

MAST®ALEX MRSA

RST501

Uso previsto

Test al lattice su vetrino per l'identificazione rapida della Penicillin Binding Protein 2' (PBP2') e per la conferma di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA).

SOLO PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*

Contenuto

MAST®ALEX MRSA contiene i seguenti componenti:

1. Reagente di Estrazione 1 (Tappo di colore verde). Pronto per l'uso. 1x10 mL di idrossido di sodio 0,1M.
2. Reagente di Estrazione 2 (Tappo di colore giallo). 1x2,4 mL di fosfato di potassio 0,5M.
3. Test Latex (Tappo di colore rosso). Pronto per l'uso. 1x1,2 mL di particelle di lattice sensibilizzate con anticorpi monoclonali anti-PBP2'.
4. Control Latex (Tappo di colore bianco). Pronto per l'uso. 1x1,2 mL di particelle di lattice non sensibilizzate.
5. 100 bastoncini per miscelazione monouso.
6. 1 confezione di 16 cartoncini di reazione a sei pozzetti.
7. Foglio di istruzioni.

I reagenti al lattice contengono lo 0,08% di sodio azide come conservante.

Conservazione e validità

Conservare la confezione originale, ben sigillata, a 2 a 8°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione. Una volta aperto, MAST®ALEX MRSA dovrà essere conservato a 2 a 8°C e potrà essere utilizzato fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione. **Non congelare i reagenti.**

Precauzioni

Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*. Rispettare le precauzioni di sicurezza ed impiegare tecniche asettiche. Deve essere utilizzato solo da personale di laboratorio opportunamente qualificato. Prima dell'eliminazione, sterilizzare tutti i materiali biologici pericolosi. Il conservante sodio azide può risultare tossico se ingerito e può reagire con le tubazioni di piombo e rame formando sali altamente esplosivi. Smaltire sempre irrorando con abbondante acqua. Consultare la scheda di sicurezza del prodotto (disponibile a richiesta).

Materiali richiesti ma non forniti

Attrezzature e prodotti per analisi microbiologiche di base, per esempio: anse standard da 5 µL o anse microbiologiche sterili monouso (volume interno 1,5 µL), blocco di riscaldamento o bagno di ebollizione, microfuga o centrifuga da banco, piccole provette e pipette.

Procedura

A. Preparazione del campione

Per il test si dovrebbero utilizzare microrganismi di colture fresche precedentemente identificati come *Staphylococcus aureus* mediante analisi biochimiche e morfologiche, cioè cocchi Gram-positivi coagulasi positivi. I microrganismi devono essere cresciuti su agar sangue o altro idoneo terreno a 35 a 37°C per 18 a 24 ore.

B. Procedura di Estrazione

1. Prima dell'uso, portare i reagenti MAST®ALEX MRSA a temperatura ambiente.
2. Dispensare 4 gocce (200 µL) del Reagente di Estrazione 1 in una provetta da centrifuga o altra idonea provetta in plastica.
3. Utilizzando un'ansa sterile standard da 5 µL, prelevare un quantitativo di microrganismi sufficiente appena a riempire il diametro interno e sospenderli interamente nel liquido. Il volume totale dovrebbe essere di 3 a 5 µL o circa 1,5x10⁸ batteri. In alternativa, 25 a 30 colonie piccole (diametro di 0,5 mm) o 4 a 5 colonie grandi (diametro di 2,5 mm). Se si utilizza un'ansa sterile monouso da 1,5 µL, prelevare un quantitativo di batteri sufficiente a riempire l'ansa e sospenderle interamente nel liquido. Ripetere una seconda volta. Due volumi interni di ansa/provetta ≈ 1,5x10⁸ batteri.
4. Tappare la provetta e posizionarla in un blocco di riscaldamento o bagno di ebollizione a 100°C per 3 minuti. Se si utilizza il blocco di riscaldamento verificare che le provette si adattino comodamente al blocco.
5. Togliere la provetta dal blocco di riscaldamento, o dal bagno di ebollizione, e lasciare raffreddare a temperatura ambiente. Il periodo di raffreddamento può essere ridotto inserendo le provette in un bagno di acqua fredda o sul ghiaccio.
6. Al termine del raffreddamento aggiungere alla provetta 1 goccia (50 µL) del Reagente di Estrazione 2 e miscelare con cura.
7. Centrifugare a 1500 g per cinque minuti o equivalente, cioè 3000 rpm in un rotore di 15 cm o 4500 rpm in un rotore di 4,5 cm. In alternativa, può essere utilizzata una microfuga per 1 a 5 minuti.
8. Rimuovere il surnatante immediatamente dopo la centrifugazione e utilizzarlo come campione analitico per la procedura di agglutinazione al lattice.
9. **Nota:-** Verificare che il materiale precipitato non sia agitato né utilizzato nella procedura di agglutinazione, poiché potrebbe verificarsi una agglutinazione aspecifica.
10. Il campione analitico può essere conservato a 2 a 8°C per un uso successivo durante la stessa giornata o conservato a meno 70 a meno 80°C per un periodo più lungo. Per i campioni conservati da meno 70 a meno 80°C, evitare il ripetuto congelamento e scongelamento.

