




ELITechGroup S.p.A.
 C.so Svizzera, 185
 10149 Torino ITALY
 Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
 E. mail: emd.support@elitechgroup.com
 sito WEB: www.elitechgroup.com

AVVERTENZA del 14/11/18

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«CRE ELITE MGB[®] Kit» Ref. RTS200ING

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Cambio della sonda utilizzata per la rilevazione dei geni della famiglia OXA-48-like.*

NOTA BENE

	LA REVISIONE DI QUESTA 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
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



CRE ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS200ING



SOMMARIO

USO PREVISTO
PRINCIPIO DEL SAGGIO
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO
MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI
AVVERTENZE E PRECAUZIONI
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. 3
pag. 3
pag. 3
pag. 4
pag. 5
pag. 6
pag. 12
pag. 18
pag. 19
pag. 20
pag. 22
pag. 22

USO PREVISTO

Il prodotto «**CRE ELITE MGB® Kit**» è parte di un saggio qualitativo di amplificazione real-time multiplex degli acidi nucleici per la rilevazione del DNA dei geni per la resistenza agli antibiotici carbapenemici **KPC**, **NDM**, **VIM**, **IMP**, **OXA-48-like*** delle *Enterobacteriaceae* in campioni di DNA estratto da tampone rettale e da emocolture.

Il prodotto trova impiego nella diagnosi e nello screening delle infezioni da enterobatteri portatori dei geni per la resistenza agli antibiotici carbapenemici, insieme ai dati clinici del paziente e agli esiti di altri esami di laboratorio.

Il prodotto è anche compatibile con campioni di DNA estratto da isolati colturali per la caratterizzazione di enterobatteri portatori dei geni per la resistenza agli antibiotici carbapenemici.

* Per l'elenco completo delle varianti rilevate con questo prodotto, vedere il paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni".

CRE ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS200ING

PRINCIPIO DEL SAGGIO

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

A partire dal DNA estratto da ciascun campione da testare, utilizzando la **CRE PCR Mix**, nella PCR Cassette si eseguono cinque diverse reazioni di amplificazione specifiche per i seguenti geni che conferiscono la resistenza agli antibiotici carbapenemici:

- geni della famiglia **KPC**, rilevati dalla sonda specifica **KPC** (Canale 1);
- geni della famiglia **NDM**, rilevati dalla sonda specifica **NDM** (Canale 4);
- geni della famiglia **VIM**, rilevati dalla sonda specifica **VIM** (Canale 4);
- geni della famiglia **IMP**, rilevati dalla sonda specifica **IMP** (Canale 4);
- geni della famiglia **OXA-48-like**, rilevati dalla sonda specifica **OXA** (Canale 5).

Inoltre con la **CRE PCR Mix** è anche amplificato il Controllo Interno esogeno basato su una sequenza artificiale (**IC2**), rilevato dalla sonda specifica **IC** (Canale 2).

Le sonde con tecnologia TaqMan™ MGB sono attivate quando ibridano con il prodotto specifico della reazione di amplificazione e sono idrolizzate dall'enzima DNA polimerasi. L'emissione della fluorescenza aumenta con l'aumentare dei prodotti specifici della reazione di amplificazione ed è misurata e registrata dall'apparecchio. L'elaborazione dei dati permette di rilevare la presenza del DNA dei geni per la resistenza agli antibiotici carbapenemici nel campione di partenza.

Il saggio è stato validato in associazione al sistema **ELITE InGenius**.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto «**CRE ELITE MGB® Kit**», fornisce la miscela di reazione completa per l'amplificazione real time **CRE PCR Mix**, pronta all'uso e prealiquotata in otto provette. Ogni provetta contiene **280 µL** di soluzione, sufficiente per **12 test** in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 test per sessione) in associazione al sistema **ELITE InGenius**.

La miscela **CRE PCR Mix** contiene gli oligonucleotidi di innesco e la sonda specifici per:

- i geni della famiglia **KPC**. La sonda **KPC** (Canale 1) è marcata con il fluoroforo FAM, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata dal quencher non fluorescente,
- i geni della famiglia **NDM**. La sonda **NDM** (Canale 4) è marcata con il fluoroforo AP593, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata dal quencher non fluorescente,
- i geni della famiglia **VIM**. La sonda **VIM** (Canale 4) è marcata con il fluoroforo AP593, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata dal quencher non fluorescente,
- i geni della famiglia **IMP**. La sonda **IMP** (Canale 4) è marcata con il fluoroforo AP593, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata dal quencher non fluorescente,
- i geni della famiglia **OXA-48-like**. La sonda **OXA** (Canale 5) è marcata con il fluoroforo AP639, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata dal quencher non fluorescente,
- la sequenza sintetica **IC2** del controllo interno. La sonda **IC** (Canale 2) è marcata con il fluoroforo AP525, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata dal quencher non fluorescente.

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

Nota bene: I tre geni appartenenti alla famiglia delle Metallo Beta-Lattamasi, **NDM**, **VIM** e **IMP**, sono rilevati da sonde marcate con lo stesso fluoroforo e quindi rilevate dallo stesso canale **NDM VIM IMP** e non possono essere distinti.

