




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

## NOTICE of CHANGE dated 09/10/2024

### IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

# «COLISTIN-R ELITE MGB Kit» Ref. RTS202ING-48

This new revision of the Instruction for Use (IFU) contains the following change:

- *Diagnostic sensitivity: increase of sample size (Rectal Swab mcr-2 spiked samples) by confirming the results already obtained.*

### PLEASE NOTE

- *Composition, use and performance of the product remain unchanged.*
- *The product lots reported into the table below are still placed on the market as per IVDD (98/79/EC) until expiration dates, according to Article 110 of IVDR. If you're using these product lots, the related IFU revision, NOT available anymore on the website, can be requested by contacting ELITechGroup staff.*

PRODUCT REF	Lot Number	Expiry date
RTS202ING-48	U1222-035	December 2024
CTR202ING	U0123-014	January 2025



LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT



THE REVIEW OF THIS IFU IS COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT



CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET C'EST COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT



LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT



A REVISÃO DO ESTE IFU É COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT



DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBILE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM KIT



**COLISTIN-R ELITe MGB® Kit**  
reagente para amplificação em tempo real do ADN

**REF** RTS202ING-48

### PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio consiste numa reação multiplex de amplificação em tempo real realizada com o **ELITE InGenius**, um sistema automático e integrado para extração, amplificação e deteção de ácidos nucleicos e interpretação de resultados.

A partir do ADN extraído de cada amostra sujeita a teste, são realizadas, na PCR Cassette, reações de amplificação específicas para os seguintes genes de resistência à Colistina:

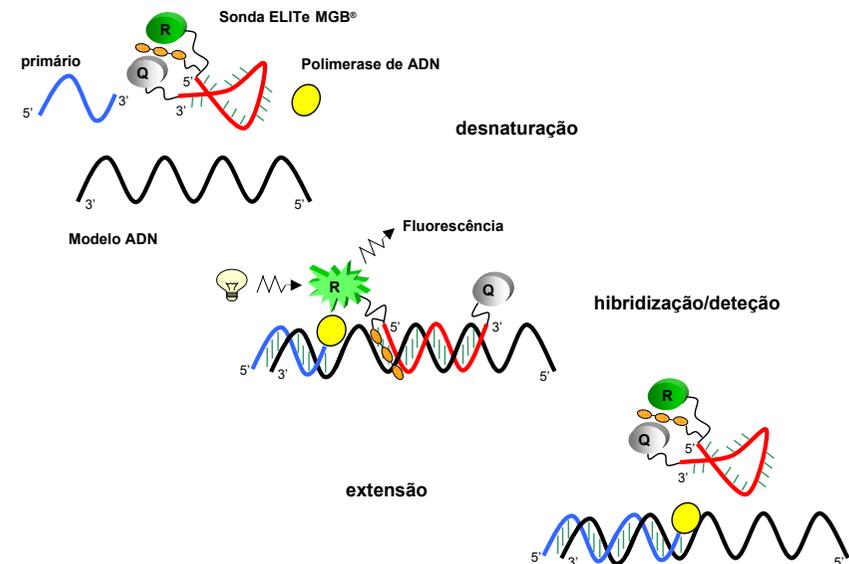
- gene *mcr-1*, detetado por uma sonda específica no canal **mcr1** (Canal 5),
- gene *mcr-2*, detetado por uma sonda específica no canal **mcr2** (Canal 1).

Além disso, a reação de amplificação específica para o Controlo interno exógeno da extração e inibição, com base numa sequência artificial (IC2), é realizada e detetada por uma sonda específica no canal **CI** (Canal 2).

As sondas com a tecnologia ELITE MGB® são ativadas quando hibridizam com o produto específico da reação de amplificação. À medida que o produto específico da reação de amplificação aumenta, a emissão de fluorescência aumenta e é medida e registada pelo instrumento. No final do ciclo de amplificação, os diagramas da fluorescência são analisados para identificar os ciclos do limiar (Ct). A interpretação do resultado permite detetar a presença do gene *mcr-1* e *mcr-2* de resistência transmissível à Colistina na amostra inicial.

