




**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](mailto:emd.support@elitechgroup.com)  
 sito WEB: [www.elitechgroup.com](http://www.elitechgroup.com)

## AVVERTENZA del 30/07/18

**IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:**

### «ESBL ELITe MGB<sup>®</sup> Kit» Ref. RTS201ING

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Correzioni formali nella sezione "Campioni e Controlli".*

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
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



**ESBL ELITe MGB® Kit**  
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS201ING



**SOMMARIO**

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 2
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. 18
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 19
PROBLEMI E SOLUZIONI	pag. 20
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 21
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 22

**USO PREVISTO**

Il prodotto «ESBL ELITe MGB® Kit» è parte di un saggio qualitativo di amplificazione real-time multiplex degli acidi nucleici per la rilevazione del DNA dei geni β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) **CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14 e CTX-M-15\*** delle *Enterobacteriaceae* in campioni di DNA estratto da tampone rettale ed emocolture.

Il prodotto trova impiego nella diagnosi e nello screening delle infezioni da enterobatteri portatori dei geni β-lattamasi a spettro esteso (ESBL), insieme ai dati clinici del paziente e agli esiti di altri esami di laboratorio.

Il prodotto è anche compatibile per la caratterizzazione di enterobatteri portatori dei geni β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) in campioni di DNA estratto da isolati culturali.

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

**ESBL ELITe MGB® Kit**  
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS201ING

**PRINCIPIO DEL SAGGIO**

Il saggio prevede l'esecuzione di una reazione multiplex di amplificazione real time con un sistema integrato automatizzato di estrazione, amplificazione real time ed interpretazione dei risultati.

A partire dal DNA estratto dai campioni in esame, nella cartuccia si effettuano quattro reazioni di amplificazione specifiche per i seguenti geni β-lattamasi a spettro esteso:

- geni della famiglia CTX-M-1 e CTX-M-15, rilevato da una sonda marcata con il fluoroforo AP593,
- geni della famiglia CTX-M-9 e CTX-M-14, rilevato da una sonda marcata con il fluoroforo AP593.

Inoltre nella cartuccia è anche amplificato il controllo interno di estrazione e inibizione basato su una sequenza artificiale e rilevato da una sonda marcata con il fluoroforo AP525.

Le sonde con tecnologia TaqMan™ MGB sono attivate quando ibridano con il prodotto specifico della reazione di amplificazione e sono idrolizzate dall'enzima Taq 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 β-lattamasi a spettro esteso nel campione di partenza.

Il saggio è stato validato sul sistema integrato automatizzato di estrazione, amplificazione e rilevazione degli acidi nucleici.

**DESCRIZIONE DEL PRODOTTO**

Il prodotto «ESBL ELITe MGB® Kit», fornisce la miscela di reazione completa e pronta all'uso ESBL PCR Mix per l'amplificazione real time, **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 ESBL PCR Mix contiene:

- gli oligonucleotidi di innesco e la sonda specifici per i geni della famiglia **CTX-M-1 e CTX-M-15**. La sonda è marcata con il fluoroforo AP593, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata dal quencher non fluorescente,
- gli oligonucleotidi di innesco e la sonda specifici per i geni della famiglia **CTX-M-9 e CTX-M-14**. La sonda è marcata con il fluoroforo AP593 stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata dal quencher non fluorescente,
- gli oligonucleotidi di innesco e la sonda specifici per la sequenza sintetica **IC2** del controllo interno. La sonda è marcata con il fluoroforo AP525, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata dal quencher non fluorescente,
- il tampone, il magnesio cloruro, i nucleotidi trifosfati, gli stabilizzanti e l'enzima Taq DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

**Nota bene:** I quattro geni β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) sono rilevati da due diverse sonde (una per i geni della famiglia CTX-M-1 e CTX-M-15 e una per i geni della famiglia CTX-M-9 e CTX-M-14) marcate con lo stesso fluoroforo e quindi 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
ESBL 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, 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:

- parametri per il controllo positivo di amplificazione «**ESBL ELITe\_PC**» (ELITechGroup S.p.A.),
- parametri per il controllo negativo di amplificazione «**ESBL ELITe\_NC**» (ELITechGroup S.p.A.),
- parametri per il campione in analisi «**ESBL ELITe\_RcS\_200\_100**» e «**ESBL ELITe\_BC\_200\_100**» (ELITechGroup S.p.A.).