C. Procedura di Agglutinazione al Lattice

Nota:- Verificare che i flaconi dei reagenti al lattice siano riportati a temperatura ambiente e che i reagenti Test e Control Latex siano adeguatamente agitati prima dell'uso per ottenere una sospensione uniforme appena prima dell'analisi.

Nota:- In caso di dispensazione multipla, tenere il flacone in posizione completamente verticale ed effettuare una breve pausa tra la dispensazione delle diverse gocce. Non lasciare che i reagenti entrino a contatto diretto con il campione sul cartoncino di reazione mentre si effettua la dispensazione. Dopo l'uso, verificare che tutti i flaconi dei reagenti siano ermeticamente chiusi.

1. Per ogni campione da testare posizionare 50 µL di surnatante nei due cerchi del Cartoncino Analitico pre-etichettato. In un cerchio aggiungere una goccia (25 µL) di Test Latex e nell'altro cerchio aggiungere una goccia (25 µL) di Control Latex.
2. Miscelare insieme il surnatante e il lattice in ciascun pozzetto utilizzando diversi bastoncini di miscelazione, come fornito, e distribuire la miscela nell'intera area del cerchio nero sul cartoncino di reazione. Ruotare il vetrino manualmente, o utilizzando un rotore per miscelazione, per 3 minuti, e osservare visivamente l'agglutinazione.
3. Dopo tre minuti, posizionare sul banco da lavoro i cartoncini di reazione e osservare i cerchi per verificare i segni dell'agglutinazione, registrando i risultati.

Interpretazione dei risultati

- Una reazione di agglutinazione positiva solo con il Test Latex e non con il Control Latex indica che il microrganismo contiene PBP2' e che dovrebbe essere segnalato come presunto *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA). I gradi di positività possono essere registrati nel seguente modo:

Intensa agglutinazione su uno sfondo trasparente.	3+
Agglutinazione su uno sfondo leggermente torbido.	2+
Lieve agglutinazione su uno sfondo torbido.	1+
Sospensione bianca omogenea senza alcuna agglutinazione visibile	-

- Una reazione negativa sia con il Latex Test sia con il Control Test indica che il microrganismo non contiene PBP2' e dovrebbe essere segnalato come presunto *Staphylococcus aureus* meticillino-sensibile (MSSA).
- Se si osserva una reazione di agglutinazione positiva con il Control Latex, il test dovrebbe essere classificato come indeterminato e ripetuto.
- È possibile osservare reazioni aspecifiche se viene utilizzata una quantità di microrganismi troppo elevata.
- I risultati indeterminati dovrebbero essere nuovamente testati. In questo caso verificare che i passaggi di riscaldamento e centrifugazione siano conformi alla procedura. Un riscaldamento superiore a cinque minuti può ridurre la sensibilità, mentre un riscaldamento per un minuto o un periodo inferiore può causare un'agglutinazione aspecifica. Se il campione fornisce ancora un risultato indeterminato si dovrebbe utilizzare un procedimento alternativo, per es. il test di sensibilità antimicrobica o la Reazione a Catena della Polimerasi (PCR).
- In casi **molto rari** è possibile osservare la comparsa di falsi negativi quando lo *S. aureus* isolato produce scarsi livelli di PBP2'. Si raccomanda di utilizzare procedure alternative per il test di sensibilità seguendo i metodi standard, per es. del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI®).
- I risultati negativi ottenuti con questo kit dovranno essere valutati unitamente ad altri dati clinicamente rilevanti quando si diagnostica una infezione da MRSA. In particolare, il test dovrà essere ripetuto se durante il decorso di una infezione da *S. aureus* la prognosi dovesse indicare un insuccesso del trattamento, ecc.

Limitazioni

- Il test è indicato per l'identificazione presuntiva dei microrganismi MRSA. Anche altri microrganismi che producono il prodotto genetico PBP2' potranno fornire risultati positivi.
- Alcuni ceppi di microrganismi possono manifestare un basso livello di resistenza alla meticillina o in rari casi produrre piccole quantità di PBP2'. In questi casi è consigliato un appropriato test di sensibilità antimicrobica.
- Gli stafilococchi coagulasi-negativi (CNS) meticillino-resistenti producono PBP2' e questo kit ne identificherà la presenza; non è stata tuttavia eseguita una piena convalida del suo impiego diagnostico per i CNS. Il kit non è quindi consigliato con questi microrganismi.
- Altri meccanismi esistenti di resistenza alla meticillina non sono rivelati da questo kit, compresa l'iperproduzione di β-lattamasi (BORSA – *Staphylococcus aureus* con resistenza. borderline all'oxacillina) e la produzione di PBP modificata (MOD-SA *Staphylococcus aureus*)
- L'esame non deve essere eseguito da campioni diretti quali le emocolture.

Controllo qualità

Verificare eventuali segni di deterioramento.

Il controllo di qualità deve essere eseguito impiegando almeno un microrganismo che mostri il risultato atteso. Non utilizzare il prodotto se le reazioni con i microrganismi di controllo non sono corrette. Di seguito sono elencati alcuni ceppi per il controllo di qualità che possono essere facilmente reperiti in commercio.

Microrganismo	Risultato	
	Test Latex	Control Latex
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Nessuna agglutinazione	Nessuna agglutinazione
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33591 (MRSA)	Agglutinazione	Nessuna agglutinazione

Bibliografia

La pertinente bibliografia è disponibile su richiesta