



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

Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
Sito internet: www.elitechgroup.com

AVVERTENZA del 07/02/2025

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«Bordetella ELITE MGB[®] Kit» Ref. RTS140ING

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

Inserimento frase interpretativa relativa a IS481 ai paragrafi:

- “Validazione dei risultati del campione”
- “Marcatori potenzialmente interferenti (cross-reattività)”
- “Marcatori potenzialmente interferenti (inibizione)”
- “Limiti della procedura”

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



Bordetella ELITE MGB® Kit

reagente per l'amplificazione real time del DNA

REF RTS140ING



INDICE

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 3
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 4
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 5
PROCEDURA	pag. 6
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 12
BIBLIOGRAFIA	pag. 17
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 17
RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	pag. 18
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 20
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 20

USO PREVISTO

Il prodotto «Bordetella ELITE MGB® Kit» fa parte di un saggio qualitativo multiplex di amplificazione degli acidi nucleici per la rilevazione e l'identificazione del DNA di *Bordetella pertussis* (BP), *Bordetella parapertussis* (BPP) e *Bordetella holmesii* (BH) nei campioni clinici.

Il saggio è stato validato in associazione con il sistema ELITE InGenius® partendo da campioni di aspirati nasofaringei.

Il prodotto trova impiego nella diagnosi delle infezioni dell'apparato respiratorio causate da *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella holmesii*, insieme ai dati clinici del paziente e agli esiti di altri esami di laboratorio.

Bordetella ELITE MGB® Kit

reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS140ING

PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio consiste in una reazione di amplificazione real time multiplex eseguita in associazione a ELITE InGenius, un sistema integrato e automatizzato per l'estrazione, l'amplificazione, la rilevazione e l'interpretazione dei risultati.

A partire dal DNA estratto da ciascun campione da testare, mediante il prodotto BORD PCR Mix nella PCR Cassette sono eseguite differenti reazioni di amplificazione al fine di amplificare i seguenti target:

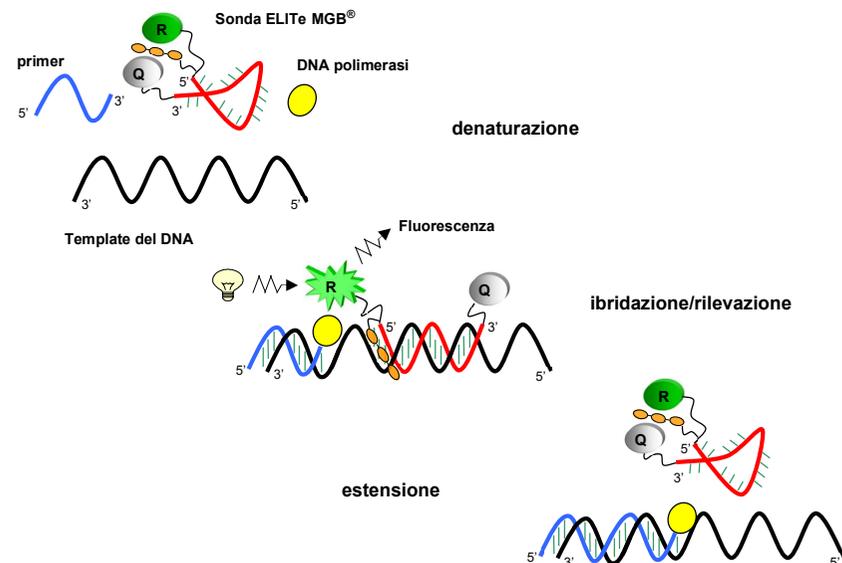
- sequenza ripetuta IS481 di *B. pertussis* e *B. holmesii*, rilevata dalla sonda specifica IS481 (canale 1),
- gene ptxA di *B. pertussis*, rilevato dalla sonda specifica BP (canale 5),
- gene recA di *B. holmesii*, rilevato dalla sonda specifica BH (canale 6),
- sequenza ripetuta IS1001 di *B. parapertussis*, rilevata dalla sonda specifica BPP (canale 4).

La miscela BORD PCR Mix amplifica anche il controllo interno di estrazione e inibizione sulla base di una sequenza artificiale (IC2) e rilevato dalla sonda specifica IC (canale 2).

Le sonde con tecnologia ELITE MGB® sono attivate quando ibridano con il prodotto specifico della reazione di amplificazione. L'emissione della fluorescenza è misurata e registrata dall'apparecchio. Alla fine del ciclo di amplificazione, si analizzano le curve di fluorescenza allo scopo di identificare i Cicli soglia (Ct). L'interpretazione dei risultati consente di rilevare la presenza dei DNA dei patogeni di interesse.

Il saggio è stato validato in associazione al sistema ELITE InGenius, un sistema integrato e automatizzato di estrazione, amplificazione e rilevazione degli acidi nucleici.

Nella figura seguente è brevemente descritto il meccanismo di attivazione ed emissione della fluorescenza delle sonde con tecnologia ELITE MGB®. Da notare che le sonde non sono idrolizzate durante il ciclo di amplificazione.



DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto «**Bordetella ELITE MGB® Kit**» fornisce una miscela di reazione completa e pronta per l'uso per l'amplificazione real time, **BORD PCR Mix**, prealiquotata in otto provette. Ogni provetta contiene **280 µl** di soluzione, sufficienti per **12 test** in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 test per sessione) se utilizzata con il sistema **ELITE InGenius**.

Il prodotto BORD PCR Mix contiene i primer e la sonda specifici per:

- la sequenza ripetuta **IS481** di *B. pertussis* e *B. holmesii*. La sonda **IS481** (canale 1) è marcata con il fluoroforo FAM, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente,
- il gene **ptxA** di *B. pertussis*. La sonda **BP** (canale 5) è marcata con il fluoroforo AP639, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente,
- il gene **recA** di *B. holmesii*. La sonda **BH** (canale 6) è marcata con il fluoroforo AP690, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente,
- la sequenza ripetuta **IS1001** di *B. parapertussis*. La sonda **BPP** (canale 4) è marcata con il fluoroforo AP593, stabilizzata dal gruppo MGB® inattivata da un quencher non fluorescente,
- la sequenza artificiale **IC2** del controllo interno (IC) esogeno. La sonda **IC** (canale 2) è marcata con il fluoroforo AP525, stabilizzata dal gruppo MGB® inattivata da un quencher non fluorescente.

