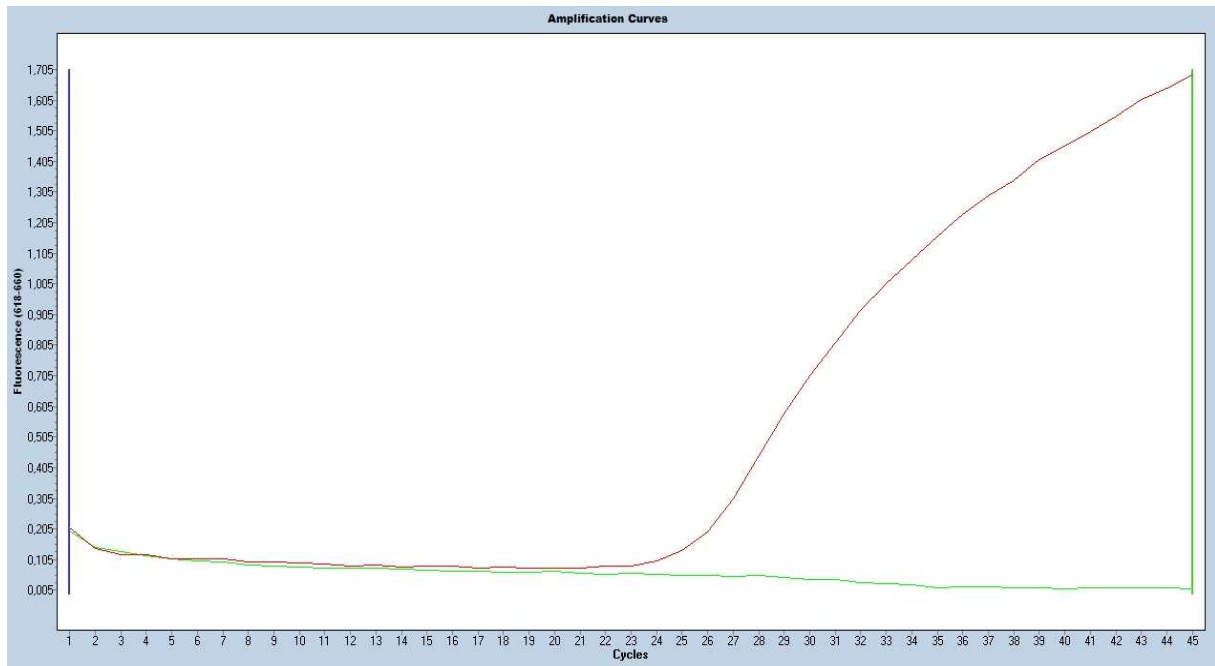
- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata
- Procedura di esecuzione del test corretta



**Figura 1:** Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e del controllo negativo (verde) (giunzione SCCmec/orfX) sul LightCycler® 480II



**Figura 2:** Esecuzione corretta del controllo SA442 positivo (rosso) e del controllo negativo (verde) (SA442 (*S.aureus*)) sul LightCycler® 480II



**Figura 3:** Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e del controllo negativo (verde) (*mecA/mecC*) sul LightCycler® 480II

## 11. Interpretazione del campione

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 9.

**Tabella 9:** Interpretazione del campione

Rivelazione di			ICD	Risultato
Giunzione SCCmec/orfX	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	mecA/mecC		
positivo	positivo	positivo	positivo / negativo	<b>MRSA*</b> rivelabile (vedere Limiti del metodo al punto 8)
positivo	positivo	negativo	positivo / negativo	<b>MRSA non rivelabile; MSSA**</b> rivelabile (vedere Limiti del metodo al punto 7)
negativo	positivo	negativo	positivo / negativo	<b>MSSA</b> rivelabile
negativo	negativo	positivo	positivo / negativo	<b>MRSA non rivelabile</b> (vedere Limiti del metodo al punto 9)
negativo	positivo	positivo	positivo / negativo	<b>MRSA non rivelabile; MSSA</b> rivelabile (vedere Limiti del metodo al punto 8)
positivo	negativo	positivo	positivo / negativo	<b>MRSA non rivelabile</b> (vedere Limiti del metodo al punto 7)
negativo	negativo	negativo	positivo	<b>Gene target non rivelabile</b>
negativo	negativo	negativo	negativo	<b>Non valido</b>
positivo	negativo	negativo	positivo / negativo	<b>MRSA e MSSA non rivelabili</b> (vedere Limiti del metodo al punto 7)

\* MRSA = *S. aureus* resistente alla meticillina

\*\* MSSA = *S. aureus* sensibile alla meticillina

Un campione viene valutato positivo se il DNA del campione e l' **Internal Control DNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Un campione viene valutato positivo anche se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma non è possibile trovare segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione per l' **Internal Control DNA**. In questo caso non è necessario

rilevare l' **Internal Control DNA** perché elevate concentrazioni dell'amplicone possono rendere debole o assente il segnale dell' **Internal Control DNA**.