O ensaio foi validado com o instrumento **ELITE InGenius**.

Na imagem seguinte é resumidamente mostrado o mecanismo de ativação e a emissão de fluorescência da sonda da tecnologia ELITE MGB®. Tenha em atenção que a sonda não é hidrolisada durante o ciclo de amplificação, pelo que pode ser usada para a análise da curva de dissociação.



**COLISTIN-R ELITe MGB® Kit**  
reagente para amplificação em tempo real do ADN

**REF** RTS202ING-48

**CE** **IVD**



**UDI** 08033891486662

0344

### ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 1
PRINCÍPIOS DO ENSAIO	página 2
DESCRIÇÃO DO PRODUTO	página 3
MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	página 3
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	página 3
OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	página 3
AVISOS E PRECAUÇÕES	página 4
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 5
PROCEDIMENTO	página 6
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 12
REFERÊNCIAS	página 16
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 17
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 18
SÍMBOLOS	página 20
NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES	página 21
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 21
ANNEX	página A

### UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto **COLISTIN-R ELITe MGB® Kit** consiste num dispositivo médico de diagnóstico in vitro que se destina a ser usado por profissionais de saúde como um ensaio qualitativo de amplificação de ácidos nucleicos para a deteção e identificação do ADN dos genes *mcr-1* e *mcr-2* de resistência transmissível à Colistina da *Enterobacteriaceae* em amostras clínicas.

O ensaio é validado em associação com o instrumento **ELITE InGenius®**, um sistema automatizado e integrado para a extração, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, a partir de zaragatoas retais.

O produto está previsto para utilização como auxiliar no diagnóstico de infeções por *Enterobacteriaceae* positivas para genes de resistência transmissível à Colistina, em conjunto com os dados clínicos do paciente e outros resultados de testes laboratoriais.

### DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit** fornece a **COL PCR Mix**, uma mistura completa **pronta a usar** para amplificação em tempo real, alíquotada em quatro tubos de teste. Cada tubo contém **280 µL** de solução, suficiente para **12 testes** em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 testes por sessão) quando usado com o sistema **ELITE InGenius**.

A COL PCR Mix contém:

- os primários e a sonda específicos para o gene **mcr-1**. A sonda **mcr1** é etiquetada por fluoróforo AP639, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma humidade não fluorescente, A sonda é detetada no canal **mcr-1** (canal 5) do sistema **ELITE InGenius**,
- os primários e sonda específicos para o gene **mcr-2**. A sonda **mcr2** é etiquetada por fluoróforo FAM, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma humidade não fluorescente, A sonda é detetada no canal **mcr-2** (canal 1) do sistema **ELITE InGenius**,
- os primários e a sonda específicos para a sequência artificial **IC2** do Controlo interno exógeno. A sonda **CI** é etiquetada com fluoróforo AP525, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma humidade não fluorescente, A sonda é detetada no canal **CI** (canal 2) do sistema **ELITE InGenius**.

A COL PCR Mix contém também o tampão, o cloreto de magnésio, os trifosfatos nucleotídicos, os estabilizadores e a enzima de polimerase de ADN Taq com ativação térmica (arranque a quente).

O produto é suficiente para **48 testes em associação com o ELITE InGenius**, incluindo controlos.

### MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
COL PCR Mix	Mistura de reação completa Tampa BRANCA	4 x 280 µL	-

### MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Exaustor de fluxo de ar laminar.
- Luvas sem pó de nitrilo descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrifugadora de bancada (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas e pontas esterilizadas com filtro de aerossóis ou pontas esterilizadas de deslocação positiva (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Água de qualidade para biologia molecular.

### OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para extração do ADN das amostras a serem analisadas, o Internal Control da amplificação e os consumíveis **não** estão incluídos neste produto.