La miscela **BORD PCR Mix** contiene il tampone, il magnesio cloruro, i nucleotidi trifosfato, stabilizzanti e l'enzima Taq DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

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

MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
BORD PCR Mix	Miscela di reazione completa Tappo BIANCO	8 x 280 µl	-

MATERIALE RICHiesto NON INCLUSO NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o simili.
- Miscelatore vortex.
- Microcentrifuga da banco (12.000-14.000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a dispensazione positiva (2-20 µl, 5-50 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl).
- Acqua ultrapura per biologia molecolare.

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA dai campioni da analizzare, il controllo interno di estrazione e di inibizione, il controllo positivo di amplificazione e i consumabili **non** sono inclusi in questo prodotto.

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 Protocol specifici per il prodotto (ELITechGroup S.p.A.):

- parametri per il controllo positivo di amplificazione «**BORD ELITE_PC**»,
- parametri per il controllo negativo di amplificazione «**BORD ELITE_NC**»,
- parametri per i campioni di aspirato nasofaringeo da analizzare «**BORD ELITE_NPA_200_100**».

- 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 «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032CS),
 - cartucce di amplificazione «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR),
 - puntali «**300 µL Filter tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, , codice TF-350-L-R-S),
 - raccogliore «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000).

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

Come controllo positivo di amplificazione, è richiesto l'impiego del prodotto specifico «**Bordetella - ELITE Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR140ING), una soluzione stabilizzata contenente DNA plasmidico.

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 3% per almeno 30 minuti o in autoclave a 121° C per un'ora prima di essere smaltito.

Manipolare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali usati per effettuare 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.

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi / 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.

Attenersi alle istruzioni fornite nel prodotto durante l'esecuzione del saggio.

Rispettare la data di scadenza del prodotto.

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

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

Le procedure di biologia molecolare richiedono personale addestrato per evitare il rischio di risultati errati, in particolare a causa della degradazione degli acidi nucleici dei campioni o della contaminazione dei campioni da parte di prodotti di amplificazione.

Utilizzare camici, guanti e strumenti per la preparazione delle sessioni di lavoro. È indispensabile disporre di locali separati per i test di biologia molecolare e per le colture microbiologiche. Non manipolare mai le colture liquide o solide nei locali adibiti allo svolgimento delle reazioni di estrazione/amplificazione.

I campioni devono essere adatti e possibilmente dedicati a questo tipo di analisi. I campioni devono essere manipolati sotto una cappa a flusso laminare. 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 aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, esenti da DNasi ed RNasi, esenti da DNA ed RNA.

Le cartucce di amplificazione devono essere manipolate in modo da non disperdere nell'ambiente i prodotti di amplificazione per evitare la contaminazione di campioni e reagenti.

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

La **BORD PCR Mix** deve essere conservata al buio a -20 °C.

La **BORD PCR Mix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **sette volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

Aspirato nasofaringeo

I campioni di aspirato nasofaringeo destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere prelevati attenendosi alle linee guida del laboratorio, trasportati e conservati a temperatura ambiente (+18/+25 °C) per un massimo di due giorni o a +2/+8 °C per un massimo di sette giorni, altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di un mese oppure a -70 °C per periodi più lunghi.

Si consiglia di ripartire i campioni da congelare in aliquote per evitare di ripetere più cicli di congelamento e scongelamento. Se si usano campioni congelati, scongelarli immediatamente prima dell'estrazione in modo da evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Per effettuare l'analisi con questo prodotto è necessario trasferire 0,2 ml di campione nella provetta di sonicazione fornita con «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set».

Nota: Per estrarre il DNA dall'aspirato nasofaringeo mediante il sistema ELITE InGenius e il programma ELITE InGenius Software versione 1.3 (o successiva), selezionare l'Assay Protocol **BORD ELITE_NPA_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge 10 µL di controllo interno **CPE** ed eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Sostanze interferenti

I dati disponibili riguardo fenomeni di inibizione da parte di farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo "Sostanze interferenti" del capitolo "Caratteristiche delle Prestazioni".

Controlli di amplificazione

Prima di analizzare qualunque campione, è assolutamente indispensabile generare e approvare i controlli di amplificazione per il lotto del reagente di amplificazione che sarà impiegato nella prova:

- come controllo positivo utilizzare il prodotto **Bordetella – ELITE Positive Control** (non incluso in questo kit) in associazione con il protocollo **BORD ELITE_PC**,
- come controllo negativo utilizzare acqua per biologia molecolare (non inclusa in questo kit) in associazione con il protocollo **BORD 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 di 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 in uso 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 dei controlli di qualità (vedi paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche,
- è stato effettuato un intervento di manutenzione importante sullo strumento **ELITE InGenius**.

Controlli di qualità

Si consiglia la validazione periodica della procedura di estrazione e amplificazione. A tale scopo si possono utilizzare campioni già testati o materiale di riferimento certificato.

I controlli esterni di qualità devono essere utilizzati secondo quanto previsto dagli enti di accreditamento locali, statali e federali, come richiesto.

PROCEDURA

La procedura di utilizzo del prodotto **Bordetella 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, come descritto nella documentazione dello strumento, è necessario:

- accendere lo strumento **ELITE InGenius** e selezionare la modalità **"CLOSED"**,
- verificare che i controlli di amplificazione (Controls, BORD Positive Control, BORD Negative Control) siano eseguiti, in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto, e che i risultati siano approvati e non scaduti (Status). In assenza di risultati dei controlli di amplificazione approvati o scaduti, generarli come descritto nei paragrafi seguenti,
- scegliere il tipo di sessione, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per la preparazione e utilizzando gli Assay Protocol forniti da ELITechGroup S.p.A.. Questi protocolli IVD sono stati specificamente validati con i prodotti ELITE MGB® Kit, lo strumento ELITE InGenius e la matrice indicata.

L'Assay Protocol per l'analisi dei campioni clinici disponibili per il prodotto **Bordetella ELITE MGB® Kit** è descritto nella tabella sottostante.