Un campione viene valutato negativo se il DNA del campione non mostra un segnale di amplificazione, ma nel sistema di rivelazione si può individuare un segnale di amplificazione per l' **Internal Control DNA**. Un'inibizione della reazione PCR può essere esclusa dalla rivelazione dell' **Internal Control DNA**.

Un campione non è valido se il DNA del campione e l' **Internal Control DNA** non mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione contiene inibitori della PCR o si è verificato un errore durante il processo di estrazione. Il campione estratto deve essere diluito 1:10 con acqua per PCR e nuovamente amplificato oppure è necessario migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

## 12. Limiti del metodo

1. Questo test è idoneo solo per i campioni da tampone e da coltura descritti.
2. Procedure inadeguate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni al di sotto della sensibilità analitica del test possono produrre falsi negativi.
3. L'uso dei metodi di screening di MRSA basati sulla PCR è soggetto alle linee guida specifiche di ogni Paese. L'utente è tenuto ad applicare e rispettare queste linee guida. Per esempio, secondo la Commissione KRINKO in Germania, i metodi di screening basati sulla PCR devono essere considerati provvisori fino a ottenimento dei risultati definitivi della coltura. Tuttavia, possono comunque essere utilizzati come fondamento provvisorio di una politica di igiene ospedaliera.
4. In letteratura sono descritti 14 tipi di SCCmec. Il test di PCR multiplex real-time RIDA<sup>®</sup>GENE MRSA può rivelare i tipi di SCCmec I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X e XI. RIDA<sup>®</sup>GENE MRSA potrebbe non rivelare altri tipi di SCCmec e produrre risultati falsi negativi.
5. La presenza di inibitori della PCR può condurre a risultati non valutabili.
6. Mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono interferire con la rivelazione di varianti nuove o sconosciute e possono portare a risultati falsi negativi utilizzando RIDA<sup>®</sup>GENE MRSA.
7. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, concentrazioni estremamente basse delle sequenze target, sotto il limite di rivelazione (LoD), possono essere rivelate, ma i risultati ottenuti non sono sempre riproducibili.
8. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Un risultato positivo indica l'esistenza dei geni bersaglio corrispondenti (gene *mecA/mecC*, giunzione SCCmec/*orfX* e gene SA442).
9. Per i campioni LoD il segnale potrebbe non presentarsi in tutti i canali, anche se il campione è positivo a MRSA.

