

AVVERTENZA del 13/10/2020

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«MRSA/SA ELITE MGB Kit» Ref. M800351

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Introduzione del riferimento del nuovo prodotto "ELITE InGenius Sonication tubes" (ref. INT032SON) da utilizzare in associazione al prodotto per la sonicazione del campione.*

Composizione, utilizzo e prestazioni del prodotto restano del tutto invariate.

NOTA BENE

	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

Reagente per l'amplificazione real time del DNA

REF M800351



SOMMARIO

USO PREVISTO	
SPIEGAZIONE DEL SAGGIO	
PRINCIPIO DEL SAGGIO	
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	
MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO	
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO	
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	
ELITE INGENIUS®	
CAMPIONI E CONTROLLI	
PROCEDURA	
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	
ALTRI SISTEMI	
CAMPIONI E CONTROLLI	
PROCEDURA	
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	
BIBLIOGRAFIA	
LIMITI DELLA PROCEDURA	
PROBLEMI E SOLUZIONI	
LEGENDA DEI SIMBOLI	
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	

pag. 1
pag. 2
pag. 2
pag. 4
pag. 4
pag. 4
pag. 5
pag. 6
pag. 7
pag. 7
pag. 8
pag. 14
pag. 17
pag. 17
pag. 19
pag. 24
pag. 28
pag. 28
pag. 29
pag. 30
pag. 31

USO PREVISTO

Il prodotto «MRSA/SA ELITe MGB® Kit» fa parte di un saggio qualitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la rivelazione di *Staphylococcus aureus* (SA) e di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA, incluso il ceppo mecC recentemente identificato) in campioni di DNA estratti da tamponi nasali e da emocolture.

Il prodotto ha lo scopo di facilitare la prevenzione e il controllo delle infezioni da MRSA in ambito sanitario. Ha lo scopo di diagnosticare le infezioni da MRSA, ma non di guidare né monitorare il trattamento delle infezioni da MRSA. Un risultato negativo non preclude la colonizzazione nasale da parte di MRSA/SA. È necessario realizzare in contemporanea colture cellulari da cui ottenere microrganismi per la tipizzazione epidemiologica o per ulteriori test di sensibilità.

MRSA / SA ELITe MGB® Kit

Reagente per l'amplificazione real time del DNA

REF M800351

SPIEGAZIONE DEL SAGGIO

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

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

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

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

PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio consiste in una reazione triplice di amplificazione real time effettuata con un termostato programmabile dotato di sistema ottico di rilevamento della fluorescenza.

La sonda per il gene specifico a SA si basa sulla tecnologia ELITe MGB®, è marcata con il fluoroforo AP554 (simile a TAMRA) ed è attivata quando si verifica un'ibridazione con il prodotto specifico della reazione di amplificazione di *Staphylococcus aureus*.

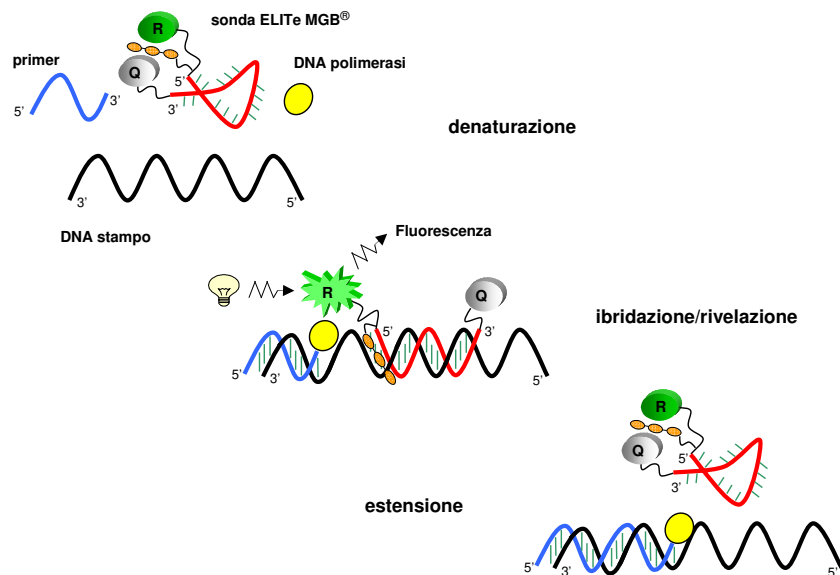
Le sonde per i geni *mecA* e *mecC* si basano sulla tecnologia ELITe MGB®, sono marcate con il fluoroforo FAM e sono attivate quando si verifica un'ibridazione con il prodotto specifico della reazione di amplificazione del gene per la resistenza agli antibiotici.

La sonda per il controllo interno si basa sulla tecnologia ELITe MGB®, è marcata con il fluoroforo AP642 (simile a Cy5) ed è attivata quando si verifica un'ibridazione con il prodotto specifico dell'amplificazione del controllo interno.

L'emissione della fluorescenza aumenta con l'aumentare dei prodotti specifici della reazione di amplificazione ed è misurata e registrata dallo strumento. L'elaborazione dei dati permette di determinare la presenza di DNA di MRSA o di SA nel campione di partenza.

Il saggio è stato validato con i sistemi descritti nel manuale.

Nella figura successiva è illustrato il meccanismo di attivazione e di emissione della fluorescenza della sonda con tecnologia ELITE MGB®. Si osservi che la sonda non viene idrolizzata durante il ciclo di amplificazione.



DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto «MRSA/SA ELITE MGB® Kit», fornisce la miscela di reazione completa e **pronta all'uso** MRSA/SA PCR Mix per l'amplificazione real time, **prealiquotata in quattro provette**. Ogni provetta contiene **540 µL** di soluzione, sufficienti per **24 test** in associazione con «ELITE InGenius®» e **25 test** in associazione agli altri sistemi.

Il primer e la sonda per il gene specifico allo *Staphylococcus aureus* (stabilizzata con il gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo AP554 (AquaPhlour® 554), simile a TAMRA, e smorzata con una molecola non fluorescente) sono specifici per una regione conservativa dello *Staphylococcus aureus* positivo alla coagulasi.

Il primer e le sonde per il gene *mecA* e *mecC* (stabilizzate con il gruppo MGB®, marcate con il fluoroforo FAM, e smorzate con una molecola non fluorescente) sono specifici per una regione conservativa dei *geni mecA* e *mecC*, che sono responsabili della resistenza alla meticillina e ad altri antibiotici betalattamici.

Il primer e la sonda per il controllo interno (stabilizzata con il gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo AP642, simile a Cy5 e smorzata con una molecola non fluorescente) sono specifici per un DNA plasmidico non infettivo contenente sequenze artificiali del **controllo interno**.