Para a análise automática de amostras, é necessário o instrumento **ELITE InGenius** (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) e os seguintes Protocolos de ensaio específicos (ELITechGroup S.p.A.):

- parâmetros para a amplificação de Positivo Control **COL-R ELITE\_PC**,
- parâmetros para a amplificação de Negative Control **COL-R ELITE\_NC**,
- parâmetros para amostras a serem analisadas **COL-R ELITE\_RcS\_200\_100**.

Com o instrumento **ELITE InGenius** são necessários os seguintes produtos genéricos:

- cartuchos de extração **ELITE InGenius® SP 200** (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),
- consumíveis para extração **ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set** (ELITechGroup S.p.A, ref. INT032CS),
- cartuchos de amplificação **ELITE InGenius® PCR Cassette** (ELITechGroup S.p.A, ref. INT035PCR),
- pontas **300 µL Filter Tips Axygen** (Axygen BioScience Inc., CA, ref. TF-350-L-R-S),
- caixas **ELITE InGenius® Waste Box** (ELITechGroup S.p.A, ref. F2102-000).

Como modelo do Controlo Interno de extração e inibição, é necessário o produto genérico **CPE - Internal Control** (EG SpA, ref. CTRCPE). Esta é uma solução estabilizada contendo ADNs plasmídeos e ARN genómico do fago MS2.

Como modelo do controlo positivo da amplificação, é necessário o produto específico **COLISTIN-R - ELITE Positive Control** (EG SpA, ref. CTR202ING). Esta é uma solução estabilizada de ADNs plasmídeos.

Como dispositivo de recolha para amostras de esfregaços retais, são necessários os seguintes produto genérico:

- kit **eSWAB®** (COPAN Italia S.p.A., ref. 480CE), zaragatoa e frasco com 1 mL de meio de transporte ou um dispositivo equivalente.

Para a diluição de amostras de zaragatoa rectal, é necessário o seguinte produto genérico:

- kit **eNAT®** (COPAN Italia S.p.A., ref. 606CS01R), zaragatoa e frasco com 2 mL de meio de desnaturação.

### AVISOS E PRECAUÇÕES

**Este produto foi concebido para o diagnóstico *in-vitro*.**

#### Avisos e precauções gerais

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Os materiais que entrarem em contacto com as amostras biológicas devem ser tratados durante, pelo menos, 30 minutos com 3% de hipoclorito de sódio ou em autoclave durante uma hora a 121 °C antes da eliminação.

Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais utilizados na realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os resíduos devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os desperdícios líquidos que contenham ácidos ou devem ser neutralizados antes da eliminação.

Use vestuário e luvas de proteção adequados e proteja os olhos e o rosto.

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

Não coma, beba, fume ou aplique produtos cosméticos nas áreas de trabalho.

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

Elimine os reagentes remanescentes e os desperdícios em conformidade com os regulamentos em vigor.

Leia atentamente todas as instruções fornecidas com o produto antes de efetuar o ensaio.

Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas com o produto.

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

Use apenas os reagentes fornecidos com o produto e os recomendados pelo fabricante.

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

#### Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular requerem colaboradores qualificados e com formação, para evitar o risco de resultados incorretos, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou à contaminação da amostra por produtos de amplificação.

São necessárias batatas de laboratório, luvas e ferramentas para preparação da sessão de trabalho.

As amostras devem ser adequadas e, se possível, exclusivas para este tipo de análise. As amostras devem ser manuseadas sob um exaustor de fluxo de ar laminar. As pipetas usadas no manuseamento de amostras devem ser usadas exclusivamente para este fim específico. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

As PCR Cassettes devem ser manuseadas de modo a evitar a difusão do produto de amplificação para o ambiente e a contaminação da amostra e do reagente.

**COLISTIN-R ELITE MGB® Kit**  
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS202ING-48

**Avisos e precauções específicos para os componentes**

A COL PCR Mix deve ser guardada a -20 °C num local escuro.

A COL PCR Mix deve ser utilizado no prazo de um mês após a primeira abertura do tubo.