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

MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei pericoli
CRE PCR Mix	miscela completa di reazione	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 RPM).
- 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 Protocols specifici per il prodotto (ELITechGroup S.p.A.):

- «**CRE ELITE_PC**», parametri per il controllo positivo di amplificazione,
- «**CRE ELITE_NC**», parametri per il controllo negativo di amplificazione,
- «**CRE ELITE_RcS_200_100**» e «**CRE ELITE_BC_200_100**», parametri per il campione in analisi.

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),
- raccogliitore «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000).

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.

Come controllo positivo di amplificazione è richiesto l'impiego del prodotto specifico «**CRE - ELITE Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., codice CTR200ING), una soluzione stabilizzata contenente DNA plasmidici.

Come dispositivi per la raccolta dei tamponi rettali, si raccomanda l'impiego dei seguenti prodotti generici:

- eNAT™ kit (COPAN Italia S.p.A., codice 606CS01R), tampone e provetta contenente 2 mL di medium,
- FecalSwab™ (COPAN Italia S.p.A., codice 470CE), tampone e provetta contenente 2 mL di medium.

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 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.

E' necessario disporre di camici, guanti e strumenti dedicati all'allestimento delle sessioni di lavoro.

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

La **CRE PCR Mix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **quattro 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:

Tamponi rettali raccolto in eNAT™ kit

Si raccomanda di raccogliere i campioni di tampone rettale destinati all'estrazione del DNA in eNAT™ kit. I campioni devono essere identificati secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C 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® SP 200 Consumable Set».

Tamponi rettali raccolto in FecalSWAB™ kit

Si raccomanda di raccogliere i campioni di tampone rettale destinati all'estrazione del DNA in FecalSWAB™ kit. I campioni devono essere identificati secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni. Prima dell'analisi con questo prodotto trasferire 0,5 mL di campione in un tubo eNAT™ nuovo contenente 2 mL di medium e vortexare. I campioni diluiti nel medium eNAT™ possono essere conservati a +2 / +8 °C per un massimo di 4 settimane e conservati a -20 °C per un massimo di sei mesi oppure a -70 °C per tempi più lunghi. Dopo l'aggiunta di 0,5 mL di campione in medium FecalSwab™, il tubo eNAT™ può essere caricato direttamente sullo strumento come tubo primario.

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 il protocollo di estrazione **CRE ELITE RcS_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE**, ed eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Emocolture

Le emocolture devono essere identificate secondo le indicazioni del laboratorio, trasportate e conservate a temperatura ambiente per un massimo di 24 ore.

Prima dell'analisi con questo prodotto diluire l'emocoltura 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® SP 200 Consumable Set».

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 **CRE ELITE BC_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE**, ed eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

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

Isolati culturali

Prima dell'analisi con questo prodotto risospendere l'isolato culturale in un tubo eNAT™ nuovo contenente 2 mL di medium, prelevando con un'ansa una parte di una colonia batterica, vortexare e trasferire 0,2 mL di campione diluito nel tubo di sonicazione fornito con «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da isolato culturale con **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius® Software** versione 1.2 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **CRE ELITE BC_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 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".

Nota bene: Elevate quantità di matrice fecale raccolta con i tamponi rettali (campioni molto torbidi) possono inibire il saggio.

Controlli di amplificazione

Prima di analizzare un campione con il prodotto, è assolutamente indispensabile generare e approvare i controlli di amplificazione per il lotto di reagente di amplificazione che sarà impiegato nella prova: come controllo positivo, utilizzare il prodotto **CRE - ELITE Positive Control** (non incluso in questo kit) in associazione con l'Assay Protocol protocollo **CRE ELITE_PC**, come controllo negativo, utilizzare acqua per biologia molecolare (non inclusa in questo kit) in associazione con l'Assay Protocol **CRE 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 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.

PROCEDURA

La procedura di utilizzo del prodotto **CRE 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 controlli di amplificazione (Controls, CRE Positive Control, CRE Negative Control) siano stati eseguiti con il lotto di reagente di amplificazione previsto e che i risultati siano approvati e validi (Status). In assenza di risultati dei controlli di amplificazione approvati e validi, generare gli stessi come descritto di seguito,
- scegliere il tipo di sessione, seguendo le istruzioni riportate dall'interfaccia grafica (GUI) per la preparazione della sessione 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.

Gli Assay Protocol per l'analisi dei campioni clinici disponibili per il prodotto **CRE ELITE MGB® Kit** sono descritti nella tabella seguente.

Assay Protocol per il prodotto CRE ELITE MGB® Kit			
Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
CRE ELITE RcS_200_100	Tampone rettale	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: 20 µL

Assay Protocol per il prodotto CRE ELITE MGB® Kit			
Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
CRE ELITE_BC_200_100	Emocoltura	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: 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 **CRE 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 Server" (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 corsa sono descritti di seguito.

A Corsa integrata

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

- Scongelare le provette di CRE PCR Mix per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 12 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 reazioni per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota bene: Scongelare le provette contenenti la CRE PCR Mix al riparo dalla luce perché i reagenti sono fotosensibili.