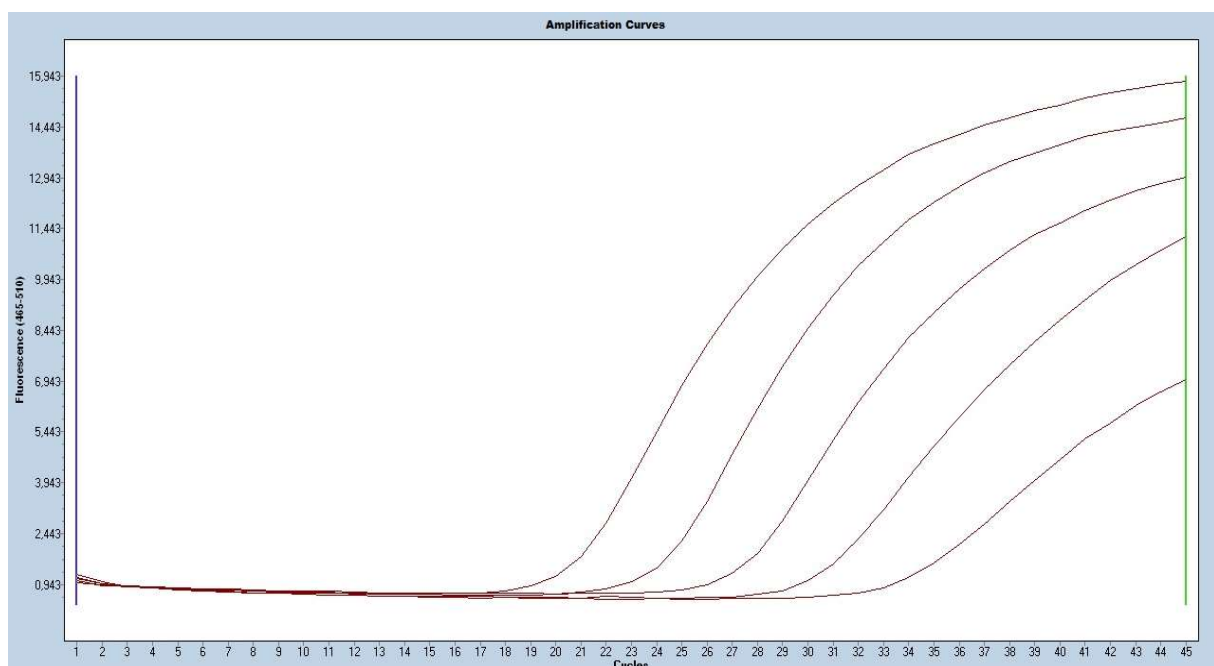
10. Data l'evidenza del gene della resistenza, potrebbe trattarsi di un'infezione mista da MSSA (*S. aureus* sensibile alla meticillina) e CoNS(stafilococchi coagulasi-negativi) .
11. Se viene rivelato solo il gene della resistenza *mecA/mecC*, l'MRSA non è rivelabile. Tuttavia, se il gene della resistenza viene rivelato, potrebbe sussistere un'infezione da stafilococco coagulasi-negativo, in quanto anch'esso può avere il gene della resistenza *mecA/mecC*.
12. A una concentrazione testata del 2,1% e superiore, ProntOral collutorio (poliesanide) mostra un effetto inibitorio.
13. A una concentrazione testata del 2,1% e superiore, Prontoderm gel nasale (poliesanide) mostra un effetto inibitorio.
14. A una concentrazione testata dell'1,5% e superiore, il sangue umano mostra un effetto inibitorio.
15. A partire da una quantità testata di 6 mg, il terreno COS agar ha un effetto inibitorio.

### 13. Prestazioni e caratteristiche

#### 13.1 Sensibilità analitica

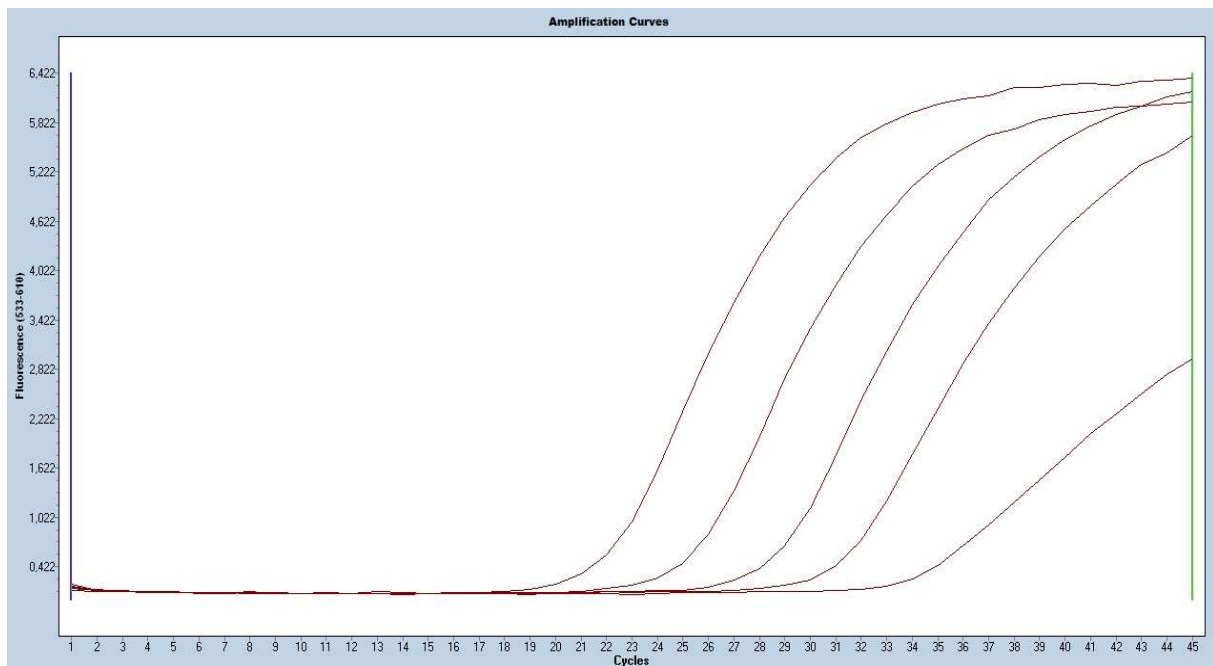
Il test di PCR multiplex real-time RIDA®GENE MRSA ha un limite di rivelazione  $\geq 10$  copie di DNA per reazione per la giunzione SCCmec/orfX, il gene *mecA/mecC* e il gene SA442 (*S. aureus*).