A COL PCR Mix pode ser congelada e descongelada para um máximo de sete sessões: quaisquer ciclos de congelação/descongelação adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

**AMOSTRAS E CONTROLOS**

**Amostras**

O produto está validado para utilização com as seguintes amostras clínicas:

**Esfregaços retais colhidos em eSwab (COPAN Italia S.p.A., ref. 480CE)**

Os esfregaços retais para extração de ADN devem ser colhidos em eSwab e identificados de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportados e armazenados à temperatura ambiente (~+25 °C) durante um período máximo de 24 horas ou a +2/+8 °C durante um período máximo de 48 horas. Antes da análise com este produto, deve transferir 0,25 mL de amostra no meio eSwab para um tubo eNAT limpo com 2,0 mL de meio, agitado em vórtex. O eNAT conserva os ácidos nucleicos durante quatro semanas à temperatura ambiente e seis meses a -20°C e -70°C. Após adicionar 0,25 mL de amostra em meio eSwab, o tubo eNAT pode ser diretamente carregado no sistema ELITE InGenius como um tubo primário. Após a adição de 0,25 mL de amostra ao meio eSwab, o tubo eNAT pode ser diretamente carregado no sistema ELITE InGenius como um tubo primário.

**Nota:** para a extração de ADN a partir de esfregaços retais pelo sistema ELITE InGenius com o ELITE InGenius Software versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), utilize o Protocolo do ensaio COL-R ELITE\_RcS\_200\_100. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o Controlo interno CPE a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

O ADN extraído pode ser guardado a +2/+8 °C durante 16 horas ou a -20 °C durante um mês.

**Nota:** as amostras muito turvas têm de ser tratadas conforme indicado no capítulo de resolução de problemas.

**Substâncias interferentes**

Os dados disponíveis relativos à inibição causada por fármacos e outras substâncias são comunicados no parágrafo "Substâncias interferentes" do capítulo "Características de desempenho".

Tenha em atenção que um elevado conteúdo de matriz fecal colhida com o esfregaço retal (amostra com elevada turvação) pode inibir o ensaio.

**Controlos de amplificação**

Antes da análise de qualquer amostra com o sistema ELITE InGenius, é absolutamente obrigatório criar e aprovar os controlos de amplificação para o lote do reagente de amplificação que será usado nos testes:

- como Positive Control da amplificação, use o reagente COLISTIN-R - ELITE Positive Control (não fornecido com este kit) em associação com o Protocolo do ensaio COL-R ELITE\_PC,
- como Negative Control da amplificação, use água de qualidade molecular (não fornecida com este kit) em associação com o Protocolo do ensaio COL-R ELITE\_NC.

**Nota:** O sistema ELITE InGenius requer resultados aprovados e válidos dos controlos da amplificação para cada lote de reagente de amplificação guardado na respetiva base de dados. Os resultados do controlo da amplificação, aprovados e guardados na base de dados, irão expirar após 15 dias. Na data de fim da validade será necessário fazer uma nova execução dos Positive e Negative Controls em associação com o lote do reagente de amplificação em utilização.

Para além disso, os controlos da amplificação devem ser novamente executados quando:

- for iniciado um novo lote de reagentes de amplificação,
- os resultados dos controlos da qualidade (ver o parágrafo seguinte) se encontrarem fora da especificação,
- for realizado qualquer serviço de manutenção significativo no instrumento ELITE InGenius.

**Material de referência certificado**

A rastreabilidade metrológica dos calibradores e material de controlo para valores mcr-1 não é totalmente aplicável ao COLISTIN-R ELITE MGB Kit, dado que não existe material de referência da OMS disponível.

**COLISTIN-R ELITE MGB® Kit**  
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS202ING-48

A rastreabilidade metrológica dos calibradores e material de controlo para valores mcr-2 não é totalmente aplicável ao COLISTIN-R ELITE MGB Kit, dado que não existe material de referência da OMS disponível.

**Controlos da qualidade**

É recomendada a validação planeada do procedimento de extração e amplificação. Podem ser usadas amostras testadas ou material de referência certificado.