- Scongelare le provette di CPE per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
- Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
- Assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
- Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
- Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio CRE ELITE_RcS_200_100).
- Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
- Nella colonna "Sample Position", selezionare la posizione di caricamento del campione:
 - se è utilizzato il tubo primario, selezionare "Primary Tube",
 - se è utilizzato il tubo secondario, selezionare "Sonication Tube".
 Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Nell'"Inventory Block" selezionato, caricare il CPE e la CRE PCR Mix seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.

- Nell'"Inventory Area" selezionata, caricare e controllare i Rack dei puntali seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- 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.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- 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 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: La PCR Mix può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 4 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:

- Scongelare le provette di CRE PCR Mix per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 12 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 reazioni per sessione di lavoro). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota bene: Scongelare le provette contenenti la CRE PCR Mix al riparo dalla luce perché i reagenti sono fotosensibili.

- Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
- 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.
- Per ogni Track di interesse compilare il SID digitando o scansionando il codice a barre del campione.
- Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio CRE ELITE_RcS_200_100).
- Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
- Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" sia "Elutions Tube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Nell'"Inventory Block" selezionato, caricare la CRE PCR Mix seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Nell'"Inventory Area" selezionata, caricare e controllare i Rack dei puntali seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- 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.
- Chiudere la porta dello strumento,
- 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, chiuso con il tappo, 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 4 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:

1. Scongellare le provette di CRE PCR Mix per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 12 reazioni, in condizioni ottimali di utilizzo del reagente (almeno 2 reazioni per sessione di lavoro). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota bene: Scongellare le provette contenenti la CRE PCR Mix al riparo dalla luce perché i reagenti sono fotosensibili.

2. Scongellare la provetta di CRE Positive Control per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare la provetta 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” CRE ELITE_PC e inserire il numero di lotto e la data di scadenza del CRE Positive Control.
8. Per il Controllo Negativo, selezionare nella colonna “Assay” CRE ELITE_NC e inserire il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua per biologia molecolare.
9. Fare clic su “Next” per continuare l'impostazione.
10. Nell'“Inventory Block” selezionato, caricare la CRE PCR Mix seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su “Next” per procedere con l'operazione successiva.
11. Nell'“Inventory Area” selezionata, caricare e controllare i Rack dei puntali seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su “Next” per procedere con l'operazione successiva.
12. Caricare le “PCR Cassette”, la provetta di CRE Positive Control e la provetta di acqua per biologia molecolare (CRE Negative Control) 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, 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 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: La PCR Mix può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 4 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 **CRE 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 per i geni delle resistenze (canali **KPC**, **NDM VIM IMP** e **OXA**) nella reazione di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo sono analizzati automaticamente e interpretati dall'ELITE InGenius software con i parametri inclusi negli Assay Protocols “CRE ELITE_PC” e “CRE 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 per i geni delle resistenze (canali **KPC**, **NDM VIM IMP** e **OXA**) e dalla sonda per il Controllo Interno (canale **IC**) nelle reazioni di amplificazione dei campioni sono analizzati automaticamente e interpretati dall'ELITE InGenius software con i parametri inclusi nell'Assay Protocol CRE ELITE_RcS_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
CRE Positive Control	APPROVED
2) Controllo Negativo	Status
CRE 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. Per ogni campione il sistema riporta una combinazione di tre messaggi che specificano se i geni CRE sono rilevati o non rilevati.

Risultato della corsa del campione	Interpretazione
KPC DNA Detected.	Il DNA del gene KPC è stato rilevato nel campione.
NDM, VIM or IMP DNA Detected.	Il DNA dei geni NDM, VIM o IMP è stato rilevato nel campione.
OXA DNA Detected.	Il DNA del gene OXA è stato rilevato nel campione.
KPC DNA Not Detected or below LoD.	Il DNA dei geni KPC non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo valido per questo gene oppure la sua presenza è al di sotto del limite di rilevazione del prodotto.
NDM, VIM and IMP DNA Not Detected or below LoD.	Il DNA dei geni NDM, VIM e IMP non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo valido per questi geni oppure la loro presenza è al di sotto del limite di rilevazione del prodotto.
OXA DNA Not Detected or below LoD.	Il DNA dei geni OXA non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo valido per questo gene oppure la sua presenza è al di sotto del limite di rilevazione del prodotto.
Invalid - Retest Sample.	Risultato del saggio non valido a causa di un problema con il Controllo Interno (estrazione errata o presenza di un inibitore). La sessione dovrebbe essere ripetuta.

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 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 dei geni per le resistenze sono segnalati come "DNA KPC Not Detected or below LoD", "DNA NDM, VIM and IMP Not Detected or below LoD" e/o "DNA OXA Not Detected or below LoD". In questo caso non si può escludere che il DNA dei geni per le resistenze 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

Limite di Rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) del prodotto CRE ELITE MGB® Kit utilizzato con campioni di tamponi rettali in associazione al sistema ELITE InGenius® è stato verificato testando 6 isolati CRE, corrispondenti ai seguenti tipi di geni target: KPC, IMP, VIM, NDM, OXA-48 e OXA-181. Gli organismi CRE sono stati coltivati, piastrati e quantificati tramite conteggio di colonie. Sono state eseguite almeno sei diluizioni seriali per ogni variante, a partire da una concentrazione superiore all'LoD, in matrici rettali negative. I replicati di ogni diluizione sono stati processati con ELITE InGenius® in modalità "Extraction + PCR". Il LoD per ogni isolato CRE è stato calcolato attraverso un'analisi di regressione come la concentrazione corrispondente al 95% di probabilità di ottenere un risultato positivo. Il limite di rilevazione calcolato è stato confermato con l'analisi di 20 replicati per ogni variante alla concentrazione corrispondente.