Assay Protocol per il prodotto Bordetella ELITE MGB® Kit			
Nome	Matrice	Esito	Caratteristiche
BORD ELITE_NPA_200_100	Aspirato nasofaringeo	Positivo / Negativo	Volume iniziale d'Estrazione: 200 µL Volume di Eluizione dell'estratto: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di Diluzione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 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 **Bordetella ELITE MGB® Kit** in associazione al sistema **ELITE InGenius** può essere utilizzato per eseguire:

- Corsa integrata (Extract + PCR),
- Corsa di amplificazione (PCR only),
- 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 lo si seleziona.

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

Le principali operazioni per l'impostazione dei tre tipi di sessione sono descritte di seguito.

A. Corsa integrata

Per impostare la sessione integrata con estrazione e amplificazione del campione, procedere come segue, come indicato dalla GUI:

1. Scongelare le provette di BORD PCR Mix per la sessione. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 reazioni per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota: Scongelare le provette contenenti BORD PCR Mix al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Scongelare le provette di CPE per la sessione. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per isolarne il contenuto.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
4. 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 "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
6. Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (es. BORD ELITE_NPA_200_100).
7. Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
8. Nella colonna "Sample Position", selezionare la posizione in cui caricare il campione e quindi selezionare "Extraction Tube" Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.
9. Nell'"Inventory Block" selezionato caricare le miscele CPE e BORD PCR Mix seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
10. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
11. Caricare le PCR Cassette, le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200", tutti i consumabili e i campioni da estrarre, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Chiudere lo sportello dello strumento.
13. Premere "Start" per avviare la corsa.

Dopo il completamento della sessione, 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 estratto rimasto nell'"Elution Tube" deve essere prelevato dallo strumento, chiuso con il tappo, identificato 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 rimossi dallo strumento ed eliminati senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota bene: Le PCR Mix possono essere conservate nel blocco refrigerato per un massimo di 7 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna.

B. Corsa di amplificazione

Per impostare la corsa di amplificazione partendo dagli acidi nucleici estratti, eseguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongelare le provette di BORD PCR Mix per la sessione. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 reazioni per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota: Scongelare le provette contenenti la BORD PCR Mix al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
3. 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.
4. Per ogni Track di interesse compilare il SID digitando o scansionando il codice a barre del campione.
5. Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (es. BORD ELITE_NPA_200_100).
6. Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
7. Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Nell'"Inventory Block" selezionato caricare la miscela BORD PCR Mix seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
9. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
10. 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.
11. Chiudere lo sportello dello strumento.
12. Premere "Start" per avviare 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 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 rimossi dallo strumento ed eliminati senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota bene: Le PCR Mix possono essere conservate nel blocco refrigerato per un massimo di 7 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. Scongelare le provette di BORD PCR Mix per la sessione. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per isolarne il contenuto.

Nota: Scongelare le provette contenenti BORD PCR Mix al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Scongelare la provetta BORD Positive Control per la sessione. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
3. Trasferire almeno 50 µL di acqua 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 nella colonna "Assay" (saggio) BORD ELITe_PC e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di BORD Positive Control.
8. Per il controllo negativo selezionare BORD ELITe_NC e digitare il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua per biologia molecolare.
9. Fare clic su "Next" per proseguire l'impostazione.
10. Nell'"Inventory Block" selezionato caricare la miscela BORD PCR Mix seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
11. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
12. Caricare le "PCR Cassette", la provetta per BORD Positive Control e per il controllo negativo seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.
13. Chiudere lo sportello dello strumento.
14. Premere "Start" per avviare 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 Controllo Positivo rimasto deve essere prelevato dallo strumento, chiuso con il tappo, identificato e può essere conservato 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 rimossi dallo strumento ed eliminati senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota bene: Le PCR Mix possono essere conservate nel blocco refrigerato per un massimo di 7 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna.

Esame e approvazione dei risultati

Al termine della corsa è visualizzata automaticamente la schermata "Results Display", nella quale sono visualizzati i risultati relativi a campione / controllo e le informazioni relative alla sessione. 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 al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile inviare automaticamente i risultati approvati della sessione di lavoro 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 **Bordetella ELITe MGB® Kit** attraverso questa procedura:

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

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

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde dei geni patogeni (canali **IS481**, **BP**, **BH** e **BPP**) nella reazione di amplificazione con controllo positivo e negativo sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay Protocol "BORD ELITe_PC" e "BORD 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, scadranno **dopo 15 giorni**.

I risultati delle sessioni di amplificazione per Controllo Positivo e Controllo Negativo sono utilizzati dal software dello strumento per impostare le Carte di Controllo ("Control Charts") e monitorare le prestazioni della fase di amplificazione. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Nota Bene: Se il risultato della reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "Failed" 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 dei geni patogeni (canali **IS481**, **BP**, **BH** e **BPP**) e dalla sonda del controllo interno (canale **IC**) nelle reazioni di amplificazione sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi nell'Assay Protocol BORD ELITe_NPA_200_100.

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
BORD Positive Control	APPROVATO
2) Controllo Negativo	Status
BORD Negative Control	APPROVATO

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. Per ogni campione il sistema riporta una combinazione dei seguenti messaggi specificando se il DNA dei patogeni sono stati rilevati o non rilevati.

Resultato di una sessione sul campione	Interpretazione
IS481: DNA Detected.	Il DNA di <i>B. pertussis</i> o <i>B. holmesii</i> (IS481) è stato rilevato nel campione. Nota: quando viene rilevato il DNA di IS481, potrebbe essere tipizzato anche il DNA di <i>B. pertussis</i> (BP) o <i>B. holmesii</i> (BH).
IS481: DNA detected other related species.	Il DNA simile al DNA di <i>B. pertussis</i> o <i>B. holmesii</i> (IS481) proveniente da altri organismi è stato rilevato nel campione.
IS481: DNA not detected or below LoD.	Il DNA di <i>B. pertussis</i> e <i>B. holmesii</i> (IS481) non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per questi patogeni oppure la loro concentrazione è inferiore al limite di rilevanza del saggio.
BP: typing positive.	Il DNA di <i>B. pertussis</i> è stato rilevato nel campione. Nota: quando viene rilevato il target di BP, deve essere rilevato anche il target di IS481.
BP: typing not feasible.	Questo specifico target per <i>B. pertussis</i> non è stato rilevato nel campione. Controllare anche i risultati relativi al target IS481.
BH: typing positive.	Il DNA di <i>B. holmesii</i> è stato rilevato nel campione. Nota: quando viene rilevato il target di BH, deve essere rilevato anche il target di IS481.
BH: typing not feasible.	Questo specifico target per <i>B. holmesii</i> non è stato rilevato nel campione. Controllare anche i risultati relativi al target IS481.
BPP: DNA detected.	Il DNA di <i>B. parapertussis</i> è stato rilevato nel campione.
BPP: DNA not detected or below LoD.	Il DNA di <i>B. parapertussis</i> non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per questo patogeno oppure la concentrazione è inferiore al limite di rilevanza (LoD) del saggio.
Invalid - Retest Sample.	Risultato del saggio non valido per un errore del controllo interno dovuto a errata estrazione o effetto carryover sugli inibitori. Il test deve essere ripetuto.