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

- cartucce di estrazione «**ELITe InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032SP200),
- materiali di consumo per estrazione ed amplificazione «**ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032CS),
- cartucce di amplificazione «**ELITe InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR),
- puntali «**300 µL Universal Filter Tips**» (Axygen BioScience Inc., CA, codice TF-350-L-R-S),
- 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 «**ESBL - ELITe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A. codice CTR201ING), una soluzione stabilizzata contenente DNA plasmidici.

Come dispositivi per la raccolta dei tamponi rettali, è richiesto 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 oppure trattato 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 potenzialmente 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 **ESBL PCR Mix** deve essere conservata al buio a -20 °C.

La **ESBL 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 è validato per l'utilizzo con i seguenti campioni clinici:

#### Tamponi rettali raccolto in eNAT™ kit (COPAN Italia S.p.A., codice 606CS01R, 2 mL)

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™ (COPAN Italia S.p.A., codice 470CE, 2 mL)

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 1.1 (o versioni successive equivalenti) utilizzare l'Assay protocol **ESBL 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

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

Prima dell'analisi con questo prodotto diluire il campione 1:1000 in acqua ultrapura per biologia molecolare (almeno 10 µL di campione in 10 mL di acqua ultrapura) vortexare e trasferire 0,2 mL di campione diluito nel tubo di sonicazione fornito con «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

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

**Nota bene:** quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di emocoltura con **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius Software** versione 1.2 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **ESBL ELITE\_BC\_200\_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

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

### Isolati culturali

Prima dell'analisi con questo prodotto diluire il campione in un tubo eNAT™ nuovo contenente 2 mL di medium, prelevando con un'ansetta un'aliquota di colonia isolata, 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 **ESBL ELITE\_BC\_200\_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

### Sostanze interferenti

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 obbligatorio generare e approvare i controlli di amplificazione relativi al lotto di reagente di amplificazione che si intende utilizzare:

come Controllo Positivo di amplificazione, utilizzare il prodotto **ESBL - ELITE Positive Control** (non fornito con il kit) in associazione con l'Assay protocol **ESBL ELITE\_PC**,  
come Controllo Negativo di amplificazione, utilizzare acqua ultrapura per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con l'Assay protocol **ESBL ELITE\_NC**.

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

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

Inoltre i controlli di amplificazione devono essere eseguiti nuovamente quando:

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

### Controlli di qualità

È consigliato convalidare periodicamente l'intera procedura di analisi, estrazione ed amplificazione, utilizzando un campione negativo e un campione positivo già testati oppure del materiale di riferimento.

## PROCEDURA

La procedura di utilizzo del prodotto **ESBL ELITE MGB® Kit** con il sistema **ELITE InGenius** comprende tre fasi:

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

### Verifica che il sistema sia pronto

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

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

Protocollo del saggio per ESBL ELITe MGB® Kit			
Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
ESBL 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 Fattore di Diluzione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
ESBL 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 **ESBL 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 si seleziona l'Assay protocol.

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

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

#### A Corsa integrata

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

- Scongelare le provette di ESBL 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 il contenuto per 5 secondi.
- Scongelare le provette di CPE per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto 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 ESBL ELITe RcS\_200\_100).
- Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
- Selezionare la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position":
  - se è utilizzato il tubo primario, selezionare "Primary Tube",
  - se è utilizzato un tubo secondario, selezionare "Sonicator Tube".
 Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.

- Caricare il CPE e la ESBL PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- 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, 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:** La PCR Mix può essere conservata nel blocco refrigerato fino a **21 ore totali** (7 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna).