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Limite di Rilevazione per campioni di tamponi rettali risospesi e ELITE InGenius® (CFU / mL)				
Target	Isolati Batterici	LoD (CFU / mL)	95% Intervallo di confidenza (CFU / mL)	
			Limite inferiore	Limite superiore
KPC	<i>C. freundii</i> , UCLA 14-13-A2	99	69	217
NDM	<i>E. coli</i> , ATCC BAA-2469	144	110	228
VIM	<i>K. pneumoniae</i> , NCTC 13439	399	338	579
IMP	<i>E. coli</i> , NCTC 13476	273	234	351
OXA-48	<i>E. coli</i> , ATCC BAA-2523	300	241	456
OXA-181	<i>K. pneumoniae</i> , JMI 18	179	139	287

Efficienza di rilevazione (Inclusività)

L'efficienza di rilevazione su diverse varianti dei geni per la resistenza agli antibiotici carbapenemici è stata valutata *in silico* per confronto di sequenze con banche dati nucleotidiche.

L'esame delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco e delle sonde fluorescenti sull'allineamento delle sequenze disponibili in banca dati dei geni per le resistenze agli antibiotici carbapenemici ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative per le varianti riportate nella tabella seguente.

Target	Varianti rilevate dal prodotto CRE ELITE MGB® Kit
KPC	KPC-01, KPC-02, KPC-03, KPC-04, KPC-05, KPC-06, KPC-07, KPC-08, KPC-09, KPC-10, KPC-11, KPC-12, KPC-13, KPC-14, KPC-15, KPC-16, KPC-17, KPC-18, KPC-19, KPC-21, KPC-22, KPC-25, KPC-33, KPC-47e, KPC-56a, KPC-63d, KPC-272, KPC-484, KPC-629, KPC-727, KPC-860.
NDM	NDM-01, NDM-02, NDM-03, NDM-04, NDM-05, NDM-06, NDM-07, NDM-08, NDM-09, NDM-10, NDM-12, NDM-13, NDM-15, NDM-16, NDM-17, NDM-32, NDM-40, NDM-221, NDM-255, NDM-264, NDM-265
VIM	VIM-01, VIM-02, VIM-03, VIM-04, VIM-05, VIM-06, VIM-07, VIM-08, VIM-09, VIM-10, VIM-11, VIM-12, VIM-13, VIM-14, VIM-15, VIM-16, VIM-17, VIM-18, VIM-19, VIM-20, VIM-23, VIM-24, VIM-25, VIM-26, VIM-27, VIM-28, VIM-31, VIM-33, VIM-34, VIM-35, VIM-36, VIM-37, VIM-38, VIM-39, VIM-40, VIM-42, VIM-43, VIM-44, VIM-45, VIM-46, VIM-47, VIM-49, VIM-50, VIM-51
IMP	IMP-01, IMP-02, IMP-03, IMP-04, IMP-05, IMP-06, IMP-07, IMP-08, IMP-09, IMP-10, IMP-11, IMP-13, IMP-14, IMP-15, IMP-16, IMP-18, IMP-19, IMP-20, IMP-21, IMP-22, IMP-24, IMP-25, IMP-26, IMP-28, IMP-29, IMP-32, IMP-33, IMP-34, IMP-37, IMP-38, IMP-40, IMP-41, IMP-42, IMP-45, IMP-48, IMP-49, IMP-51, IMP-54, IMP-56, IMP-58
OXA	OXA-48, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-199, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-370, OXA-405, OXA-416, OXA-439, OXA-484

L'efficienza di rilevazione delle diverse varianti dei geni per la resistenza agli antibiotici carbapenemici è stata inoltre verificata con un set di 18 isolati CRE ben caratterizzati. I campioni sono stati preparati in matrici rettili negative a concentrazioni vicine al LoD. Sono stati testati due o tre isolati di ciascun tipo di gene target (KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48-like).

I risultati finali sono riportati nella seguente tabella.