I campioni non idonei per l'interpretazione dei risultati sono segnalati come "Invalid - Retest Sample" 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.

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 con risultato "IS481: DNA not detected or below LoD" (DNA non rilevato o inferiore al LdD) o "BPP DNA Not Detected or below the LoD" (DNA del BPP non rilevato o inferiore al LoD) sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA target. In tal caso non si può escludere che il DNA target sia presente in una concentrazione inferiore al limite di rilevanza del saggio (v. "Caratteristiche delle prestazioni").

I campioni con risultato "IS481: DNA detected other related species" (DNA rilevato altre specie correlate) sono idonei per l'analisi ed è stato possibile rilevare DNA simile al DNA di *B. pertussis* o *B. holmesii* (IS481) proveniente da altri organismi. In tal caso il campione è risultato positivo per il target IS481 ma non è stato rilevato il DNA target specifico di *B. pertussis* (BP) o di *B. holmesii* (BH).

Quando viene rilevato il DNA del gene multicopia IS481, in campioni a bassa positività il DNA target specifico di *B. pertussis* (BP) o il DNA target specifico di *B. holmesii* (BH) potrebbero non essere rilevati a causa delle differenze nel numero di copie dei geni target specifici (ad es. il promotore del gene ptxA e il gene recA sono presenti in copia singola in BP e BH, rispettivamente). Tuttavia, il campione è positivo per *B. pertussis* o per *B. holmesii*, ma l'identificazione non sarà possibile.

Nota: I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e di altri referti di laboratorio riguardanti il paziente.

I risultati della sessione analitica 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

Limite del bianco (LoB)

Il limite del bianco (LoB) del prodotto Bordetella ELITE MGB® kit è stato definito in associazione con i campioni di aspirato nasofaringeo (NPA) e con il sistema ELITE InGenius.

Il LoB è stato valutato mediante analisi di un pannello di 60 campioni clinici di NPA risultati negativi per il target IS481 (*B. pertussis* e *B. holmesii*) e per IS1001 (*B. parapertussis*) con un metodo colturale e con un saggio commerciale CE IVD presso un laboratorio esterno. Ogni campione è stato processato con il sistema ELITE InGenius® in modalità "Extract + PCR" (estratto + PCR). Data l'elevata sensibilità analitica, il LoB è stato definito applicando un cut-off di Ct pari a 40 per il target IS481 (*B. pertussis* e *B. holmesii*) e per il target BPP (IS1001, *B. parapertussis*) al fine di ottenere il 95% di probabilità di avere un risultato positivo.

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i> (target IS481)				
Matrice	N	Positivo	Negativo	% di negatività
Aspirati nasofaringei negativi	60	3	57	95
<i>B. parapertussis</i> (target BPP)				
Matrice	N	Positivo	Negativo	% di negatività
Aspirati nasofaringei negativi	60	1	59	98

I campioni che hanno dato un risultato positivo in associazione al prodotto Bordetella ELITE MGB® kit e al sistema ELITE InGenius presentavano valori elevati di Ct (tra 37 e 40) e quindi erano a concentrazione molto bassa.

Limite di Rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) del prodotto Bordetella ELITE MGB® kit è stato definito in associazione con i campioni di aspirato nasofaringeo (NPA) e con il sistema ELITE InGenius.

Il LoD è stato valutato mediante analisi di un pannello di campioni di NPA negativi inoculati con un materiale di riferimento di *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* (DMSZ, Germania) ad un titolo noto. Sono stati preparati sei livelli di diluizione a partire da una concentrazione più elevata rispetto al valore di LoD atteso. Ciascun livello di diluizione è stato processato in 12 replicati con il sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR". Il LoD è stato calcolato attraverso un'analisi di regressione Probit come la concentrazione corrispondente al 95% di probabilità di ottenere un risultato positivo.

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Target	LoD (CFU / ml)	Limiti dell'intervallo di confidenza 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
<i>B. pertussis</i> (target IS481)	12	7	58
<i>B. parapertussis</i> (target IS1001)	11	6	19
<i>B. holmesii</i> (target IS481)	12	5	34

Efficienza di rilevazione (inclusività)

La sensibilità del test con riferimento all'efficienza della rilevazione di ceppi o isolati differenti di *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* con il prodotto Bordetella ELITE MGB® kit è stata valutata mediante analisi *in silico* di sequenze disponibili nella banca dati nucleotidica EBI ENA.

Le regioni scelte per l'ibridizzazione dei primer e delle sonde fluorescenti sono state controllate con riferimento all'allineamento delle sequenze per la sequenza ripetuta IS481 (*B. pertussis* e *B. holmesii*), il gene *ptxA* (*B. pertussis*), il gene *recA* (*B. holmesii*), la sequenza ripetuta IS1001 (*B. parapertussis*). Le regioni di ibridazione hanno evidenziato la conservazione delle sequenze e l'assenza di mutazioni significative, per cui si prevede un'efficiente amplificazione di tutti gli organismi analizzati.

La sensibilità del test con riferimento all'efficienza della rilevazione di differenti ceppi o isolati di *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* è stata valutata anche mediante l'analisi di un pannello di materiali certificati testato a bassa concentrazione (circa 100 copie/reazione).