La miscela di reazione contiene anche soluzione tampone, cloruro di magnesio, nucleotidi trifosfati, il fluoroforo AP593 (simile a ROX) usato come riferimento passivo per normalizzare la fluorescenza, l'enzima uracil N-glicosidasi (UNG) per inattivare le contaminazioni da parte di prodotti di amplificazione e l'enzima DNA polimerasi ("hot start") ad attivazione termica.

Il prodotto consente di effettuare **96 test in associazione al sistema ELITE InGenius**, controlli compresi.

Il prodotto consente di effettuare **100 test in associazione agli altri sistemi**, controlli compresi.

MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione del pericolo
MRSA/SA PCR Mix	Miscela di reazione completa	4 x 540 µL	-

MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti monouso in nitrile senza polvere o simili.
- Miscelatore tipo vortex.
- Microcentrifuga da banco (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipette e puntali sterili per aerosol o a dispensazione positiva (2 - 20 µL, 5 - 50 µL, 50 - 200 µL, 200 - 1000 µL).
- Acqua per uso in biologia molecolare.
- Brodo tripticasi-soia.
- Thermal cycler programmabili con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza 7500 Fast Dx Real-Time PCR (Applied Biosystems®) e 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) calibrati in base alle istruzioni del fabbricante.

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I prodotti per la raccolta dei campioni e per l'estrazione del DNA dai campioni, il controllo interno di estrazione, il controllo positivo per l'amplificazione e i consumabili **non** sono inclusi nel prodotto.

Per raccogliere i campioni dei pazienti da utilizzare in associazione allo strumento «**ELiTe InGenius**» è necessario l'uso dei seguenti prodotti generici:

«**eSwab Collection Kit**» (Copan, codice 480CE) e «**eNAT™ kit**» (Copan, codice 608CS01R),

Per raccogliere i campioni dei pazienti da utilizzare in associazione allo strumento di estrazione «**NucliSENS® easyMAG®**» con lo strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR thermal cycler è raccomandato l'uso del prodotto generico «**BBL CultureSwab Plus Amies Gel without Charcoal swabs**» (Becton-Dickinson, codice 220116).

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione real time e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare sono richiesti lo strumento «**ELiTe InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT030) e i seguenti Assay protocols specifici:

- parametri per il controllo positivo di amplificazione «**MRSA-SA ELiTe_PC**» (ELITechGroup S.p.A.),
- parametri per il controllo negativo di amplificazione «**MRSA-SA ELiTe_NC**» (ELITechGroup S.p.A.),
- parametri per il campione in analisi «**MRSA-SA ELiTe_NS_200_50**» e «**MRSA-SA ELiTe_BC_200_100**» (ELITechGroup S.p.A.).

Per l'esecuzione automatica dei test con lo strumento «**ELiTe InGenius**» sono inoltre richiesti i seguenti prodotti generici:

- cartucce di estrazione «**ELiTe InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032SP200),
- materiali di consumo per estrazione ed amplificazione «**ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032CS),
- materiali di consumo per sonicazione («**ELiTe InGenius® Sonication tubes**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032SON),
- cartucce di amplificazione «**ELiTe InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR),
- puntali «**300 µL Universal Filter Tips**» (Axygen BioScience Inc., CA, codice TF-350-L-R-S),
- raccoglitore «**ELiTe InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000).

Per eseguire l'estrazione automatica del DNA dai campioni da testare, si raccomanda l'uso dei seguenti prodotti generici di estrazione degli acidi nucleici: «**NucliSENS® easyMAG® Strip for Premix**» (bioMérieux SA, codice 278303), «**bioHit Electronic Multichannel Pipettor**» (bioMérieux SA, codice 280141), «**Filter tips for bioHit**» (bioMérieux SA, codice 280146) e «**NucliSENS® easyMAG® Reagents**» (bioMérieux SA, codici 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135) da usare con lo strumento «**NucliSENS® easyMAG®**» (bioMérieux SA, codice 200111).

Come controllo interno di estrazione e di inibizione è richiesto l'impiego del prodotto generico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., codice CTRCPE), una soluzione stabilizzata contenente due DNA plasmidici e RNA genomico di fago MS2.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, si consiglia l'impiego dei prodotti generici «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., codice RTSACC02) micropiastre con pozzetti da 0,1 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento 7500 Real-Time PCR System, si consiglia l'impiego dei prodotti generici «**Q - PCR Microplates**» (ELITechGroup S.p.A., codice RTSACC01) micropiastre con pozzetti da 0,2 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Come controllo positivo dell'amplificazione del DNA plasmidico è richiesto il prodotto «**MRSA/SA – ELiTe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., codice M800356).

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Questo prodotto è riservato esclusivamente all'uso in vitro.

Avvertenze e precauzioni generali

Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Il materiale che viene a contatto con i campioni biologici deve essere trattato con ipoclorito di sodio al 3 % per almeno 30 minuti oppure trattato in autoclave a 121° C per un'ora prima di essere smaltito.

Manipolare e smaltire tutti i reagenti e i materiali usati per realizzare il saggio come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. I rifiuti devono essere trattati e smaltiti secondo le opportune regole di sicurezza. Il materiale monouso combustibile deve essere incenerito. I rifiuti liquidi contenenti acidi o basi devono essere neutralizzati prima dell'eliminazione.

Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi e la faccia.

Non pipettare a bocca alcuna soluzione.

Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree di lavoro.

Lavarsi bene le mani dopo avere maneggiato i campioni e i reagenti.

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

Leggere attentamente tutte le istruzioni fornite nel prodotto prima di eseguire il saggio.

Per l'esecuzione del saggio, seguire tutte le istruzioni fornite nel prodotto.

Non usare il prodotto dopo la data di scadenza indicata.

Utilizzare solo i reagenti presenti nel prodotto e quelli consigliati dal produttore.

Non usare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti provenienti da altri produttori.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

Le procedure di biologia molecolare, come l'estrazione, l'amplificazione e la rivelazione di acidi nucleici, richiedono personale addestrato e qualificato per evitare il rischio di risultati errati, in particolare a causa della degradazione degli acidi nucleici contenuti nei campioni o della contaminazione dei campioni da parte di prodotti di amplificazione.

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

Quando la sessione di amplificazione è allestita manualmente, è necessario disporre di camici, guanti e strumenti dedicati per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione. Non trasferire mai camici, guanti e strumenti dall'area destinata all'amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione all'area destinata all'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.

I campioni devono essere usati esclusivamente per questo tipo di analisi. I campioni devono essere manipolati sotto una cappa a flusso laminare. Provette contenenti campioni diversi non devono mai essere aperte contemporaneamente. Le pipette utilizzate per manipolare i campioni devono essere dedicate solo a questo uso. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per gli aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, esenti da DNasi ed RNasi, esenti da DNA ed RNA.

Le pipette utilizzate per manipolare i reagenti devono essere dedicate solo a questo uso. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per gli aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, esenti da DNasi ed RNasi, esenti da DNA ed RNA.