Efficienza di rilevazione (Inclusività) del prodotto CRE ELITE MGB® Kit				
Organismi	Isolati	Marker CRE	Concentrazione (CFU/mL)	Risultati
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0034	IMP	798	Incluso
<i>P. aeruginosa</i>	CDC-ARIB-0103	IMP-1	762	Incluso
<i>P. aeruginosa</i>	CDC-ARIB-0092	IMP-14	762	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	NCTC 13438	KPC	297	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	BAA-1898	KPC-2	297	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	BAA-1904	KPC-3	347	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	BAA-2146	NDM1	294	Incluso
<i>E. coli</i>	CDC-ARIB-0150	NDM-5	294	Incluso
<i>E. coli</i>	CDC-ARIB-0137	NDM-6	294	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	ST-14 (alias R20)	OXA-181	537	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0140	OXA-181	537	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0066	OXA-232	900	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0075	OXA-232	900	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	BAA-2524	OXA-48	900	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0160	OXA-48	900	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	NCTC 13440	VIM-1	843	Incluso
<i>P. aeruginosa</i>	NCTC 13437	VIM-10	843	Incluso
<i>P. aeruginosa</i>	CDC-ARIB-0054	VIM-4	843	Incluso

Tutti gli isolati di CRE sono stati rilevati dal prodotto CRE ELITE MGB® Kit a concentrazioni di 300 - 900 CFU / mL.

L'efficienza di rilevazione delle diverse varianti dei geni per la resistenza agli antibiotici carbapenemici è stata inoltre verificata con un set di 114 isolati CRE caratterizzati. Ogni campione è stato diluito in eNAT™ kit e poi testato con CRE ELITE MGB® Kit e ELITE InGenius® system in modalità Extraction + PCR. Gli isolati culturali sono rappresentativi dei differenti generi di Enterobacteriaceae (es. *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *C. koseri*).

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
Isolati culturali positivi per KPC	22	22	0	0
Isolati culturali positivi per OXA-48-like	35	35	0	0
Isolati culturali positivi per NDM	23	23	0	0
Isolati culturali positivi per IMP	11	11	0	0
Isolati culturali positivi per VIM	17	17	0	0
Isolati culturali positivi per OXA-48 e NDM	6	6	0	0

Tutti gli isolati di CRE sono stati rilevati dal prodotto CRE ELITE MGB® Kit.

Marcatori potenzialmente Interferenti

Per valutare la potenziale cross-reattività del saggio con target diversi da quelli specifici, è stata effettuata un'analisi *in silico* delle sequenze disponibili in banche dati nucleotidiche.

L'analisi dell'allineamento di sequenze degli oligonucleotidi di innesco e delle sonde con quelle disponibili nelle banche dati nucleotidiche, comprendenti organismi normalmente presenti in campioni clinici come i comuni organismi opportunistici della flora batterica rettale, virus, cellule, parassiti intestinali e organismi correlati produttori di beta-lattamasi, ha dimostrato l'assenza di omologie significative e quindi di marcatori potenzialmente interferenti.

L'assenza di cross-reattività con altri organismi correlati produttori di beta-lattamasi è stata verificata testando in triplicato gli isolati indicati nella tabella sottostante alla concentrazione di 10⁶ CFU / mL.

Marcatori potenzialmente Interferenti del prodotto CRE ELITE MGB® Kit				
Organismi	Isolati	Marker di resistenza agli antibiotici	Concentrazione (CFU/mL)	Risultati
<i>K. pneumoniae</i>	700603	SHV	10 ⁶	No cross-reattività
<i>E. coli</i>	BAA-202	SHV	10 ⁶	No cross-reattività
<i>E. coli</i>	BAA-201	TEM	10 ⁶	No cross-reattività
<i>S. marcescens</i>	14-13-A11	SME	10 ⁶	No cross-reattività
<i>S. marcescens</i>	14-13-A12	SME	10 ⁶	No cross-reattività
<i>A. baumannii</i>	13301	OXA-23	10 ⁶	No cross-reattività
<i>A. baumannii</i>	13302	OXA-25	10 ⁶	No cross-reattività
<i>A. baumannii</i>	13303	OXA-26	10 ⁶	No cross-reattività
<i>A. baumannii</i>	13304	OXA-27	10 ⁶	No cross-reattività
<i>A. baumannii</i>	13305	OXA-58	10 ⁶	No cross-reattività
<i>A. baumannii</i>	13420	OXA-51-like SE clone	10 ⁶	No cross-reattività
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-185	CTX-M-1	10 ⁶	No cross-reattività
<i>E. coli</i>	DICON-003	CTX-M-1	10 ⁶	No cross-reattività
<i>E. coli</i>	DICON-178	CTX-M-9	10 ⁶	No cross-reattività
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-005	CTX-M-9	10 ⁶	No cross-reattività
<i>E. cloacae</i>	NCTC 13464	CTX-M-9	10 ⁶	No cross-reattività
<i>E. coli</i>	13353	CTX-M-15	10 ⁶	No cross-reattività
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0044	CTX-M-15	10 ⁶	No cross-reattività

Tutti gli isolati tranne uno sono risultati negativi in 3 replicati su 3 utilizzando CRE ELITE MGB® Kit. L'isolato *K. pneumoniae* DICON185 ha dato un segnale positivo in un replicato su tre. Ritestato, lo stesso isolato ha dato 5 volte su 5 un risultato negativo ed è stato considerato come non cross-reattivo.