#### B Corsa di amplificazione

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

- Scongelare le provette di ESBL 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 il contenuto per 5 secondi.
- 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 ESBL ELITe RcS\_200\_100).
- Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
- Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" sia "ExtraTube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare la ESBL PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- 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 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 Reaction 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 fino a **21 ore totali** (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. Scongellare il tubo di ESBL 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 il contenuto per 5 secondi.
2. Scongellare il tubo di ESBL Positive Control per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Trasferire almeno 50 µL di acqua ultrapura per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito nell'ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
5. Nelle "Track" di interesse, selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay".
6. Per il controllo positivo, selezionare il protocollo ESBL ELITE\_PC nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza del ESBL Positive Control.
7. Per il controllo negativo, selezionare il protocollo del test ESBL ELITE\_NC nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua ultrapura per biologia molecolare.
8. Fare clic su "Next" per continuare l'impostazione.
9. Caricare la ESBL PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare le "PCR Cassette", il tubo di ESBL Positive Control e il tubo di controllo negativo seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Chiudere la porta dello strumento,
13. Premere "Start" per iniziare la corsa.

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

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

**Nota bene:** Alla fine della corsa il Controllo Positivo rimasto deve essere prelevato dallo strumento, tappato, 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 fino a **21 ore totali** (7 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna).

### Esame e approvazione dei risultati

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

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

Il sistema **ELITE InGenius** genera i risultati con il prodotto **ESBL 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  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (CTX-M-1-9-14-15) nella reazione di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay protocols "ESBL ELITE\_PC" e "ESBL ELITE\_NC".

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

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

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

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

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

#### B. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde per i geni  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (CTX-M-1-9-14-15) e dalla sonda per il Controllo Interno (canale IC) nelle reazioni di amplificazione dei campioni sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nell'Assay protocol ESBL ELITE\_RcS\_200\_100.

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

I risultati sono visualizzati nei rapporti generati dallo strumento ("Result Display").  
La corsa del campione può essere approvata quando le due condizioni riportate nella tabella sottostante sono soddisfatte.

1) Controllo Positivo	Status
ESBL Positive Control	APPROVED
2) Controllo Negativo	Status
ESBL Negative Control	APPROVED

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

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

Risultato della corsa del campione	Interpretazione
CTX-M-1-9-14-15: DNA Detected.	Il DNA dei geni CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-9 o CTX-M-14 è stato rilevato nel campione.
CTX-M-1-9-14-15: DNA Not Detected or below LoD.	Il DNA dei geni CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-9 e CTX-M-14 non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per questi geni oppure la loro 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).

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  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-9 e CTX-M-14 sono segnalati come "CTX-M-1-9-14-15:DNA Not detected or below the LoD". In questo caso non si può escludere che il DNA dei geni  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-9 e CTX-M-14 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 ESBL ELITe MGB® Kit utilizzato con campioni di tamponi rettali in associazione al sistema ELITe InGenius è stato verificato testando 4 isolati ESBL, corrispondenti ai seguenti tipi di geni target: CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14 e CTX-M-15. Gli organismi ESBL sono stati coltivati, piastrati e quantificati tramite conteggio di colonie. Sono state eseguite sei diluizioni seriali per ogni variante, a partire da una concentrazione superiore all'LoD attesa, in matrici rettali negative. Ogni diluizione è stata processata in 12 replicati con ELITe InGenius in modalità "Extraction + PCR". Il LoD per ogni isolato ESBL è stato calcolato attraverso un'analisi di regressione probit 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 gene target alla concentrazione corrispondente.

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Limite di Rilevazione per campioni di tamponi rettali risospesi e ELITe InGenius (CFU / mL)				
Gene	Isolati Batterici	LoD (CFU / mL)	95% Intervallo di confidenza (CFU / mL)	
			Limite inferiore	Limite superiore
CTX-M-1	<i>E. coli</i> , DICON-091	55	43	79
CTX-M-9	<i>E. coli</i> , DICON-055	29	21	46
CTX-M-14	<i>E. coli</i> , DICON-045	273	220	384
CTX-M-15	<i>E. coli</i> , NCTC13400	36	28	55

### Efficienza di rilevazione (Inclusività)

L'efficienza di rilevazione su diverse varianti dei geni  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso 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  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso, ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative per le varianti riportate nella tabella seguente.