I prodotti di amplificazione devono essere manipolati in modo da limitarne al massimo la dispersione nell'ambiente per evitare la possibilità di contaminazioni. Le pipette utilizzate per manipolare i prodotti di amplificazione devono essere dedicate solo a questo uso.

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

MRSA/SA PCR Mix deve essere conservato al buio a -20 °C.

MRSA/SA PCR Mix può sostenere fino a **cinque cicli di congelamento/scongelamento**. ulteriori cicli di congelamento/scongelamento possono causare una riduzione delle prestazioni del prodotto.

ELiTe InGenius®

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto è validato per l'utilizzo con i seguenti campioni clinici:

Tamponi nasali

I tamponi nasali, utilizzati per l'estrazione del DNA devono essere raccolti utilizzando questi due sistemi:

«**eNAT™ kit**» (COPAN Italia S.p.A., codice 608CS01R) per l'estrazione del DNA ed identificati secondo le indicazioni del laboratorio. I tamponi nasali sono trasportati e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di 4 settimane. I campioni possono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di sei mesi oppure a -70 °C per tempi più lunghi. Prima dell'analisi con questo prodotto trasferire 0,2 mL di campione in medium eNAT™ nel tubo di sonicazione fornito con «**ELiTe InGenius Sonication tubes**».

«**eSwab Collection Kit**» (COPAN Italia S.p.A., ref. 480CE) per l'estrazione del DNA ed identificati secondo le indicazioni del laboratorio. I tamponi nasali sono trasportati e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni, e conservati a -20 °C per un massimo di sei mesi oppure a -70 °C per tempi più lunghi. Prima dell'analisi con questo prodotto trasferire 0,2 mL di campione in medium eSwab nel tubo di sonicazione fornito con «**ELiTe InGenius Sonication tubes**».

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di tampone rettale con **ELiTe InGenius®** e con **ELiTe InGenius® Software** versione **1.2** (o versioni successive equivalenti) utilizzare l'Assay protocol **MRSA-SA ELiTe_NS_200_50**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** e eluisce gli acidi nucleici in 50 µL.

Emocolture

Si raccomanda di raccogliere e trattare i campioni di emocolture destinati all'estrazione del DNA secondo le indicazioni del laboratorio. I campioni devono essere identificati secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati e conservati a temperatura ambiente per un massimo di 24 ore.

Prima dell'analisi con questo prodotto diluire il campione 1:1000 in acqua ultrapura per biologia molecolare (almeno 10 µL di campione in 10 mL di acqua ultrapura) vortexare e trasferire 0,2 mL di campione diluito nel tubo di sonicazione fornito con «**ELiTe InGenius Sonication tubes**».

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

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di emocoltura con **ELiTe InGenius** e con **ELiTe InGenius Software** versione **1.2** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **MRSA-SA ELiTe_BC_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Sostanze interferenti

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

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

Controlli di amplificazione

Prima di analizzare un campione con il prodotto, è obbligatorio generare e approvare i controlli di amplificazione relativi al lotto di reagente di amplificazione che si intende utilizzare:

come Controllo Positivo di amplificazione, utilizzare il prodotto **MRSA-SA - ELiTe Positive Control** (non fornito con il kit) in associazione con l'Assay protocol «**MRSA-SA ELiTe_PC**»,
come Controllo Negativo di amplificazione, utilizzare acqua ultrapura per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con l'Assay protocol «**MRSA-SA ELiTe_NC**».

Nota bene: il sistema **ELiTe InGenius** richiede la presenza di risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione che è memorizzato nel suo database.

I risultati dei controlli dell'amplificazione, approvati e memorizzati nel database, scadono **dopo 15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente l'analisi dei controlli positivi e negativi con il lotto di reagente di amplificazione.

Inoltre i controlli di amplificazione devono essere eseguiti nuovamente quando:

- si utilizza un nuovo lotto di reagenti di amplificazione,
- i risultati delle analisi dei controlli di qualità (vedi paragrafo successivo) sono fuori dalle specifiche,
- è stato effettuato un intervento di manutenzione sullo strumento **ELiTe InGenius**.

Controlli di qualità

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

Controlli esterni devono essere utilizzati secondo le leggi locali, statali, federali organizzazioni accreditate, a seconda dei casi.

PROCEDURA

La procedura di utilizzo del prodotto «**MRSA-SA - ELiTe MGB® Kit**» con il sistema **ELiTe InGenius** comprende tre fasi:

- verifica che il sistema sia pronto,
- impostazione della sessione,
- esame e approvazione dei risultati.

Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:

- accendere **ELiTe InGenius** e accedere al sistema con la modalità «**CLOSED**»;
- verificare che i risultati dei controlli di amplificazione (**MRSA-SA – ELiTe Positive Control**, **MRSA-SA Negative Control**) siano presenti, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di reagente di amplificazione che si intende utilizzare. Se non sono presenti risultati dei controlli di amplificazione approvati e validi, generare gli stessi come descritto di seguito;
- scegliere il tipo di corsa, seguendo le istruzioni della Graphical User Interface (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay protocol forniti da ELiTechGroup S.p.A.. Questi protocolli IVD sono stati validati specificamente con i prodotti **ELiTe MGB Kit**, lo strumento **ELiTe InGenius** e la matrice indicata. Gli Assay protocol per l'analisi dei campioni clinici disponibile per il prodotto «**MRSA-SA ELiTe MGB® Kit**» sono descritti nella tabella seguente.

Protocollo del saggio per MRSA-SA ELiTe MGB® Kit			
Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
MRSA-SA ELiTe_NS_200_50	Tamponi nasali	Positivo / Negativo	Volume iniziale d'Estrazione: 200 µL Volume di Eluizione dell'estratto: 50 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: 1 cycle, 5 sec. ON Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
MRSA-SA ELiTe_BC_200_100	Emocolture	Positivo / Negativo	Volume iniziale d'Estrazione: 200 µL Volume di Eluizione dell'estratto: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL

Se l'Assay protocol di interesse, non è presente nel sistema, contattare il Servizio Clienti locale di ELiTechGroup S.p.A.

Impostazione della sessione

Il prodotto **MRSA/SA ELITE MGB® Kit** in associazione al sistema **ELITE InGenius** può essere utilizzato per eseguire:

- A. Corsa integrata (Extract + PCR),
- B. Corsa di amplificazione (PCR only),
- C. Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo (PCR only).

Tutti i parametri necessari per l'esecuzione della sessione sono inclusi nell'Assay protocol disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay protocol.

Nota bene: il sistema **ELITE InGenius** può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile inviare le informazioni di impostazione della sessione. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Le principali operazioni per l'impostazione dei tre tipi di corsa sono descritti di seguito.