Sostanze Interferenti

Sostanze potenzialmente interferenti alla più alta concentrazione clinicamente rilevante sono state aggiunte singolarmente a campioni di matrici rettali negative contenenti isolati CRE alla concentrazione di circa 3x LoD. Le sostanze testate sono: clisteri (olio di vaselina), lubrificante spermicida (Nonoxynol-9), Medicinali Anti-diarrea (Bismuto sub-salicilato), lassativi (Sennosidi), antibiotici (Vancomicina), anti acidi (acido alginico / alluminio idrossido / magnesio tri-silicato, Calcio Carbonato, Cimetidina, Omeprazolo), componenti fecali (Acido Palmatico, Acido stearico, Mucine, DNA genomico umano, leucociti umani, sangue intero umano). Un isolato per ogni tipo di gene target (KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48 e OXA-181) è stato testato in triplicato con CRE ELITE MGB® Kit e il sistema ELITE InGenius.

Il test ha mostrato che la presenza di sostanze potenzialmente interferenti alla più alta concentrazione clinicamente rilevante non causa risultati falsi negativi.

La possibile interferenza del 2-propanolo, utilizzato durante l'estrazione, con la reazione di amplificazione è stata valutata testando DNA estratto da matrici rettali negative contenenti isolati CRE alla concentrazione di circa 400 CFU / mL. Un isolato per ogni tipo di gene target (KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48 e OXA-181) è stato testato in triplicato con CRE ELITE MGB® Kit e il sistema ELITE InGenius.

Il test ha mostrato che la presenza del 2-propanolo sotto il 10% non causa risultati falsi negativi.

Ripetibilità

La ripetibilità, come imprecisione intra-sessione, del prodotto CRE ELITE MGB® Kit in associazione allo strumento ELITE InGenius è stata testata eseguendo tre sessioni al giorno per cinque giorni con due pannelli analizzati in triplicato. Il primo pannello includeva tre campioni positivi a bassa concentrazione per isolati CRE (KPC + NDM + OXA, VIM e IMP) e un campione negativo. Il secondo pannello testato in modo analogo conteneva gli stessi organismi a concentrazioni moderate e un campione negativo.

I risultati in termini di valori di Ct per ogni tipo di gene target (e per il controllo interno) e per le due concentrazioni sono stati analizzati utilizzando la procedura ANOVA.

L'imprecisione intra-sessione si è rivelata essere quella di maggior peso all'interno dell'imprecisione di laboratorio. La variabilità del prodotto CRE ELITE MGB® Kit per ciascun gene target, come Coefficiente di Variabilità percentuale (CV%), non supera il 2,0%.

Il riassunto dei risultati è riportato nella tabella sottostante.

Riproducibilità del CRE ELITE MGB® Kit				
Target	Tipo di campione	Ct Medio	SD	%CV
KPC	Basso Positivo	34,82	0,48	1,4%
	Moderato Positivo	33,84	0,49	1,4%
NDM	Basso Positivo	36,87	0,51	1,4%
	Moderato Positivo	35,21	0,24	0,7%
OXA	Basso Positivo	34,80	0,32	0,9%
	Moderato Positivo	33,17	0,32	1,0%
VIM	Basso Positivo	35,26	0,19	0,5%
	Moderato Positivo	33,47	0,20	0,6%
IMP	Basso Positivo	35,72	0,73	2,0%
	Moderato Positivo	33,90	0,43	1,3%
IC	n.a.	29,56	0,43	1,5%
	n.a.	29,81	0,61	2,0%

Riproducibilità

La riproducibilità in termini di variabilità tra lotti e tra strumenti del prodotto CRE ELITE MGB® Kit in associazione al sistema ELITE InGenius, è stata testata da due operatori eseguendo due sessioni al giorno per otto giorni con tre strumenti diversi con tre lotti diversi di prodotto utilizzando due pannelli analizzati in triplicato. Il primo pannello includeva tre campioni positivi a bassa concentrazione per isolati CRE (KPC + NDM + OXA, VIM e IMP). Il secondo pannello testato in modo analogo conteneva gli stessi organismi ad una concentrazione moderata.

Lo studio è stato condotto da due operatori eseguendo tre sessioni in un giorno su tre diversi strumenti con tre lotti del prodotto con un campione negativo in quattro replicati.

I risultati in termini di valore di Ct per ogni tipo di gene target (e per il controllo interno) e per le due concentrazioni sono stati analizzati utilizzando la procedura ANOVA.

L'effetto degli strumenti e dei lotti è risultato essere statisticamente significativo. La variabilità del prodotto CRE ELITE MGB® Kit per ciascun gene target, come Coefficiente di Variabilità percentuale (CV%), non supera il 2,3%.

Il riassunto dei risultati è riportato nella tabella sottostante.