**PROCEDIMENTO**

O procedimento para utilização do COLISTIN-R ELITE MGB Kit com o sistema ELITE InGenius consiste em três passos:

- verificação da prontidão do sistema,
- preparação da sessão,
- revisão e exportação de resultados.

**Verificação da prontidão do sistema**

Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- ligar o ELITE InGenius e selecionar o modo de início de sessão "CLOSED" (Fechado), verificar que os controlos da amplificação (Controls, COL Positive Control, COL Negative Control) foram executados em associação com o lote do reagente de amplificação a ser usado e que os resultados são aprovados e válidos (Estado). Se não existirem resultados de controlo da amplificação aprovados ou válidos, crie os mesmos como descrito nos parágrafos seguintes,
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela ELITechGroup S.p.A. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com o COLISTIN-R ELITE MGB Kit, o instrumento ELITE InGenius e a matriz citada.

O Protocolo de ensaio disponível para teste da amostra com o produto COLISTIN-R ELITE MGB Kit está descrito na tabela seguinte.

Protocolo de ensaio para o COLISTIN-R ELITE MGB Kit			
Nome	Matriz	Relatório	Características
COL-R ELITE_RcS_200_100	Esfregaço Retal	Positivo/Negativo	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL

Se o Protocolo de ensaio de interesse não estiver carregado no sistema, contacte o serviço de Apoio ao cliente ELITechGroup S.p.A. na sua localidade.

**Preparação da sessão**

O produto COLISTIN-R ELITE MGB Kit pode ser usado com o sistema ELITE InGenius para realizar:

- A. Execução integrada (Extração + PCR),
- B. Execução de amplificação (apenas PCR),
- C. Execução de amplificação para Positive Control e Negative Control (apenas PCR),

Todos os parâmetros necessários para a sessão estão incluídos no Protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente recuperados quando o Protocolo de ensaio é selecionado.

**Nota:** O sistema ELITE InGenius pode ser ligado ao "Location Information Server" (Servidor de informação da localização - LIS) através do qual é possível carregar a informação da sessão de trabalho. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Estão descritos a seguir os passos principais para a preparação dos três tipos de execução.

#### A. Execução integrada

Para configurar uma execução integrada com extração e amplificação da amostra, execute os passos seguintes de acordo com a GUI:

1. Descongele os tubos da COL PCR Mix para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 reações em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

**Nota:** Descongele a COL PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Descongele os tubos CPE para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
4. Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 100 µL.
5. Para cada Rastreo de interesse preencha a "ID da amostra" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
6. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, COL-R ELITE\_RcS\_200\_100).
7. Certifique-se de que o "Protocol" apresentado é: "Extract + PCR".
8. Selecione a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position":
  - se for usado um tubo primário, selecione "Tubo primário",
  - se for usado um tubo secundário, selecione "Tubo de sonicação".Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue a CPE e a COL PCR Mix no "Inventory Block" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue as "PCR Cassettes", os cartuchos de extração "ELITE InGenius SP 200", todos os consumíveis necessários e as amostras a serem extraídas nas posições especificadas no passo 8, seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Feche a porta do instrumento.
13. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema ELITE InGenius permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

**Nota:** No final da execução a restante amostra extraída no "Elution tube" deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C durante um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

**Nota:** No final da execução as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

**Nota:** A PCR Mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 7 sessões de trabalho de 3 horas cada.

#### B. Execução da amplificação

Para preparar a execução de amplificação a iniciar a partir de ADN extraído, realize os passos seguintes de acordo com a GUI:

1. Descongele os tubos da COL PCR Mix para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 reações em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

**Nota:** Descongele a COL PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
3. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 100 µL.
4. Para cada Rastreo de interesse preencha a SID digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
5. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, COL-R ELITE\_RcS\_200\_100).
6. Selecione "PCR Only" na coluna "Protocol".
7. Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" é "Elution Tube (fila inferior)". Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue a COL PCR Mix no "Inventory Block" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue as "PCR Cassettes" e as amostras de Ácido nucleico extraídas seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Feche a porta do instrumento.
12. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema ELITE InGenius permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

**Nota:** No final da execução a restante amostra extraída deve ser removida do instrumento, tapada e guardada a -20 °C durante um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

**Nota:** No final da execução as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite quaisquer derrames dos produtos de reação.