Gene	Varianti rilevate dal prodotto ESBL ELITe MGB® Kit
CTX-M	CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-22, CTX-M-23, CTX-M-24, CTX-M-27, CTX-M-28, CTX-M-29, CTX-M-30, CTX-M-32, CTX-M-33, CTX-M-36, CTX-M-38, CTX-M-46, CTX-M-47, CTX-M-48, CTX-M-49, CTX-M-50, CTX-M-51, CTX-M-55, CTX-M-61, CTX-M-64, CTX-M-65, CTX-M-66, CTX-M-67, CTX-M-69, CTX-M-71, CTX-M-73, CTX-M-80, CTX-M-81, CTX-M-82, CTX-M-83, CTX-M-84, CTX-M-85, CTX-M-86, CTX-M-87, CTX-M-90, CTX-M-93, CTX-M-96, CTX-M-98, CTX-M-99, CTX-M-101, CTX-M-102, CTX-M-104, CTX-M-105, CTX-M-106, CTX-M-110, CTX-M-111, CTX-M-112, CTX-M-113, CTX-M-114, CTX-M-116, CTX-M-121, CTX-M-122, CTX-M-123, CTX-M-125, CTX-M-126, CTX-M-129, CTX-M-130, CTX-M-132, CTX-M-134, CTX-M-137, CTX-M-143, CTX-M-148, CTX-M-159, CTX-M-161, CTX-M-164, CTX-M-166, CTX-M-168, CTX-M-170, CTX-M-173, CTX-M-174, CTX-M-175, CTX-M-176, CTX-M-177, CTX-M-179, CTX-M-180, CTX-M-181, CTX-M-182, CTX-M-183, CTX-M-184, CTX-M-186, CTX-M-188, CTX-M-189, CTX-M-190, CTX-M-191

L'efficienza di rilevazione delle diverse varianti dei geni  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso è stata inoltre verificata con un set di 14 isolati ESBL ben caratterizzati. I campioni sono stati preparati in matrici rettili negative a concentrazioni di circa tre volte il LoD. Sono stati testati dai tre ai cinque isolati per ciascun tipo di gene target (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15).

I risultati finali sono riportati nella seguente tabella.

Efficienza di rilevazione (Inclusività) del prodotto ESBL ELITe MGB® Kit				
Organismi	Isolati	Gene	Concentrazione (CFU/mL)	Risultati
<i>E. coli</i>	DICON-091	CTX-M-1	165	Incluso
<i>E. coli</i>	DICON-211	CTX-M-1	165	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-126	CTX-M-1	165	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-001	CTX-M-1	165	Incluso
<i>E. coli</i>	DICON-003	CTX-M-1	165	Incluso
<i>E. coli</i>	DICON-055	CTX-M-9	87	Incluso
<i>E. coli</i>	DICON-098	CTX-M-9	87	Incluso
<i>E. coli</i>	DICON-085	CTX-M-9	87	Incluso
<i>E. coli</i>	DICON-045	CTX-M-14	819	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-060	CTX-M-14	819	Incluso
<i>E. coli</i>	DICON-054	CTX-M-14	819	Incluso
<i>E. coli</i>	NCTC13400	CTX-M-15	108	Incluso
<i>E. coli</i>	NCTC13451	CTX-M-15	108	Incluso
<i>E. coli</i>	NCTC13450	CTX-M-15	108	Incluso

Tutti gli isolati di ESBL sono stati rilevati dal prodotto ESBL ELITe MGB® Kit a concentrazioni di 87 - 819 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 24 isolati ESBL caratterizzati. Ogni campione è stato diluito in eNAT™ kit e poi testato con ESBL ELITe MGB® Kit e ELITe InGenius® system in modalità Extraction + PCR. Gli isolati culturali sono rappresentativi dei differenti generi di *Enterobacteriaceae* (e.g. *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*).