Campioni certificati di DNA genomico prodotto da Vircell Microbiologists (Spagna), DSMZ (Germania) e ATCC (USA) sono stati diluiti e analizzati in triplicato in associazione con il sistema ELITE InGenius in modalità "PCR Only".

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Microorganismi	Inclusività	
	Ceppo	Esito
<i>B. pertussis</i>	Vircell, ceppo F	IS481 rilevato, positivo per tipizzazione di BP
<i>B. parapertussis</i>	Vircell, CDC F5101	BPP rilevato
<i>B. holmesii</i>	Vircell, isolato clinico	IS481 rilevato, positivo per tipizzazione di BH
<i>B. pertussis</i>	DSMZ, isolato clinico	IS481 rilevato, positivo per tipizzazione di BP
<i>B. parapertussis</i>	DSMZ, isolato clinico	BPP rilevato
<i>B. holmesii</i>	DSMZ, isolato clinico	IS481 rilevato, positivo per tipizzazione di BH
<i>B. pertussis</i>	ATCC, Tohama I	IS481 rilevato, positivo per tipizzazione di BP
<i>B. parapertussis</i>	ATCC, 12822	BPP rilevato

Tutti i campioni analizzati sono risultati positivi per il rispettivo patogeno quando valutati con il prodotto Bordetella ELITE MGB® kit.

Marcatori potenzialmente interferenti (cross-reattività)

La potenziale cross-reattività del prodotto Bordetella ELITE MGB® kit con altri organismi potenzialmente presenti nei campioni respiratori è stata valutata mediante analisi *in silico* di sequenze disponibili nella banca dati nucleotidica EBI ENA.

L'analisi non ha mostrato alcuna omologia significativa per i target con la maggior parte di altri organismi (virus, batteri, protozoi e funghi), per cui non è presumibile alcuna cross-reattività. Tuttavia, sono state osservate omologie significative e potenziali interferenze con alcuni ceppi di *B. hinzii*, *B. bronchialis* e *B. bronchiseptica* per la rilevazione del target IS481, con alcuni ceppi di *B. petrii* per la rilevazione del target *recA* e con *Achromobacter denitrificans* per la rilevazione del target IS1001.

La cross-reattività con altri microrganismi presenti nei campioni respiratori è stata valutata anche mediante analisi di un pannello di DNA e RNA genomico certificato prodotto da ATCC (USA).

I campioni di DNA genomico sono stati analizzati in triplicato per ogni microrganismo potenzialmente interferente in associazione con il sistema ELITE InGenius in modalità "PCR Only".

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Marcatori potenzialmente interferenti: cross-reattività		
Microrganismi	Ceppo	Esito
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC, 118	Nessuna cross-reattività
<i>Candida albicans</i>	ATCC, 3147	Nessuna cross-reattività
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC, Rosenbach	Nessuna cross-reattività
<i>Escherichia coli</i>	ATCC, H10407	Nessuna cross-reattività
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	ATCC, RB50	Nessuna cross-reattività
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC, Rd	Nessuna cross-reattività
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC, R6	Nessuna cross-reattività
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC, Philadelphia-1	Nessuna cross-reattività
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC, FH	Nessuna cross-reattività
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	ATCC, AR-39	Nessuna cross-reattività
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	clinical isolate (isolato clinico)	Nessuna cross-reattività
CMV	ATCC, AD-169	Nessuna cross-reattività
Enterovirus	ATCC, Pesascek	Nessuna cross-reattività
ADV	ATCC, Adenoid 6	Nessuna cross-reattività
FluA	ATCC, A/PR/8/34	Nessuna cross-reattività
FluB	ATCC, B/Florida/4/2006	Nessuna cross-reattività
RSV	ATCC, A2	Nessuna cross-reattività
<i>Bordetella pertussis</i>	DSMZ, DSM 12804	Nessuna cross-reattività*
<i>Bordetella pertussis</i>	isolato clinico, REF504	Nessuna cross-reattività**
<i>Bordetella pertussis</i>	isolato clinico, REF505	Nessuna cross-reattività*
<i>Bordetella pertussis</i>	isolato clinico, BORD1836	Nessuna cross-reattività**
<i>Bordetella pertussis</i>	isolato clinico, BUR-15-132	Nessuna cross-reattività**
<i>Bordetella pertussis</i>	isolato clinico, BUR-19-174	Nessuna cross-reattività**

La maggior parte dei microrganismi potenzialmente interferenti testati non hanno mostrato alcuna cross-reattività per i target del prodotto Bordetella ELITE MGB® kit.

Come osservato nell'analisi di sequenza, alcuni ceppi di *Bordetella pertussis* (*) sono risultati positivi per il target BH. Tuttavia, per la diversa temperatura di fusione (Tm) tra recA di *B. holmesii* e recA di altre specie di *Bordetella*, l'Assay Protocol restituisce il risultato "Typing not feasible".

Inoltre, altri ceppi di *Bordetella pertussis* (**) hanno una sequenza simile a IS481 e sono risultati positivi per il target IS481. Tuttavia, per la diversa temperatura di fusione (Tm) tra IS481 di *B. pertussis* e *B. holmesii* e IS481-like di altre specie di *Bordetella*, l'Assay Protocol restituisce il risultato "other related species".

Marcatori potenzialmente interferenti (inibizione)

La mancata inibizione dovuta ad altri microrganismi potenzialmente presenti nei campioni respiratori è stata valutata anche mediante analisi di un pannello di DNA e RNA genomico certificato prodotto da ATCC.

I campioni di DNA e RNA genomico a concentrazione elevata (circa 100.000 copie/reazione) sono stati inoculati con DNA genomico di *B. pertussis* o *B. parapertussis* o *B. holmesii* (DSMZ) a bassa concentrazione (circa 100 copie/reazione) e analizzati in triplicato per ciascun marcatore potenzialmente interferente in associazione con il sistema ELITE InGenius in modalità "PCR Only".