A Corsa integrata

Per impostare la corsa integrata eseguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare le provette di MRSA/SA PCR Mix per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 24 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
2. Scongellare le provette di CPE per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
4. Se vengono processati campioni di tamponi nasali, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 50 µL.
5. Se vengono processati campioni di emocolture, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
6. Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
7. Selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio MRSA-SA ELITE_NS_200_50).
8. Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
9. Selezionare la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" e selezionare "Sonicator Tube". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare il CPE e la MRSA/SA PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Caricare le "PCR Reaction Cassette", le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200", tutti i consumabili e i campioni da estrarre nella posizione specificata nel punto 8, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Chiudere lo sportello dello strumento.
14. Premere "Start" per avviare la corsa.

Dopo il completamento della sessione, il sistema **ELITE InGenius** permette all'utilizzatore di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: Alla fine della corsa il campione estratto rimasto nell'"Elution Tube" deve essere prelevato dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 °C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota bene: La PCR Mix può essere conservata nel blocco refrigerato fino a **15 ore** totali (5 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna).

B Corsa di amplificazione

Per impostare la corsa di amplificazione eseguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare le provette di MRSA/SA PCR Mix per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 24 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
3. Anche se l'estrazione non sarà eseguita e se vengono processati campioni di tamponi nasali, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 50 µL.
4. Anche se l'estrazione non sarà eseguita e se vengono processati campioni di emocolture, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
5. Per ogni Track di interesse compilare il SID digitando o scansionando il codice a barre del campione.
6. Selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio MRSA-SA ELITE_NS_200_50).
7. Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
8. Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" sia "ExtraTube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare la MRSA/SA PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare le "PCR Cassette" e i campioni degli acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Chiudere la porta dello strumento.
13. Premere "Start" per iniziare la corsa.

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

Nota bene: Alla fine della corsa il campione rimasto nell'"Elution Tube" deve essere prelevato dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 °C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota bene: La PCR Mix può essere conservata nel blocco refrigerato fino a **15 ore** totali (5 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna).

C. Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo

Per impostare la corsa di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo eseguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare il tubo di MRSA/SA PCR Mix per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di utilizzo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
2. Scongellare il tubo di MRSA/SA Positive Control e LGA251/SA Positive Control per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Trasferire almeno 30 µL di acqua ultrapura per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito nell'ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
5. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
6. Nelle "Track" di interesse, selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay".
7. Per il controllo positivo, selezionare il protocollo MRSA-SA ELITE_PC nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza del MRSA/SA Positive Control.
8. Per il controllo negativo, selezionare il protocollo del test MRSA-SA ELITE_NC nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua ultrapura per biologia molecolare.
9. Fare clic su "Next" per continuare l'impostazione.
10. Caricare la MRSA/SA -PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare / controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Caricare le "PCR Cassette", e i due tubi Positive Control (MRSA/SA e LGA251/SA) e il tubo di controllo negativo seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Chiudere la porta dello strumento,
14. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'ELITE InGenius permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: I risultati dei test dei Controlli Positivi e dei Controlli Negativi eseguiti sono utilizzati dal software dello strumento per compilare le "Control Chart". Quattro risultati dei Controlli Positivi e dei Controlli Negativi, da quattro sessioni diverse, sono richiesti per impostare la carta di controllo. I risultati successivi dei Controlli Positivi e dei Controlli Negativi sono utilizzati per monitorare le prestazioni della fase di amplificazione. Fare riferimento al manuale d'uso dello strumento per ulteriori dettagli.

Nota bene: Alla fine della corsa i Controlli Positivi rimasti devono essere prelevati dallo strumento, tappati, identificati e conservati a -20 °C. Evitare la fuoriuscita del Controllo Positivo. Il controllo Negativo rimasto deve essere eliminato.

Nota bene: Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota bene: La PCR Mix può essere conservata nel blocco refrigerato fino a **15 ore** totali (5 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna).

Esame e approvazione dei risultati

Al termine della corsa è visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata sono visualizzati i risultati relativi a campione / controllo e le informazioni relative alla corsa. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i rapporti ("Sample Report" o "Track Report"). Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Nota bene: il sistema ELITE InGenius può essere collegato ad un sistema di interfacciamento LIS tramite il quale è possibile inviare automaticamente i risultati approvati al centro elaborazione dati del laboratorio. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Il sistema **ELITE InGenius** genera i risultati con il prodotto «**MRSA/SA ELITE MGB® Kit**» attraverso questa procedura:

- A. Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
- B. Validazione dei risultati del campione,
- C. Refertazione dei risultati del campione.

A. Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde specifiche per i geni mecA and mecC e per il gene SA (SA) nella reazione di amplificazione dei Controlli Positivi e del Controllo Negativo sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay protocols "MRSA-SA ELITE_PC" e "MRSA-SA ELITE_NC".

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere visualizzati e approvati da parte del personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni della GUI.

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, scadono **dopo 15 giorni**.

Prima di analizzare un campione è necessario verificare la presenza dei risultati dell'amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo approvati e validi per il lotto di PCR Mix che si intende utilizzare. La disponibilità del risultato del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione "Approved" (Status) è visualizzata nella finestra "Controls" della GUI. Se non sono presenti dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione approvati e validi, generarli come descritto sopra.

Nota Bene: Quando un risultato dell'amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "not passed" nella schermata "Controls" e non è possibile approvarlo. In questo caso la reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo deve essere ripetuta.

Nota Bene: Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo è processato insieme con i campioni da analizzare ed il suo risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In questo caso anche l'amplificazione dei campioni deve essere ripetuta.

B. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde specifiche per i geni mecA e mecC e per il gene SA (SA) e dalla sonda per il Controllo Interno (IC) nelle reazioni di amplificazione dei campioni sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nell'Assay protocol.

Nota Bene: Prima di analizzare un campione, verificare la presenza di risultati dei controlli di amplificazione approvati e validi per il lotto di reagente di amplificazione che si intende utilizzare. La disponibilità di risultati dei controlli di amplificazione "Approved" (Status) è visualizzata nella finestra "Controls" della GUI. Se non sono presenti un risultati dei controlli di amplificazione approvati e validi, generarli come descritto sopra.

I risultati sono visualizzati nei rapporti generati dallo strumento ("Result Display").

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

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

Per ciascun campione il risultato del saggio è interpretato automaticamente dal sistema come stabilito dall'algoritmo dell'**ELITE InGenius software** e dai parametri dell'Assay protocol.

I possibili messaggi relativi al risultato di un campione sono riportati nella tabella sottostante.