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	Positivi	Negativi	Non validi
Isolati culturali CTX-M-1 positivi	1	1	0	0
Isolati culturali CTX-M-3 positivi	2	2	0	0
Isolati culturali CTX-M-14 positivi	3	3	0	0
Isolati culturali CTX-M-15 positivi	18	18	0	0

Tutti gli isolati di ESBL sono stati rilevati dal prodotto ESBL 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 potenzialmente presenti in tamponi rettili è stata verificata testando in triplicato gli isolati indicati nella tabella sottostante alla concentrazione di 10<sup>6</sup> CFU / mL.

Marcatori potenzialmente interferenti del prodotto ESBL ELITe MGB® Kit			
Organismi	Isolati	Concentrazione (CFU/mL)	Risultati
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività
<i>E. coli</i>	ATCC BAA-201	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività
<i>S. marcescens</i>	UCLA 14-13-A11	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività
<i>A. baumannii</i>	NCTC 13301	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività
<i>A. lwoffii</i>	ATCC 15309	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33292	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività
<i>C. albicans</i>	Zeptomatrix Z006	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività
<i>C. freundii</i>	ATCC 8090	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività
<i>C. difficile</i>	ATCC 43593	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività
<i>C. perfringens</i>	ATCC 13124	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività
<i>P. mirabilis</i>	ATCC 12453	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività
<i>S. enterica</i>	ATCC 700720	10 <sup>6</sup>	No cross-reattività

Tutti gli isolati sono risultati negativi in 3 replicati su 3 utilizzando ESBL ELITe MGB® Kit.

#### Sostanze interferenti

Sostanze potenzialmente interferenti alla più alta concentrazione clinicamente rilevante sono state aggiunte singolarmente a campioni di matrici rettili negative contenenti isolati ESBL alla concentrazione di circa 3x LoD. Le sostanze testate sono: clisteri (olio di vaselina), lubrificante spermicida (Nonoxynol-9), Medicinali Anti-diarrea (Loperamide Cloridrato, Bismuto sub-salicilato), lassativi (Sennosiidi), antibiotici (Vancomicina), anti acidi (acido alginico / alluminio idrossido / magnesio tri-silicato, Calcio Carbonato), componenti fecali (Acido Palmitico, Acido stearico, Mucine, sangue intero umano). Un isolato per i seguenti tipi di gene target, CTX-M-1, CTX-M-9 e CTX-M-15, è stato testato in triplicato con ESBL 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 rettili negative contenenti isolati ESBL alla concentrazione di circa 3x LoD. Un isolato per ogni tipo di gene target (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14 e CTX-M-15) è stato testato in triplicato con ESBL 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 dei risultati del prodotto ESBL ELITe MGB® Kit in associazione allo strumento ELITe InGenius è stata testata eseguendo tre sessioni al giorno per due giorni con un pannello analizzato in triplicato. Il pannello includeva un campione negativo e tre campioni positivi a circa 3x LoD per gli isolati ESBL CTX-M-1, CTX-M-9 e CTX-M-15.

I risultati in termini di valori di Ct per ogni tipo di gene target e per il controllo interno (IC) sono stati analizzati come Coefficiente di Variabilità percentuale (CV%), ottenendo la ripetibilità come imprecisione intra-sessione e imprecisione inter-sessione.

La ripetibilità dei risultati del prodotto ESBL ELITe MGB® Kit per ciascun gene target, come CV% intra-sessione e inter-sessione, non supera il 2,5%.

Il riassunto dei risultati è riportato nelle tabelle sottostanti.