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Marcatori potenzialmente interferenti: inibizione		
Microrganismi	Ceppo	Esito
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC, 118	Positivo, assenza di inibizione
<i>Candida albicans</i>	ATCC, 3147	Positivo, assenza di inibizione
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC, Rosenbach	Positivo, assenza di inibizione
<i>Escherichia coli</i>	ATCC, H10407	Positivo, assenza di inibizione
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	ATCC, RB50	Positivo, assenza di inibizione
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC, Rd	Positivo, assenza di inibizione
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC, R6	Positivo, assenza di inibizione
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC, Philadelphia-1	Positivo, assenza di inibizione
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC, FH	Positivo, assenza di inibizione
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	ATCC, AR-39	Positivo, assenza di inibizione
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	clinical isolate (isolato clinico)	Positivo, assenza di inibizione

CMV	ATCC, AD-169	Positivo, assenza di inibizione
Enterovirus	ATCC, Pesascek	Positivo, assenza di inibizione
ADV	ATCC, Adenoid 6	Positivo, assenza di inibizione
FluA	ATCC, A/PR/8/34	Positivo, assenza di inibizione
FluB	ATCC, B/Florida/4/2006	Positivo, assenza di inibizione
RSV	ATCC, A2	Positivo, assenza di inibizione
<i>Bordetella pertussis</i>	DSMZ, DSM 12804	Positivo, assenza di inibizione
<i>Bordetella pertussis</i>	isolato clinico, REF504	Positivo, assenza di inibizione
<i>Bordetella pertussis</i>	isolato clinico, REF505	Positivo, assenza di inibizione
<i>Bordetella pertussis</i>	isolato clinico, BORD1836	Positivo, assenza di inibizione
<i>Bordetella pertussis</i>	isolato clinico, BUR-15-132	Positivo, assenza di inibizione
<i>Bordetella pertussis</i>	isolato clinico, BUR-19-174	Positivo, assenza di inibizione

Tutti i patogeni di interesse sono stati rilevati correttamente in presenza degli organismi potenzialmente interferenti elencati sopra quando analizzati mediante il prodotto Bordetella ELITE MGB® kit.

Potenziale interferenza tra i target

La potenziale interferenza tra i target del prodotto Bordetella ELITE MGB® kit è stata valutata mediante un test di co-amplificazione su materiali di riferimento di *B. pertussis*, *B. parapertussis* (ATCC) e *B. holmesii* (DSMZ).

Il pannello ha compreso campioni con DNA genomico per *B. pertussis* or *B. parapertussis* o *B. holmesii* a concentrazioni elevate (10⁵ copie/reazione) e gli altri patogeni di interesse a basse concentrazioni (10³, 10², 10 genomi/reazione).

Ogni condizione è stata analizzata in triplicato in associazione con il sistema ELITE InGenius in modalità "PCR Only".

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Target in test	Potenziale interferenza tra i target		
	Target interferente (~10 ⁵ copie/reazione)		
	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>
<i>B. pertussis</i> (IS481)	-	10 c./reazione	-
<i>B. parapertussis</i> (IS1001)	10 gc./reazione	-	100 c./reazione
<i>B. holmesii</i> (IS481)	-	10 c./reazione	-

B. pertussis, *B. parapertussis* e *B. holmesii* sono stati rilevati mediante il prodotto Bordetella ELITE MGB® kit in concentrazione di almeno 10 copie/reazione anche in presenza di altri patogeni di interesse in concentrazione elevata. In presenza di 10⁵ copie/reazione di *B. holmesii*, *B. parapertussis* è stato rilevato in concentrazione di almeno 100 genomi/reazione.

B. pertussis è stato tipizzato mediante il prodotto Bordetella ELITE MGB® kit in concentrazione di almeno 10 copie/reazione in presenza di *B. parapertussis* in concentrazione elevata e in concentrazione di almeno 2.000 copie/reazione in presenza di *B. holmesii* in concentrazione elevata.

B. holmesii è stato tipizzato mediante il prodotto Bordetella ELITe MGB® kit in concentrazione di almeno 10 copie/reazione in presenza di *B. parapertussis* in concentrazione elevata e in concentrazione di almeno 1.000 copie/reazione in presenza di *B. pertussis* in concentrazione elevata.

Sostanze interferenti

Un pannello di sostanze potenzialmente interferenti nelle rispettive concentrazioni massime è stato testato mediante il prodotto Bordetella ELITe MGB® kit. Sono state analizzate le seguenti sostanze: mucina, sangue intero umano, azitromicina (antibiotico), beclometasone (corticosteroide), ebastina (antistaminico) e ambroxolo cloridrato (mucolitico).

Le sostanze sono state aggiunte singolarmente ai campioni di aspirato nasofaringeo inoculati con i materiali di riferimento *B. pertussis*, *B. parapertussis* o *B. holmesii* (DSMZ) in concentrazione pari a 3 volte il LoD. I campioni sono stati processati in 3 replicati con il sistema ELITe InGenius in modalità "Extraction + PCR".

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Sostanze interferenti				
Sostanza	Concentrazione	Pos./Rep.		
		<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>
Mucina	1% p/v (10 mg/ml)	3 / 3	3 / 3	3 / 3
Sangue intero	10% v/v	3 / 3	3 / 3	3 / 3
Azitromicina	0,2 µg/ml	3 / 3	3 / 3	3 / 3
Beclometasone	64 ng/ml	3 / 3	3 / 3	3 / 3
Ebastina	0,4 µg/ml	3 / 3	3 / 3	3 / 3
Ambroxolo	0,6 µg/ml	3 / 3	3 / 3	3 / 3

Nessuna delle sostanze analizzate alle concentrazioni testate interferisce con il prodotto Bordetella ELITe MGB® kit.

Ripetibilità

La ripetibilità dei risultati ottenuti con il prodotto Bordetella ELITe MGB® kit in associazione con il sistema ELITe InGenius è stata valutata analizzando un pannello di tre campioni di aspirato nasofaringeo inoculati con i materiali di riferimento di *B. pertussis*, *B. parapertussis* o *B. holmesii* (DSMZ) in concentrazione pari a 3 volte il LoD.

I risultati relativi alla ripetibilità sono stati ottenuti mediante analisi su tre replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento e dallo stesso operatore. I risultati sono stati analizzati per lo stesso lotto di prodotto (Ripetibilità intra-sessione) e per i tre lotti di prodotto (Ripetibilità inter-lotto). I campioni sono stati processati con il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori di Ct di ciascun target e del controllo interno (IC2) sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente di variabilità (%CV) allo scopo di valutare la riproducibilità come imprecisione.