Risultato della corsa del campione	Interpretazione
MRSA Detected.	Il DNA di MRSA/SA è stato rilevato nel campione.
MRSA/SA Not Detected or below LoD	Il DNA di MRSA/SA non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per questo gene oppure la sua presenza è al di sotto del limite di rilevazione del prodotto.
MRSA Not Detected or below LoD, SA Detected	Il DNA di MRSA non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per questo gene oppure la sua presenza è al di sotto del limite di rilevazione del prodotto. Il DNA di SA è stato rilevato .
Invalid - Retest Sample	Risultato del saggio non valido a causa di un problema con il Controllo Interno (estrazione errata o presenza di un inibitore).

I campioni non idonei per l'interpretazione dei risultati sono segnalati come "Non valido - Ritestare il campione" dall'**ELITE InGenius software**. In questo caso non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA del Controllo Interno perché si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o nella fase di estrazione (degradazione del DNA, perdita del DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'estratto) che possono causare risultati errati e falsi negativi.

Quando il volume dell'eluato è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato mediante amplificazione in modalità "PCR Only". Se si conferma il risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota utilizzando la modalità "Extract + PCR".

I campioni idonei in cui non è stato possibile rilevare il DNA di MRSA/SA sono segnalati come "DNA non rilevato o inferiore a LoD". In questo caso non si può escludere che il DNA di MRSA/SA sia presente ad un titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni").

Nota bene: I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e gli altri risultati degli esami di laboratorio relativi al paziente.

I risultati della corsa del campione sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Result Display) da parte di personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst" seguendo le istruzioni della GUI. Dalla finestra "Result Display" è possibile stampare e salvare i risultati della sessione come "Sample Report" e "Track Report".

C. Refertazione dei risultati del campione

I risultati del campione sono memorizzati nel database e possono essere esportati come "Sample Report" e "Track Report".

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

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

I "Sample Report" e "Track Report" possono essere stampati e firmati dal personale autorizzato.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

La sensibilità analitica di questo saggio(LoD), come limite di rilevazione, permette di rilevare la presenza di circa 20 copie nei 10 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio, come limite di rilevazione, è stata testata utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 10 µL in presenza di 40.000 copie di Internal Control (IC) / 10 µL. Questo campione è stato impiegato in 18 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. su due diversi strumenti.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi	Mec A Ct media	SA Ct media
20 copie di plasmidi MRSA/SA DNA + 40.000 copie di IC	18	17	1	35,04	34,43
20 copie di plasmidi MECC/SA DNA + 40.000 copie di IC	18	18	0	34,75	34,12

Sensibilità analitica: riproducibilità con materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica del saggio, come riproducibilità dei valori di un materiale di riferimento calibrato, è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento il pannello calibrato "QCMD 2014 Methicillin Resistant S. aureus EQA" (Qnostics, Ltd, Regno Unito) e un pannello di diluizioni di MRSA/SA con concentrazioni limite. Ciascun campione del pannello è stato testato in 2 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con «**ELITE InGenius**» e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e «ELITE InGenius»			
Campione	Contenuto del Campione	Risultati attesi	Risultati ottenuti
MRSADNA14-01	MRSA N315	MRSA Rilevato	MRSA Rilevato
MRSADNA14-02	MSSA ATCC 29213	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-03	MSSA 29213 + MRCoNS 634	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-04	E. coli ATCC 35218	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-05	MRSA N315	MRSA Rilevato frequentemente	MRSA Rilevato
MRSADNA14-06	MHB only	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-07	MRSA N315	MRSA Rilevato non frequentemente	MRSA Rilevato
MRSADNA14-08	MRSA mecC	MRSA Rilevato non frequentemente	MRSA Rilevato
MRSADNA14-09	MRCoNS 634	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-10	MRSA ST398	MRSA Rilevato	MRSA Rilevato
MRSADNA14-11	MRSA N315	MRSA Rilevato frequentemente	MRSA Rilevato
MRSADNA14-12	MRSA N315	MRSA Rilevato	MRSA Rilevato

Tutti i campioni sono stati individuati correttamente.

La sensibilità analitica del saggio, come riproducibilità dei valori di un materiale di riferimento calibrato, è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento un pannello NATrol® MRSA/SA (Zeptomatrix, US) pannello di S. aureus o S. epidermidis. Ciascun campione del pannello è stato testato in 2 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con «**ELITE InGenius**» e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e «ELITE InGenius™»		
Campione	Risultati attesi	Risultati ottenuti
S. aureus_MRSA Community Strain	MRSA Positivo	MRSA Rilevato
S. aureus_MRSA Hospital Strain	MRSA Positivo	MRSA Rilevato
S. aureus_MSSA	MSSA Positivo	MSSA Rilevato
S. aureus_MSSA – empty cassette	MSSA Positivo	MSSA Rilevato
S. epidermidis_MSSE HER 1292	Negativo	Negativo

Tutti i campioni sono stati individuati correttamente.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata utilizzando campioni clinici di tamponi nasali ed emocolture positive per MRSA e MSSA.

La sensibilità diagnostica del saggio è stata valutata utilizzando 60 campioni di tamponi nasali positivi per MSSA, 21 campioni di tamponi nasali positivi per MRSA e 20 tamponi nasali positivizzati per MRSA con l'aggiunta di MRSA BAA-1556 (ATCC) con un titolo di 100.000 CFU/mL.

La sensibilità diagnostica del saggio è stata valutata anche utilizzando 39 campioni di emocoltura positivi per MSSA, 21 campioni di emocoltura positivi per MRSA e, data la difficoltà nel trovare un numero significativo di campioni clinici positivi per i geni target, utilizzando 10 campioni di emocoltura positivizzati con isolati MRSA.

Ciascun campione è stato testato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con l'**ELITE InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Campioni di tamponi nasali positivi per il DNA di MSSA	60	56	4
Campioni di tamponi nasali positivi per il DNA di MRSA	41	40	1
Campioni di emocoltura positivi per il DNA di MSSA	39	39	0
Campioni di emocoltura positivi per il DNA di MRSA	31	31	0

Per i tamponi nasali, 56 su 60 campioni MSSA sono stati rilevati correttamente. 4 campioni sono risultati negativi. 40 su 41 campioni MRSA sono stati rilevati correttamente. Un campione è risultato MSSA positivo.

La sensibilità diagnostica del saggio in associazione alla matrice tamponi nasali è risultata uguale a 93% per MSSA e 98% per MRSA.

Per le emocolture, tutti i campioni sono stati rilevati correttamente.

La sensibilità diagnostica del saggio in associazione alla matrice emocolture è risultata uguale a 100% per MSSA e 100% per MRSA.

La sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale a 96% per MSSA e 99% per MRSA.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata utilizzando 48 campioni clinici di tamponi nasali e 34 campioni clinici di emocoltura negativi per MRSA/SA.

Ciascun campione è stato testato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con l'**ELITE InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Campioni di tamponi nasali negativi per il DNA di MRSA/SA	48	0	48
Campioni di emocolture negative per il DNA di MRSA/SA	34	0	34

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente.