Le Figure 4, 5, 6 e 7 di seguito mostrano le serie di diluizioni della giunzione SCCmec/orfX, del gene *mecA/mecC* e del gene SA442 (*S. aureus*) (In ogni caso,  $10^5$ - $10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler® 480II.

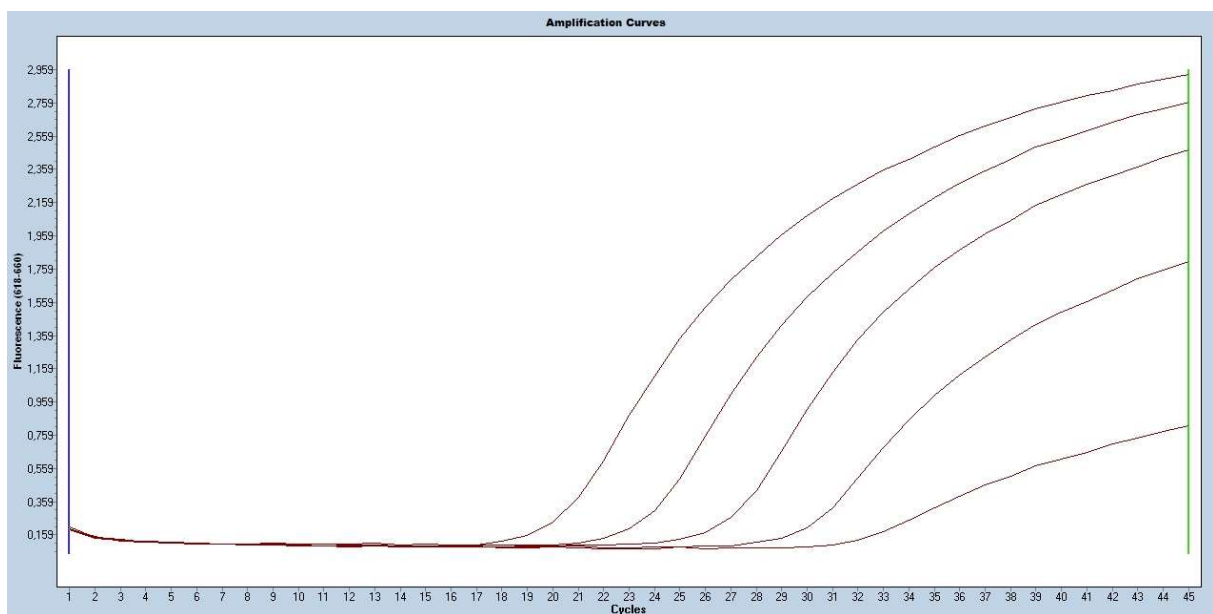


**Figura 4:** Serie di diluizioni della giunzione SCCmec/orfX ( $10^5$ - $10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler® 480II





**Figura 5:** Serie di diluizioni del gene SA442 specifico di *S. aureus* ( $10^5$ - $10^1$  copie di DNA per  $\mu$ l) sul LightCycler® 480II



**Figura 6:** Serie di diluizioni del gene *mecA/mecC* ( $10^5$ - $10^1$  copie di DNA per  $\mu$ l) sul LightCycler® 480II

Il limite di rivelazione dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA e dal contenuto di DNA.