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

Ripetibilità intra-sessione				
Target	N	Ct medio	Dev std	%CV
<i>B. pertussis</i> (IS481)	6	36,14	0,34	0,95
<i>B. parapertussis</i> (IS1001)	6	34,70	0,37	1,08
<i>B. holmesii</i> (IS481)	6	36,02	0,27	0,75
Internal Control	24	28,77	0,25	0,88

Ripetibilità inter-lotto				
Target	N	Ct medio	Dev std	%CV
<i>B. pertussis</i> (IS481)	18	36,66	0,95	2,60
<i>B. parapertussis</i> (IS1001)	18	34,89	0,64	1,82
<i>B. holmesii</i> (IS481)	18	36,23	0,75	2,08
Controllo interno	72	28,58	0,33	1,15

La ripetibilità del prodotto Bordetella ELITe MGB® kit per ciascun target presenta un valore di %CV inferiore al 3%.

Riproducibilità

La riproducibilità dei risultati ottenuti con il prodotto Bordetella ELITe MGB® kit in associazione con il sistema ELITe InGenius è stata valutata analizzando un pannello di tre campioni di aspirato nasofaringeo inoculati con il materiale di riferimento di *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* (DSMZ) in concentrazione pari a 3 volte il LoD.

I risultati relativi alla riproducibilità sono stati analizzati su tre replicati in due sessioni al giorno. Tre differenti lotti di prodotto sono stati analizzati in tre giorni differenti, su tre strumenti differenti e da tre operatori differenti. I campioni sono stati processati con il sistema ELITe InGenius in modalità "Extraction + PCR".

I valori di Ct di ciascun target e del controllo interno (IC2) sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente di variabilità (%CV) allo scopo di valutare la riproducibilità come imprecisione.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Riproducibilità inter-strumento				
Target	N	Ct medio	Dev std	%CV
<i>B. pertussis</i> (IS481)	18	36,48	0,86	2,35
<i>B. parapertussis</i> (IS1001)	18	34,80	0,68	1,95
<i>B. holmesii</i> (IS481)	18	36,23	0,85	2,34
Controllo interno	72	28,06	0,48	1,72

La riproducibilità dei risultati ottenuti con il prodotto Bordetella ELITe MGB® kit per ciascun target presenta un valore di %CV che inferiore al 3%.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio come conferma di campioni clinici positivi è stata valutata analizzando campioni clinici di aspirato nasofaringeo positivi per *B. pertussis* e positivamente con materiale certificato di *B. parapertussis* o *B. holmesii* (DSMZ). I campioni positivi e quelli negativi utilizzati per la positivizzazione sono stati certificati mediante un metodo colturale e un saggio commerciale CE IVD presso il laboratorio esterno. Campioni artificiali per *B. parapertussis* e *B. holmesii* sono stati positivamente in concentrazione di 30, 10 e 3 volte il valore di LoD.

I campioni sono stati raccolti così come descritto in "Campioni e controlli", quindi sono stati testati con il prodotto Bordetella ELITe MGB® kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extraction + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni	N	Positivi	Negativi	Invalidi	Sensibilità Diagnostica %
Aspirato nasofaringeo positivo per <i>B. pertussis</i>	26	24	0	2	100%
Aspirato nasofaringeo positivamente con <i>B. parapertussis</i>	30	30	0	0	100%
Aspirato nasofaringeo positivamente con <i>B. holmesii</i>	30	30	0	0	100%

In questo test, 24 su 26 campioni di aspirato nasofaringeo positivi per *B. pertussis* hanno confermato la loro positività. 2 campioni sono risultati non validi e sono stati esclusi dall'analisi.

In questo test, tutti i campioni di aspirato nasofaringeo positivamente con *B. parapertussis* and *B. holmesii* hanno confermato la loro positività.

La sensibilità diagnostica del saggio per *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* è risultata pari al 100 % in associazione con i campioni di aspirato nasofaringeo.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio come conferma di campioni clinici negativi è stata valutata analizzando campioni di aspirato nasofaringeo certificati negativi per *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* mediante un metodo colturale e un saggio commerciale CE IVD presso il laboratorio esterno.

I campioni sono stati raccolti così come descritto in "Campioni e controlli", quindi sono stati testati con il prodotto Bordetella ELITe MGB® kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extraction + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni	N	Positivi	Negativi	Invalidi	Specificità Diagnostica %
Aspirato nasofaringeo negativo per <i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i>	60	0	59	1	100%
Aspirato nasofaringeo negativo per <i>B. parapertussis</i>	86	1	82	3	98,8%

In questo test, 59 su 60 campioni di aspirato nasofaringeo negativi per *B. pertussis* / *B. holmesii* hanno confermato la loro validità e la loro negatività. 1 campione è risultato non valido ed è stato escluso dall'analisi.

In questo test, 82 su 86 campioni di aspirato nasofaringeo negativi per *B. parapertussis* hanno confermato la loro validità e la loro negatività. 3 campioni sono risultati non validi e sono stati esclusi dall'analisi. 1 campione ha dato un risultato positivo discrepante.

In questo test, la specificità diagnostica del saggio per *B. pertussis* / *B. holmesii* è risultata pari al 100% in associazione con i campioni di aspirato nasofaringeo.

In questo test, la specificità diagnostica per *B. parapertussis* è risultata pari al 98,8% in associazione con i campioni di aspirato nasofaringeo.

Nota: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche prestazionali del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico del kit "Bordetella ELITE MGB Kit", FTP 140ING.

BIBLIOGRAFIA

- U. Reischl et al. (2001) J Clin Microbiol. 39: 1963–1966.
N. K. Fry et al. (2009) J Med Microbiol. 58: 1023-9.
A. Van der Zee (1993) J Bacteriol. 175: 141-7.
J. L. Guthrie et al. (2010) J Clin Microbiol. 48: 1435-7
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITI DELLA PROCEDURA

Questo prodotto è riservato esclusivamente all'uso in vitro.

Utilizzare questo prodotto soltanto con campioni clinici di aspirato nasofaringeo.

Al momento, non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con i seguenti campioni clinici: tampone nasofaringeo, espettorato, lavaggio broncoalveolare (BAL), aspirato bronchiale (BA).