Riproducibilità di CRE ELITE MGB® Kit						
Target	Tipo di campione	Ct Medio	Strumento - strumento		Lotto - lotto	
			SD	%CV	SD	%CV
KPC	Basso Positivo	35,00	0,29	0,83%	0,21	0,61%
	Moderato Positivo	34,53	0,43	1,24%	0,31	0,90%
NDM	Basso Positivo	36,44	0,22	0,61%	0,00	0,00%
	Moderato Positivo	35,32	0,32	0,90%	0,00	0,00%
OXA	Basso Positivo	33,65	0,14	0,42%	0,09	0,26%
	Moderato Positivo	33,16	0,17	0,51%	0,21	0,62%
VIM	Basso Positivo	36,02	0,44	1,23%	0,49	1,36%
	Moderato Positivo	34,50	0,29	0,84%	0,41	1,19%
IMP	Basso Positivo	37,18	0,29	0,78%	0,55	1,48%
	Moderato Positivo	35,21	0,58	1,63%	0,78	2,22%
IC	n.a.	29,17	0,40	1,36%	0,91	3,12%

Assenza di contaminazione incrociata

L'assenza di cross-contaminazione tra campioni positivi e campioni negativi nella sessione e tra sessioni, è stata verificata eseguendo tre sessioni integrate (estrazione del DNA dal tubo primario e amplificazione) con sei campioni fortemente positivi per un isolato KPC ad un titolo di 10⁶ CFU / mL in medium eNAT™ alternati a 6 campioni negativi di medium eNAT™.

Nessuna cross-contaminazione tra track o tra una sessione e la successiva è stata rilevata dopo aver testato 18 campioni positivi e 18 campioni negativi alternati con il sistema ELITE InGenius.

Errore totale di sistema

L'errore totale di sistema che porta a risultati falsi negativi è stato verificato analizzando 50 campioni di matrice rettale negativa positivamente con un isolato IMP ed è risultato uguale a 0%.

I 50 campioni di matrice rettale negativa sono stati positivamente con un isolato IMP ad una concentrazione finale di circa 400 CFU / mL. Ogni campione del pannello è stato testato per l'intera procedura di analisi, estrazione ed amplificazione, partendo dal tubo primario con il sistema ELITE InGenius.

Tutti i campioni testati sono risultati positivi con il prodotto CRE ELITE MGB® Kit.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando tamponi rettali positivi per CRE e, data la difficoltà nel trovare un numero significativo di campioni clinici positivi per ciascun gene target, analizzando tamponi rettali positivamente con isolati CRE.

CRE ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS200ING

I 30 tamponi rettali positivi sono stati identificati tramite un metodo di coltura (Carba Smart medium, bioMérieux) e caratterizzati tramite saggi "home-made" validati basati su MALDI-TOF e Real Time PCR.

Altri 120 tamponi rettali identificati come negativi con la coltura sono stati positivamente con 10 isolati CRE, due per ciascuno dei seguenti geni target: KPC, IMP, VIM, NDM, OXA-48-like. Per ogni isolato sono stati analizzati 12 campioni.

I campioni sono stati raccolti in FecalSWAB™, diluiti in eNAT™ kit e in seguito testati con CRE ELITE MGB® Kit e il sistema ELITE InGenius in modalità "Extraction + PCR".

I risultati sono riassunti nella tabella sottostante.

Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
Tamponi rettali KPC-positivi	25	25	0	0
Tamponi rettali VIM-positivi	4	4	0	0
Tamponi rettali OXA-48-positivi	1	1	0	0
Tamponi rettali positivamente per KPC (isolato 207-1 KPC-3)	12	12	0	0
Tamponi rettali positivamente per KPC (isolato B1 KPC-2)	12	11	1	0
Tamponi rettali positivamente per NDM (isolato NDM-1)	12	12	0	0
Tamponi rettali positivamente per NDM (isolato NDM-5)	12	12	0	0
Tamponi rettali positivamente per VIM (isolato VIM-1)	12	12	0	0
Tamponi rettali positivamente per VIM (isolato VIM-4)	12	12	0	0
Tamponi rettali positivamente per IMP (isolato <i>K. Pn.</i> AR-Bank 0034)	12	12	0	0
Tamponi rettali positivamente per IMP (isolate <i>E. coli</i> NCTC 13476)	12	12	0	0
Tamponi rettali positivamente per OXA-48-like (isolato OXA-48)	12	12	0	0
Tamponi rettali positivamente per OXA-48-like (isolate OXA-232)	12	12	0	0

Tutti i campioni testati sono risultati positivi con il prodotto CRE ELITE MGB® Kit. Due campioni (CAR.50 e CAR.84) hanno dato un risultato non valido e presentavano un'elevata torbidità. Ritestando i campioni diluiti, CAR.50 (positivamente con l'isolato B1 KPC-2) è risultato negativo e CAR.84 (positivamente con l'isolato VIM-4) è risultato positivo. In questo test la sensibilità del saggio è risultata uguale al 99,3%.

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici positivi, è stata valutata anche analizzando emocolture positive per CRE e, data la difficoltà nel trovare un numero significativo di campioni clinici positivi per ciascun gene target, analizzando emocolture positivamente con isolati CRE.

Le 29 emocolture positive sono state identificate tramite esame microscopico e caratterizzate tramite un metodo colturale e saggi basati su MALDI-TOF.

Altre 20 emocolture identificate come negative sono state positivamente con isolati CRE dei seguenti geni target: OXA-48, NDM, VIM e IMP. Per ogni isolato sono stati analizzati 5 campioni.

I campioni sono stati diluiti in acqua ultrapura per biologia molecolare e in seguito testati con CRE ELITE MGB® Kit e il sistema ELITE InGenius in modalità "Extraction + PCR".