## 13.2 Specificità analitica

La specificità analitica dei test RIDA®GENE MRSA è stata valutata utilizzando un panel di specie non stafilococciche, stafilococchi coagulasi-negativi sensibili alla meticillina (MScONS) e stafilococchi coagulasi-negativi resistenti alla meticillina (MRcONS). Non sono state rivelate reattività crociate con le seguenti specie (vedere Tabella 10):

**Tabella 10:** Test di reattività crociata

Specie non stafilococciche					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Acinetobacter iwofii</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>		<i>Candida glabrata</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>E. coli (O157:H7)</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	<i>Streptococcus mitis</i>	-	<i>Streptococcus mutans</i>	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-		
Stafilococchi coagulasi-negativi sensibili alla meticillina					
<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. hominis</i>	-	<i>S. warneri</i>	-
Stafilococchi coagulasi-negativi resistenti alla meticillina					
<i>S. haemolyticus</i>	-	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>	-

### 13.3. Sostanze interferenti

La presenza di inibitori della RT-PCR e sostanze interferenti può portare a risultati falsi negativi o non validi. Analogamente, sono stati studiati gli effetti di diverse sostanze che potrebbero essere presenti in quanto ampiamente utilizzate nelle infezioni del tratto respiratorio o a causa della loro presenza diffusa nei campioni corrispondenti. Effetti inibitori alle concentrazioni testate sono stati osservati (vedere Limiti del metodo) per le sostanze ProntOral collutorio (poliesanide), sangue umano, Prontoderm gel nasale (poliesanide) e COS agar. Non sono state individuate interferenze per le altre sostanze elencate (Tabella 11 e Tabella 12):

**Tabella 11:** Elenco delle sostanze e delle concentrazioni usate nel test (campioni da tampone)

Sostanza/Additivo	Concentrazione
RatioAllerg (beclometasone dipropionato)	10,0% (v/v)
Octenisan gel nasale (octenidina dicloridrato)	7,0% [p/v]
Mucina	5,0% (v/v)
Acyclovir (unguento)	0,5 % [p/v]
InfectoPyoderm (mupirocina)	1,80 % [p/v]
Tobramicina	0,0004 % [p/v]
FeniHydrocort (idrocortisone)	7,0 % [p/v]

**Tabella 12:** Elenco delle sostanze e delle concentrazioni usate nel test (coltura)










Sostanza/Additivo	Concentrazione
Agar MRSA	20 mg

## 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Sezione e denominazione
2/4/2016	Versione precedente
11/17/2020	Revisione generale: 1. Campo di applicazione 2. Sintesi e spiegazione del test 3. Principio del test 5. Istruzioni di conservazione 6. Reagenti necessari ma non in dotazione 8. Raccolta e conservazione dei campioni 9. Esecuzione del test 11. Interpretazione del campione 12. Limiti del metodo 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli 16. Bibliografia

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

	Usò per la diagnostica <i>in vitro</i>
	Leggere il foglio illustrativo
	Numero di lotto
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero di catalogo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici del test

Reaction Mix

Taq Polymerase

Internal Control DNA

No Template Control

Positive Control

Lysin Buffer 1

## 16. Bibliografia

1. Dulon M et al. MRSA prevalence in european healthcare settings: a review. BMC Infectious Diseases 2011, 11:138.
2. Köck R et al. The Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Germany. Dtsch Arztebl Int 2011, 108(45): 761-7.
3. Robert Koch Institut. Staphylokokken (MRSA). RKI-Ratgeber für Ärzte 2009.
4. Kuehnert MJ et al. Prevalence of Staphylococcus aureus Nasal Colonization in the United States, 2001–2002. JID 2006, 193: 172-179.
5. Golding GR et al. Livestock-associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Sequence Type 398 in Humans, Canada. EID 2010, 16(4): 587-594.
6. RKI 2011. Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2010. Epid. Bull. 26.
7. International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements 2011. [http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_HomeEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html).
8. Meng, X et al. Rapid Detection of mecA and femA Genes by Loop-Mediated Isothermal Amplification in a Microfluidic System for Discrimination of Different Staphylococcal Species and Prediction of Methicillin Resistance. Frontiers in microbiology. 2020, 11. Jg.
9. García-Álvarez, L et al. Meticillin-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.
10. Cosgrove SE et al. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2003, 36(1):53-59.

11. Cosgrove SE et al. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005, 26(2):166-174.
12. Jerningan JA et al. Prevalence of and Risk Factors for Colonization with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* at the Time of Hospital Admission. *Infect Control and Hosp Epidemiol.* 2003, 24 (6): 409-414.
13. Diller R et al. Evidence for cost reduction based on pre-admission MRSA screening in general surgery *Int J Hyg Environ Health* 2008; 211 (1-2): 205-212.
14. Köck R, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.* 2010, 15(41):19688.
15. Robicsek A et al. Universal Surveillance for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in 3 Affiliated Hospitals. *Ann Intern Med.* 2008, 148(6):409-418.