**Nota:** A PCR Mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 7 sessões de trabalho de 3 horas cada.

### C. Execução de amplificação para Positive Control e Negative Control

Para preparar a execução de amplificação para o Positive Control e Negative Control, realize os passos seguintes em conformidade com a GUI:

1. Descongele os tubos da COL PCR Mix para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 12 reações em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

**Nota:** Descongele a COL PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Descongele o tubo COL - Positive Control para a sessão. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira pelo menos 50 µL de água de qualidade para biologia molecular para um "Elution Tube", fornecido com o ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
5. No Rastreo de interesse, selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay".
6. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 100 µL.
7. Para o controlo positivo, selecione o Protocolo de ensaio "COL-R ELITe\_PC" na coluna "Assay" e preencha o número do lote e a data de validade do COL - Positive Control,
8. Para o Negative Control, selecione o Protocolo de ensaio "COL-R ELITe\_NC" e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
9. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue a COL PCR Mix no "Inventory Block" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue/verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue as "PCR Cassettes", o tubo COL - Positive Control e o tubo de Negative Control seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Feche a porta do instrumento.
14. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema ELITe InGenius permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

**Nota:** No final da execução o restante Positive Control deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C. Evite derramar a amostra extraída. O restante Negative Control deve ser eliminado.

**Nota:** No final da execução as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

**Nota:** A PCR Mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 7 sessões de trabalho de 3 horas cada.

### Revisão e exportação de resultados

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã "Results Display". Neste ecrã são mostrados os resultados da amostra/Controlo e a informação relativa à execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios ("Sample Report" ou "Track Report"). Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

**Nota:** O sistema ELITe InGenius pode ser ligado ao "Location Information Server" (Servidor de informação da localização - LIS) através do qual é possível enviar os resultados da sessão de trabalho para o centro de dados do laboratório. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

O sistema ELITe InGenius gera os resultados com o produto COLISTIN-R ELITe MGB® Kit através do seguinte procedimento:

- A. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação,
- B. Validação dos resultados da amostra,
- C. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

#### A. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação

Os sinais de fluorescência emitidos pelas sondas dos genes de resistência (canais **mcr1** e **mcr2**) na reação de amplificação de Positive Control e Negative Control são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos Protocolos de ensaio "COL-R ELITe\_PC" e "COL-R ELITe\_NC".

Os resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação, específicos para o lote de reagente de amplificação usado, são registados na base de dados (Controls). Podem ser visualizados e aprovados por pessoal qualificado como o "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI.

Os resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação, específicos para o lote de reagente de amplificação, irão expirar **após 15 dias**.

Os resultados das execuções de amplificação de Positive Control e Negative Control são usados pelo software do instrumento para preparar os "Control Charts" para monitorizar os desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

**Nota:** Se o resultado do Positive Control ou Negative Control da amplificação não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Failed" no ecrã "Controls" e não é possível aprovar o mesmo. Neste caso, têm de ser repetidas as reações do Positive Control ou Negative Control da amplificação.

**Nota:** Quando o Positive Control ou Negative Control é executado em conjunto com amostras a serem testadas e o respetivo resultado é inválido, toda a sessão é inválida. Neste caso, também deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

#### B. Validação dos resultados da amostra

Os sinais de fluorescência emitidos pelas sondas dos genes de resistência (canais **mcr1** e **mcr2**) e pela sonda do Controlo Interno (canal **CI**) nas reações de amplificação da amostra são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos Protocolos de ensaio COL-R ELITe\_RcS\_200\_100.

Os resultados são mostrados nos relatórios gerados pelo instrumento ("Exibição dos resultados").