La specificità diagnostica del saggio è risultata uguale a 100%.

ALTRI SISTEMI

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

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

I campioni da tamponi nasali, destinati all'estrazione del DNA, devono essere raccolti con tamponi BBL Culture SWab Plus Amies Gel without charcoal (Becton-Dickinson) e identificati in base alle linee guida del laboratorio. I campioni da tamponi nasali devono essere trasportati e conservati a +18/+25 °C per al massimo un giorno, altrimenti devono essere conservati a +2/+8 °C per un massimo di sette giorni. I campioni da tamponi nasali devono essere immersi in 1 mL di brodo tripticasi-soia (TSB) e agitati per 10 secondi prima di iniziare la procedura di estrazione.

N.B.: quando si estrae il DNA con il sistema «NucliSENS® easyMAG®», usare le seguenti impostazioni.

Definire i parametri di estrazione nel modo seguente:

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

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

Sostanze interferenti

Sostanze che possono interferire con la rivelazione di SA e MRSA mediante il «**MRSA/SA - ELITE MGB® Kit**» e potrebbero determinare risultati non validi, inclusi il propilene glicole e quantità eccessive di secrezioni/muco nasale.

È stato dimostrato che le sostanze esogene elencate sotto, che sono componenti di decongestionanti e prodotti usati per alleviare la secchezza e/o l'irritazione nasale, a eccezione del propilene glicole, non interferiscono con la rivelazione di MRSA/SA da parte del «**MRSA/SA - ELITE MGB® Kit**». È stato dimostrato che la presenza di sangue umano non interferisce con la rivelazione di MRSA/SA da parte del «**MRSA/SA - ELITE MGB® Kit**» utilizzato in associazione con «**NucliSENS® easyMAG®**».

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

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

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

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

Controlli dell'amplificazione

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

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

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

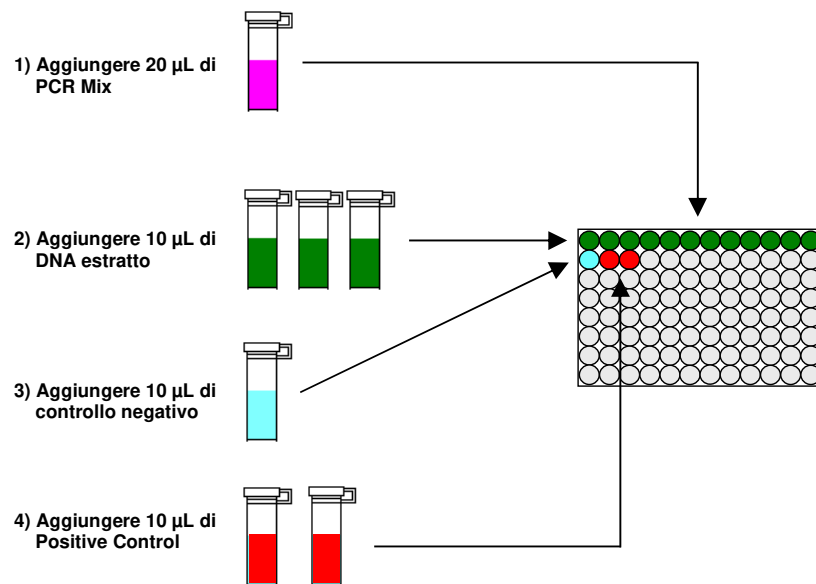
Controlli di qualità

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

6. Sigillare accuratamente l'**Amplification microplate** con l'**Amplification Sealing Sheet** (foglio adesivo di amplificazione).
7. Trasferire l'**Amplification microplate** nel thermal cycler per real time posto nell'area di amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione e avviare il ciclo termico di amplificazione. Salvare le impostazioni della sessione con un nome del file univoco e riconoscibile (ad es. "anno-mese-giorno-MRSA/SA-EGSpA").

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

La figura seguente illustra l'impostazione della reazione di amplificazione.



Analisi qualitativa dei risultati

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

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

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

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

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

Reazione controllo positivo detector TAMRA "SA"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rivelazione
Ct ≤ 35	POSITIVO	CORRETTA

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

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

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

Reazione controllo negativo detector TAMRA "SA"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rivelazione
Ct non determinato o Ct > 35	NEGATIVO	CORRETTA

Reazione controllo negativo detector FAM "mecA"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rivelazione
Ct non determinato o Ct > 35	NEGATIVO	CORRETTA

Reazione controllo negativo detector Cy5 "IC"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rivelazione
Ct non determinato o Ct ≥ 34	NEGATIVO	CORRETTA

Se il risultato dell'amplificazione del **controllo negativo** è **Ct ≤ 35** per i detector SA o *mecA* o **Ct < 34** per il detector IC, il DNA target non è stato rivelato correttamente. Ciò significa che si sono verificati problemi durante la fase di amplificazione (contaminazione) che possono determinare risultati non corretti e falsi positivi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta a partire dalla fase di amplificazione.

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

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

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

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

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

NA = non applicabile

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

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

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

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

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prestazioni cliniche

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

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

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

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

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

Risultati relativi a MRSA ottenuti con il «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» rispetto al metodo di riferimento.

	MRSA mecA Sensibilità diagnostica	MRSA mecC Sensibilità diagnostica	MRSA Specificità diagnostica
7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument	100%	100%	97,5%
7500 Real Time PCR System	100%	100%	97,5%

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

Risultati relativi a SA ottenuti con il «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» rispetto al metodo di riferimento.

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

Valutazione delle caratteristiche non cliniche

Limite di rilevazione

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

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

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

Risultati del limite di rilevazione

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

Efficienza della determinazione genotipica (inclusività)

Le prestazioni del «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» usato in associazione con NucliSENS® easyMAG® sono state testate con MRSA/SA QCMD proficiency panel. Tutti i ceppi sono stati correttamente identificati. Oltre a ciò il saggio¹ è stato testato nei confronti di 75 ceppi isolati ben caratterizzati di MRSA e di SA sensibili alla meticillina rappresentativi della diversità genetica globale, inclusi complessi clonali e tipi di sequenze, oltre a vari tipi di elettroforesi su gel in campo pulsato (PFGE) e valori di MIC (concentrazione minima inibitoria). I ceppi sono stati ottenuti attraverso il programma Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA) e attraverso l'American Tissue Culture Collection (ATCC) o sono stati donati dal Medical College of Wisconsin². Tutti i ceppi sono stati assorbiti su tamponi in quantità prossime al limite di rivelazione e testati. Tutti i ceppi di SA sensibili alla meticillina sono stati inoltre testati a 1x10⁶ CFU/tampone. Tutti i ceppi di SA sensibili alla meticillina hanno dato risultati positivi per SA e negativi per MRSA. Tutti i ceppi di MRSA hanno dato risultati positivi per MRSA. Due isolati BORSA (*Staphylococcus aureus* con resistenza borderline alla oxacillina), a cui mancava il gene *mecA*, testato positivo per SA e negativo per MRSA, che conduce ad una efficienza generale di rivelazione del genotipo (inclusività) del 97,3%.