I risultati sono riassunti nella tabella sottostante.

Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
Emocolture KPC-positiva	16	16	0	0
Emocolture OXA-48 positive	5	5	0	0
Emocolture NDM-positiva	4	4	0	0
Emocolture IMP-positiva	2	2	0	0
Emocolture VIM- positive	2	2	0	0
Emocolture positivamente per OXA-48	5	5	0	0
Emocolture positivamente per NDM	5	5	0	0
Emocolture positivamente per VIM	5	5	0	0
Emocolture positivamente per IMP	5	5	0	0

Tutti i campioni testati sono risultati positivi con il prodotto CRE ELITE MGB® Kit. In questo test la sensibilità del saggio è risultata uguale al 100%.

CRE ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS200ING

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata analizzando tamponi rettali negativi ed emocolture negative per CRE.

I 52 tamponi rettali negativi sono stati identificati con il metodo di coltura (Carba Smart medium, bioMérieux).

Le 45 emocolture sono risultate negative alla crescita dopo 36 ore.

I campioni di tamponi rettali sono stati raccolti in FecalSWAB™, diluiti in eNAT™ kit e testati con CRE ELITE MGB® Kit e il sistema ELITE InGenius in modalità "Extraction + PCR".

I campioni di emocolture sono stati diluiti in acqua ultrapura per biologia molecolare e testati con CRE ELITE MGB® Kit e il sistema ELITE InGenius® in modalità "Extraction + PCR".

I risultati sono riassunti nella tabella sottostante.

Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
Tamponi rettali CRE-negativi	52	0	52	0
Emocolture CRE-negativi	45	2	43	0

In prima analisi 51 campioni di tamponi rettali sono risultati negativi con il prodotto CRE ELITE MGB® Kit. Un campione è risultato invalido (CAR.31) e presentava un'alta torbidità. Questo campione diluito e ritestato è risultato negativo. In questo test la specificità del saggio è risultata uguale al 100%.

Tutti i campioni di emocolture testati sono risultati validi con il prodotto CRE ELITE MGB® Kit. Di questi 43 su 45 sono stati confermati negativi, mentre due campioni sono risultati positivi con un Ct vicino al limite di rilevazione del test. In questo test la specificità del saggio è risultata uguale al 96%.

Nota bene: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e lo strumento sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "CRE ELITE MGB® Kit", FTP RTS200ING.

BIBLIOGRAFIA

L. S. Tzouveleki et al. (2012) *Clin. Microbiol. Rev.* 25(4): 682 - 707.

LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare con questo prodotto soltanto i seguenti campioni clinici: tamponi rettali ed emocolture.
Non utilizzare con questo prodotto campioni con elevata torbidità: la matrice fecale inibisce la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e può causare risultati non validi.

Non sono disponibili dati riguardo le prestazioni di questo prodotto con i seguenti campioni clinici: surnatanti fecali.

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 indumenti di lavoro e strumenti dedicati all'allestimento delle sessioni di lavoro per evitare risultati falsi positivi.

A causa delle differenze intrinseche alle diverse tecnologie, si raccomanda di eseguire studi di correlazione per stimare queste differenze prima di passare a un nuovo 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.

Un risultato non valido ottenuto con questo prodotto indica che non è stato possibile rilevare in modo efficiente il Controllo Interno. In questo caso l'analisi del campione dovrà essere ripetuta con possibili ritardi nell'ottenimento del risultato.

Eventuali polimorfismi nelle regioni del DNA target in cui ibridano gli oligonucleotidi di innesco e le 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.

PROBLEMI E SOLUZIONI

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 di 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 medium fresco eNAT™, 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.

Errore 30103	
Possibili cause	Soluzioni
Elevata concentrazione del target nel campione.	Se si osserva nel plot PCR una 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 medium fresco eNAT™ del campione clinico in una sessione in modalità "Extract + PCR".
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.

LEGENDA DEI SIMBOLI

-  Numero di catalogo.
-  Limite superiore di temperatura.
-  Codice del lotto.
-  Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).
-  Conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98\79\CE relativa ai dispositivi medici diagnostici *in vitro*.
-  Contenuto sufficiente per "N" test.
-  Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.
-  Contenuto.
-  Tenere lontano dalla luce solare.
-  Fabbricante.

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

I reagenti per la rivelazione ELITE MGB® sono coperti da uno o più brevetti USA n. 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 brevetti EP n. 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 oltre a richieste attualmente in corso di approvazione.

Questa licenza limitata consente alla persona o all'entità legale a cui questo prodotto è stato fornito di usare il prodotto, e i dati generati dall'uso del prodotto, solo per la diagnostica umana. Né ELITechGroup S.p.A. né i suoi licenziatari attribuiscono qualsiasi altra licenza, esplicita o implicita per qualsiasi altro scopo.

ELITE MGB®, ELITE InGenius® e il logo ELITE MGB® sono marchi registrati da ELITechGroup nell'Unione Europea.

TaqMan™ è un marchio commerciale di Roche Molecular Systems, Inc

eNAT™ e FecalSWAB™ sono marchi commerciale di COPAN Italia S.p.A.