Ripetibilità intra-sessione del prodotto ESBL ELITe MGB® Kit				
Target	Sessioni	Ct Medio	DS	CV%
CTX-M-1	Giorno 1	33,99	0,60	1,77
	Giorno 2	34,40	0,56	1,62
CTX-M-9	Giorno 1	34,95	0,85	2,43
	Giorno 2	35,34	0,43	1,21
CTX-M-15	Giorno 1	32,46	0,46	1,43
	Giorno 2	32,58	0,18	0,56
IC	Giorno 1	27,29	0,43	1,56
	Giorno 2	27,22	0,22	0,80

Ripetibilità inter-sessione del prodotto ESBL ELITe MGB® Kit				
Target	Sessioni	Ct Medio	DS	CV%
CTX-M-1	Giorno 1 + 2	34,19	0,60	1,76
CTX-M-9	Giorno 1 + 2	35,14	0,68	1,94
CTX-M-15	Giorno 1 + 2	32,52	0,35	1,07
IC	Giorno 1 + 2	27,25	0,33	1,21

### Riproducibilità

La riproducibilità in termini di variabilità tra lotti del prodotto ESBL ELITe MGB® Kit in associazione al sistema ELITe InGenius, è stata testata da un operatore eseguendo tre sessioni al giorno per tre giorni con tre lotti diversi di prodotto utilizzando un pannello analizzato in triplicato. Il pannello includeva un campione negativo e tre campioni positivi a circa 3x LoD per gli isolati ESBL CTX-M-1, CTX-M-9 e CTX-M-15.

La riproducibilità in termini di variabilità tra lotti, tra strumenti e tra operatori del prodotto ESBL ELITe MGB® Kit in associazione al sistema ELITe InGenius, è stata testata da tre operatori eseguendo tre sessioni al giorno per tre giorni con tre strumenti diversi con tre lotti diversi di prodotto utilizzando un pannello analizzato in triplicato. Il pannello includeva un campione negativo e tre campioni positivi a circa 3x LoD per gli isolati ESBL CTX-M-1, CTX-M-9 e CTX-M-15.

I risultati in termini di valori di Ct per ogni tipo di gene target e per il controllo interno (IC) sono stati analizzati come Coefficiente di Variabilità percentuale (CV%), ottenendo la riproducibilità come imprecisione inter-lotto e imprecisione inter-sito.

La riproducibilità del prodotto ESBL ELITe MGB® Kit per ciascun gene target, come CV% tra lotti e tra lotti, strumenti e operatori, non supera il 2 %.

Il riassunto dei risultati è riportato nelle tabelle sottostanti.

Riproducibilità inter-lotto con ESBL ELITe MGB® Kit			
Target	Ct Medio	DS	CV%
CTX-M-1	33,99	0,58	1,70
CTX-M-9	35,30	0,60	1,70
CTX-M-15	33,30	0,33	1,00
IC	27,58	0,78	2,82

Ripetibilità inter-sito del ESBL ELITe MGB® Kit			
Target	Ct Medio	DS	%CV
CTX-M-1	33,86	0,49	1,46
CTX-M-9	35,26	0,69	1,96
CTX-M-15	33,32	0,46	1,37
IC	27,97	0,75	2,67

### 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 CTX-M-1 ad un titolo di 10<sup>6</sup> CFU / mL in matrice rettale negativa in medium eNAT™ alternati a 6 campioni di matrice rettale negativa in medium eNAT™.

Tutti i campioni di matrice rettale negativa testati sono risultati negativi con il prodotto ESBL ELITe MGB® Kit.

### 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 CTX-M-9 ed è risultato uguale a 0%.

I 50 campioni di matrice rettale negativa sono stati positivamente con un isolato CTX-M9 ad una concentrazione finale di circa tre volte l'LoD (87 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 ESBL ELITe MGB® Kit.

### Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

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

I 51 tamponi rettali positivi sono stati identificati tramite metodo colturale (chromID® ESBL, bioMérieux) e tramite un saggio "home-made" validato di Real-Time PCR.

Altri 96 tamponi rettali identificati come negativi con la coltura sono stati positivamente con 4 isolati ESBL per ciascuno dei seguenti geni target: CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14 e CTX-M-15. Per ogni isolato sono stati analizzati 24 campioni.

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

I risultati sono riassunti nella tabella sottostante.