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

Specificità analitica (cross reattività)

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

¹ Dati sperimentali sono stati ottenuti utilizzando il sistema di estrazione NucliSENS® easyMAG® e lo strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument con la versione precedente del prodotto «MRSA/SA - ELITE MGB® Kit», che rispetto a quella attuale non disponeva di oligonucleotidi specifici per *mecC*.

² Dono del Dott. Nathan A. Ledebouer, Medical College of Wisconsin, WI; I ceppi sono descritti in: Buchan, B.W., Ledebouer, N.A. Identification of Two Borderline Oxacillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* From Routine Nares Swab Specimens by One of Three Chromogenic Agars Evaluated for the Detection of MRSA, Microbiology and Infectious Disease.2010;134:921-927.

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

Specie di <i>Staphylococci</i>		Altri microrganismi	Virus
<i>Staphylococcus arletae</i>	CoNS	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Adenovirus tipo 1,7
<i>Staphylococcus capitis</i>	CoNS	<i>Bacillus cereus</i>	Coronavirus umano (229E e OC43)
<i>Staphylococcus carnosus</i>	CoNS	<i>Bordetella pertussis</i>	Citomegalovirus
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	CoNS	<i>Citrobacter freundii</i>	Coxsackievirus tipo A21
<i>Staphylococcus delphini</i>	MSCoPS	<i>Citrobacter koseri</i>	Virus di Epstein Barr
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MSCoNS	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	Virus A e B dell'influenza umana
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MRCoNS	<i>Corynebacterium bovis</i>	Parainfluenza umana tipo 1, 2, 3, 4
<i>Staphylococcus equorum</i>	CoNS	<i>Corynebacterium flavescent</i>	Metapneumovirus umano
<i>Staphylococcus felis</i>	CoNS	<i>Corynebacterium genitalium</i>	Virus del morbillo
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	CoNS	<i>Enterococcus aerogenes</i>	Virus della parotite
<i>Staphylococcus hyicus</i>	CoPS	<i>Enterococcus faecalis</i>	Virus respiratorio sinciziale Tipo B
<i>Staphylococcus intermedius</i>	CoPS	<i>Enterococcus flavescent</i>	Rinovirus
<i>Staphylococcus kloosii</i>	CoPS	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
<i>Staphylococcus lentus</i>	CoPS	<i>Enterococcus hirae</i>	
<i>Staphylococcus pulvereri</i>	CoNS	<i>Escherichia coli</i>	
<i>Staphylococcus simulans</i>	CoNS	<i>Klebsiella oxytoca</i>	
<i>Staphylococcus warneri</i>	CoNS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Staphylococcus xylosus</i>	MSCoNS	<i>Listeria monocytogenes</i>	
		<i>Micrococcus luteus</i>	
		<i>Moraxella catarrhalis</i>	
		<i>Pasteurella aerogenes</i>	
		<i>Proteus mirabilis</i>	
		<i>Proteus vulgaris</i>	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
		<i>Salmonella typhimurium</i>	
		<i>Serratia marcescens</i>	
		<i>Shigella sonnei</i>	
		<i>Streptococcus mitis</i>	
		<i>Streptococcus salivarius</i>	
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	
		<i>Candida albicans</i>	
		<i>Candida glabrata</i>	
		<i>Cryptococcus neoformans</i>	
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
		<i>Legionella pneumophila</i>	
		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
		<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
		<i>Neisseria meningitidis</i>	
		<i>Streptococcus mutans</i>	
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
		<i>Streptococcus pyogenes</i>	
		<i>Homo sapiens</i>	

CoNS = *Staphylococcus* negativo alla coagulasi.

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

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

CoPS = *Staphylococcus* positivo alla coagulasi.

Riproducibilità con materiale di riferimento certificato

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

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

I risultati sono riportati nella seguente tabella

Test con il materiale di riferimento certificato				
ID campione	Contenuto	Concentrazione del campione CFU/mL	Risultato atteso	Risultato ottenuto
MRSADNA10-04	MRSA	1 x 10 ⁸	Frequentemente determinato	Determinato
MRSADNA10-03	MRSA	5 x 10 ⁷	Frequentemente determinato	Determinato
MRSADNA10-01	MRSA	5 x 10 ⁸	Frequentemente determinato	Determinato
MRSADNA10-09	MRSA	5 x 10 ⁵	Frequentemente determinato	Determinato
MRSADNA10-08	MRSA	5 x 10 ⁵	Frequentemente determinato	Determinato
MRSADNA10-02	MRSA	5 x 10 ⁵	Determinato	Determinato
MRSADNA10-05	MSSA	5 x 10 ⁶	MRSA negativo	MRSA negativo, SA positivo
MRSADNA10-06	MSSA	1 x 10 ⁷	MRSA negativo	MRSA negativo, SA positivo
MRSADNA10-07	MSSA	5 x 10 ⁶	MRSA negativo	MRSA negativo, SA positivo
MRSADNA10-12	MRCoNS	1 x 10 ⁷	Negativo	Negativo
MRSADNA10-10	<i>E. coli</i>	5 x 10 ⁶	Negativo	Negativo
MRSADNA10-11	MHB only	-	Negativo	Negativo

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente.

Carry over / Contaminazione crociata

È stato condotto uno studio analitico per valutare il potenziale di contaminazione crociata tra campioni a elevato contenuto di MRSA (1x10⁷ CFU/mL) e campioni negativi durante tutto il flusso di lavoro del «**MRSA/SA ELITE MGB® Kit**». Due operatori hanno eseguito cinque estrazioni di 24 campioni (11 campioni a elevato contenuto di MRSA, 11 campioni negativi, 1 controllo positivo e 1 controllo negativo per analisi) con uno schema a scacchiera (campioni a elevato contenuto di MRSA interrotti da campioni completamente negativi). I campioni trattati sono stati quindi amplificati in cinque analisi separate usando due diversi schemi a scacchiera. L'analisi di contaminazione crociata ha presentato zero falsi negativi sui 55 campioni positivi con elevato contenuto di MRSA e un falso positivo sui 55 campioni negativi.

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

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

BIBLIOGRAFIA

Centers for Disease Control and Prevention. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 through June 2004. Am J Infect Control 32:470-485, October 2004.

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

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

Garcia-Alvarez, L. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis 2011, 11:595-603.

Stegger, M. et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA*_{LG251}. 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.

LIMITI DELLA PROCEDURA

Usare questo prodotto esclusivamente in associazione con i sistemi di estrazioni e gli strumenti di PCR real time raccomandati.