I risultati ottenuti con questo prodotto dipendono dalla corretta identificazione, raccolta, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni; per evitare risultati errati è quindi necessario porre particolare cura durante queste fasi e seguire attentamente le istruzioni fornite con i prodotti per l'estrazione degli acidi nucleici.

La metodica di amplificazione real time degli acidi nucleici utilizzata in questo prodotto, a causa della sua elevata sensibilità analitica, è soggetta a contaminazione da parte di campioni clinici positivi, dei controlli positivi e degli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le contaminazioni portano a risultati falsi positivi. Le modalità di realizzazione del prodotto sono in grado di limitare le contaminazioni; tuttavia questi fenomeni possono essere evitati solo con una buona pratica delle tecniche di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni fornite in questo manuale.

Questo prodotto richiede personale competente e 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 indumenti di lavoro e aree di lavoro adeguate 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 l'uso di locali separati per i test di biologia molecolare e per le colture microbiologiche per evitare risultati falsi positivi.

Questo prodotto richiede indumenti e strumenti speciali da laboratorio dedicati all'allestimento delle sessioni di lavoro per evitare risultati falsi positivi.

A causa di differenze intrinseche tra tecnologie, si raccomanda agli utilizzatori di eseguire studi di correlazione al fine di valutare le differenze a livello tecnologico prima di cambiare prodotto.

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che gli acidi nucleici target del saggio non sono stati rilevati negli acidi nucleici estratti dal campione ma non si può escludere che il DNA target sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi Caratteristiche delle prestazioni). In questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

In caso di co-infezione, la sensibilità per un target può essere influenzata dall'amplificazione di un secondo target (vedi Caratteristiche delle prestazioni).

In alcuni casi, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii* and *B. bronchialis* possono ospitare le sequenze ripetute di IS481 e quindi possono generare risultati positivi per questo target.

In alcuni casi, *B. bronchiseptica* e *Achromobacter denitrificans* possono ospitare le sequenze ripetute di IS1001 e quindi possono generare risultati positivi per il target BPP.

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi per via di un difetto del controllo interno. In questo caso il campione dovrà essere analizzato di nuovo, a cominciare dall'estrazione, con conseguente possibile ritardo nel conseguimento dei risultati finali.

Possibili polimorfismi nella regione del DNA target coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione del DNA target.

Come per qualunque altro dispositivo medico diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli altri esami di laboratorio relativi al paziente.

Come per qualunque altro dispositivo medico diagnostico, esiste un rischio residuo di ottenere con questo prodotto risultati non validi, falsi positivi e falsi negativi. Questo rischio residuo non può essere eliminato o ridotto ulteriormente. Questo rischio residuo in situazioni particolari può contribuire a decisioni errate con conseguenze potenzialmente gravi per il paziente.

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Reazione del Positive Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore durante l'impostazione della sessione.	Controllare la posizione di PCR Mix e Positive Control. Controllare i volumi di PCR Mix e Positive Control.
Degradazione del Positive Control.	Usare una nuova aliquota di Positive Control.
Degradazione della PCR Mix.	Usare una nuova aliquota di PCR Mix.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica ELITechGroup S.p.A.

Reazione del Negative Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore durante l'impostazione della sessione.	Controllare la posizione di PCR Mix e Negative Control. Controllare i volumi delle PCR Mix e Negative Control.
Contaminazione del Negative Control.	Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Contaminazione dell'Extraction Area, dei Rack o del Blocco dell'Inventory Area.	Pulire superfici con detergenti acquosi, lavare camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica ELITechGroup S.p.A.

Reazione dei campioni non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore durante l'impostazione della sessione.	Controllare la posizione di PCR Mix e campione. Controllare i volumi di PCR Mix e campione.
Degradazione dell'Internal Control.	Utilizzare una nuova aliquota di Internal Control.
Inibizione causata da sostanze interferenti con il campione.	Ripetere l'amplificazione diluendo il campione eluito 1:2 in acqua per biologia molecolare, impostando la sessione "PCR only". Ripetere l'estrazione diluendo il campione clinico 1:2 in acqua per biologia molecolare, impostando la sessione "Extract + PCR".
Degradazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica ELITechGroup S.p.A.

Alto tasso anormale di risultati positivi nella stessa sessione (reazioni con valori Ct tardivi simili)	
Possibili cause	Soluzioni
Contaminazione da campione a campione durante le fasi pre-analitiche	Evitare qualsiasi contatto tra la micropipetta e la parete del tubo. Pulire la micropipetta con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% o un detergente per DNA / RNA dopo aver pipettato ciascun campione. Non utilizzare pipette Pasteur. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzate con puntali con filtro per aerosol. Introdurre campioni nelle ultime posizioni degli strumenti, come indicato dalla GUI di ELITE InGenius. Seguire la sequenza di caricamento indicata dal software.
Contaminazione ambientale di laboratorio	Pulire tutte le superfici a contatto con l'operatore e i campioni (comprese le pipette) con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% o detergente per DNA / RNA. Esegui un ciclo di decontaminazione UV. Utilizzare una nuova provetta di PCR Mix e / o CPE.

Errore 30103	
Possibili cause	Soluzioni
Elevata concentrazione del target nel campione.	Se si osserva nel PCR plot un'amplificazione significativa: - selezionare il track del campione ed approvare manualmente il risultato. Se è richiesto un valore di Ct: - ripetere l'amplificazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione "PCR only" oppure - ripetere l'estrazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione clinico in una sessione in modalità "Extract + PCR".

TH Error	
Possibili cause	Soluzioni
Campione con anomala forma del plot.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa con basale negativo: - ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità ""PCR Only" (solo PCR)" oppure - ripetere l'estrazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione primario in una sessione in modalità "Extract + PCR" (estratto + PCR).

LEGENDA DEI SIMBOLI

	Numero di catalogo.
	Limite superiore di temperatura.
	Codice del lotto.
	Da utilizzarsi entro (ultimo giorno del mese).
	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.
	Contenuto.
	Conservare al riparo dalla luce del sole.
	Fabbricante.

AVVISO 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®, il logo ELITE MGB® ed ELITE InGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup all'interno dell'Unione Europea.