Campioni	N	Positivi	Negativi	Non validi
Tamponi rettali CTX-M-1 o CTX-M-15 positivi	38	38	0	0
Tamponi rettali CTX-M-9 o CTX-M-14 positivi	9	9	0	0
Tamponi rettali CTX-M-1-15 e CTX-M-9-14 positivi	4	3	1	0
Tamponi rettali positivizzati per CTX-M-1 (isolato DICON-091)	24	24	0	0
Tamponi rettali positivizzati per CTX-M-9 (isolato DICON-055)	24	24	0	0
Tamponi rettali positivizzati per CTX-M-14 (isolato DICON-045)	24	24	0	0
Tamponi rettali positivizzati per CTX-M-15 (isolato NCTC134)	24	23	0	1

Tutti i campioni testati tranne due sono risultati positivi con il prodotto ESBL ELITe MGB® Kit. Un campione (positivo CTX-M-1-15 e CTX-M-9-14) ha dato risultato negativo e un campione (positivizzato CTX-M-15) ha dato risultato non valido. Entrambi presentavano un'elevata torbidità. Il campione non valido non è stato incluso nell'analisi.

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici positivi, è stata valutata anche analizzando alcuni campioni di emocoltura positivi per isolati ESBL.

51 emocolture positive sono state identificate tramite metodo colturale.

I campioni sono stati diluiti in acqua ultrapura per biologia molecolare e in seguito testati con ESBL 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 positive	51	51	0	0

Tutti i campioni testati sono risultati positivi con il prodotto ESBL ELITe MGB® Kit.

Nel complesso in questi test (emocolture e tamponi rettali) la sensibilità del saggio è risultata uguale al 99,5%.

#### Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

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

49 tamponi rettali negativi sono stati identificati tramite metodo colturale (chromID® ESBL, bioMérieux) e altri 5 tamponi rettali sono stati identificati tramite un saggio "home-made" validato di Real-Time PCR.

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

37 emocolture negative alla crescita.

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

I risultati sono riassunti nella tabella sottostante.

Campioni	N	Positivi	Negativi	Non validi
Tamponi rettali ESBL-negativi	54	0	54	0
Emocolture ESBL-negative	37	2	35	0

Due campioni di emocolture sono risultati positivi con il prodotto ESBL ELITe MGB® Kit.

In questo test la specificità del saggio è risultata uguale al 97,8%.

**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 "ESBL ELITe MGB Kit", FTP RTS201ING.

#### BIBLIOGRAFIA

Cantón R. et al., Front Microbiol. 2012 Apr 2;3:110.

#### LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare con questo prodotto soltanto i seguenti campioni clinici: tamponi rettali.

Non utilizzare con questo prodotto campioni con troppa matrice fecale: campioni con elevata torbidità inibiscono la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e possono causare risultati non validi.

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

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.

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 controllo positivo. Controllare i volumi di PCR Mix e controllo positivo.
Degradazione del Positive Control.	Usare una nuova aliquota di controllo positivo.
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 controllo negativo. Controllare i volumi di PCR Mix e controllo negativo.
Contaminazione del Negative Control.	Utilizzare una nuova aliquota di acqua ultrapura 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 della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Inibizione causata da sostanze interferenti con il campione.	Ripetere l'amplificazione diluendo il campione 1 : 2 in acqua ultrapura per biologia molecolare, impostando la sessione "PCR only". Ripetere l'estrazione diluendo il campione 1 : 2 in medium fresco eNAT™, impostando la sessione "Extract + PCR".
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: - ripetere l'amplificazione con il campione diluito in acqua ultrapura per biologia molecolare, impostando la sessione "PCR only" o - ripetere l'estrazione diluendo il campione primario in medium fresco eNAT™ e impostando la sessione "Extract + PCR".

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

ELITe InGenius® è un marchio registrato di ELITechGroup.

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

FecalSWAB™ è un marchio registrato di COPAN Italia S.p.A.

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

chromID® è un marchio registrato di bioMérieux S.p.A.