Usare questo prodotto esclusivamente con il DNA estratto da tamponi nasali umani.

Non usare con questo prodotto DNA estratto contaminato da mucoproteine, propilene glicole, etanolo o 2-propanolo. Queste sostanze inibiscono la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e possono causare risultati non validi.

Non usare con questo prodotto DNA estratto contenente elevate quantità di DNA genomico umano, che potrebbe inibire la reazione di amplificazione degli acidi nucleici.

L'affidabilità dei risultati dipende dalla correttezza dei processi di identificazione, raccolta, trasporto, conservazione e lavorazione dei campioni. Per evitare risultati non corretti è necessario prestare attenzione durante queste fasi e seguire accuratamente le istruzioni per l'uso fornite con i prodotti.

A causa della sua elevata sensibilità analitica, il metodo di amplificazione real time usato in questo prodotto è sensibile alla contaminazione crociata con campioni clinici positivi a SA o MRSA, con controlli positivi e prodotti della stessa amplificazione. La contaminazione crociata causa risultati falsi positivi. Il formato del prodotto è in grado di limitare la contaminazione crociata. La contaminazione crociata, comunque, può essere evitata utilizzando buone pratiche di laboratorio e seguendo accuratamente queste istruzioni per l'uso.

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

Questo prodotto richiede personale qualificato addestrato per le procedure di biologia molecolare, come l'estrazione, l'amplificazione e la rivelazione di acidi nucleici per evitare risultati errati.

Questo prodotto richiede aree separate per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

Questo prodotto richiede aree separate per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

Questo prodotto richiede aree separate per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

A causa delle differenze intrinseche alle diverse tecnologie, si raccomanda agli utilizzatori di eseguire studi di correlazione del metodo per stimare le differenze delle tecnologie prima di passare a una nuova.

Un risultato positivo ottenuto con questo prodotto non indica la presenza di SA o MRSA vitali ma presuppone la presenza di SA o MRSA. Un risultato positivo, quindi, non indica necessariamente il fallimento dell'intervento di eradicazione in quanto può persistere DNA non vitale.

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto significa che non è stato rivelato DNA di SA o di MRSA nel DNA estratto dal campione, ma non si può escludere che il DNA di SA o di MRSA abbia un titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedere Caratteristiche delle prestazioni, pagina 15). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

Un risultato negativo in seguito a un precedente risultato positivo potrebbe indicare o non indicare il successo dell'eradicazione.

I risultati ottenuti con questo prodotto possono talvolta essere "Non validi" a causa del fallimento del controllo interno e dovranno essere ripetuti, determinando un ritardo nell'ottenimento dei risultati finali.

Sebbene rari, i polimorfismi all'interno della regione del genoma batterico coperti dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rivelazione.

La rivelazione di MRSA in presenza di quantità eccessive di SA sensibile alla meticillina o di carrier di *mecA* negativi alla coagulasi potrebbe essere compromessa.

Gli *Staphylococcus aureus* con resistenza borderline alla oxacillina (BORSA) che non presentano il gene *mecA* non sono rivelati da questo prodotto.

I risultati devono essere interpretati insieme ad altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico e devono essere usati in aggiunta agli sforzi di controllo delle infezioni nosocomiali per identificare i pazienti che necessitano di precauzioni supplementari.

PROBLEMI E SOLUZIONI

DNA bersaglio non rivelato nella reazione del controllo positivo	
Possibili cause	Soluzioni
Erogazione scorretta nei pozzetti della micropiastra.	Prestare attenzione quando si erogano i reagenti nei pozzetti della micropiastra e seguire il piano di lavoro. Controllare i volumi della miscela di reazione dispensati. Controllare il volume del controllo positivo dispensato.
Degradazione della sonda.	Utilizzare una nuova aliquota di miscela di reazione.
Degradazione standard.	Utilizzare una nuova aliquota di controllo positivo.
Errore nell'impostazione dello strumento.	Verificare le impostazioni dello strumento relative alle reazioni del controllo positivo. Verificare le impostazioni dello strumento relative al ciclo termico.

DNA bersaglio rivelato nella reazione di controllo negativo	
Possibili cause	Soluzioni
Erogazione scorretta nei pozzetti della micropiastra.	Evitare di spargere il contenuto delle provette dei campioni. Cambiare sempre i puntali tra un campione e l'altro. Prestare attenzione quando si erogano campioni, controllo negativo e controllo positivo nei pozzetti della micropiastra e seguire il piano di lavoro.
Errore durante l'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione dei campioni, del controllo negativo e del controllo positivo impostata sullo strumento.
Micropiastra sigillata male.	Prestare attenzione quando si sigilla la micropiastra.
Contaminazione dell'acqua per uso in biologia molecolare.	Utilizzare una nuova aliquota di acqua per uso in biologia molecolare.
Contaminazione della miscela di reazione.	Utilizzare una nuova aliquota di miscela di reazione.
Contaminazione dell'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.	Pulire superfici e strumenti con detergenti acquosi, lavare camici, sostituire provette e puntali in uso.

Presenza di fluorescenza di fondo irregolare o elevata nelle reazioni	
Possibili cause	Soluzioni
Erogazione scorretta o miscelazione inadeguata del campione.	Pipettare attentamente tre volte quando si miscelano campioni, controllo negativo e controllo positivo nella miscela di reazione. Evitare la creazione di bolle d'aria durante l'erogazione del campione.

LEGENDA DEI SIMBOLI

REF	Numero di catalogo.
	Limite superiore di temperatura.
LOT	Codice del lotto.
	Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).
IVD	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i> .
	Conforme ai requisiti della direttiva europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medici diagnostici <i>in vitro</i> .
	Contenuto sufficiente per "N" test.
	Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.
CONT	Contenuto.
	Fabbricante.

NOTA PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

Questo prodotto contiene reagenti prodotti da Life Technologies Corporation e sono venduti in base al contratto di licenza tra ELITechGroup S.p.A. e suoi affiliati e Life Technologies Corporation. Il prezzo di acquisto di questo prodotto include i diritti - limitati e non trasferibili - di utilizzare solo questa quantità di prodotto, unicamente per attività dell'acquirente che siano direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sull'acquisto di una licenza per questo prodotto per scopi diversi da quelli definiti sopra, contattare il Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Val Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefono: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. Email: outlicensing@thermofisher.com.

I reagenti di rilevazione ELITe® MGB sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. numero 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 e da brevetti EP numero 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939. Sono state presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

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

ELITe MGB® e il logo ELITe MGB® sono marchi registrati da ELITechGroup nell'Unione Europea.

ELITe InGenius® è un marchio registrato di ELITechGroup.

NucliSENS® easyMAG® sono marchi registrati della bioMérieux.

eNAT™ è un marchio commerciale di COPAN Italia S.p.A.