A execução da amostra pode ser aprovada quando forem cumpridas as duas condições reportadas na tabela abaixo.

<b>1) Positive Control</b>	<b>Estado</b>
COL Positive Control	APROVADO
<b>2) Negative Control</b>	<b>Estado</b>
COL Negative Control	APROVADO

Para cada amostra, o resultado do ensaio é automaticamente interpretado pelo sistema como estabelecido pelo algoritmo **ELITe InGenius Software** e os parâmetros do Protocolo do ensaio.

Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado. Para cada amostra o sistema comunica uma combinação de mensagens a especificar se os genes de resistência à Colistina foram detetados ou não detetados.

Resultado da execução da amostra	Interpretação
mcr1: ADN detetado.	O ADN do gene <b>mcr1</b> foi detetado na amostra. A amostra podia ser <b>resistente à Colistina</b> .
mcr2: ADN detetado.	O ADN do gene <b>mcr2</b> foi detetado na amostra. A amostra podia ser <b>resistente à Colistina</b> .
mcr1: ADN não detetado ou inferior ao LoD.	O ADN do gene <b>mcr1</b> não foi detetado na amostra <b>ou está abaixo do Limite de detecção do ensaio</b> . A amostra é negativa para este gene ou a sua concentração está abaixo do Limite de detecção do ensaio. Se também o gene mcr-2 não tiver sido detetado, a amostra pode ser <b>sensível à Colistina</b> .
mcr2: ADN não detetado ou inferior ao LoD.	O ADN do gene <b>mcr2</b> não foi detetado na amostra <b>ou está abaixo do Limite de detecção do ensaio</b> . A amostra é negativa para estes genes ou as respetivas concentrações estão abaixo do Limite de detecção do ensaio. Se também o gene mcr-1 não tiver sido detetado, a amostra pode ser <b>sensível à Colistina</b> .
Inválido - Voltar a testar a amostra.	<b>Resultado do ensaio inválido</b> causado por falha do Controlo Interno (extração incorreta, transferência de inibidores). O Ct do controlo interno era indeterminado ou superior a 34 (cut-off IC = 34). O teste deve ser repetido.

As amostras reportadas como "Inválido - Voltar a testar a amostra" pelo **software ELITE InGenius** não são adequadas para interpretação dos resultados. Neste caso, o ADN do Controlo Interno não foi detetado eficientemente devido a problemas no passo de amplificação ou extração (degradação do ADN, perda de ADN durante a extração ou transferência de inibidores na eluição), que pode causar resultados incorretos.

Quando o volume da eluição é suficiente, a amostra extraída pode ser novamente testada, tal como está ou diluída, através de uma execução da amplificação no modo "PCR Only". No caso de um segundo resultado inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova alíquota utilizando o modo "Extract + PCR".

As amostras reportadas como "ADN de mcr1 não detetado ou inferior ao LoD" e "ADN de mcr2 não detetado ou inferior ao LoD" são adequadas para análise mas não foi possível detetar ADN do gene de resistência. Neste caso, não pode excluir-se que o ADN do gene de resistência está presente a uma concentração abaixo do limite de detecção do ensaio (ver "Características de desempenho").

**Nota:** Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e os outros resultados de testes laboratoriais relativos ao doente.

Os resultados da execução da amostra são guardados na base de dados e, se válidos, podem ser aprovados (Result Display) por pessoal qualificado como "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI. A partir da janela "Result Display" é possível imprimir e guardar os resultados da execução da amostra como "Sample Report" e "Track Report".

### C. Exportação do resultado da amostra

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e podem ser exportados como "Sample Report" e "Track Report".

O "Sample Report" apresenta os detalhes de uma sessão de trabalho ordenada pela amostra selecionada (SID).

O "Track Report" apresenta os detalhes de uma sessão de trabalho pelo Rastreo selecionado.

O "Sample Report" e o "Track Report" podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### Limite de detecção (LoD)

O Limite de detecção (LoD) do ensaio foi definido em associação com amostras de esfregaço retal e o sistema ELITE InGenius.

Foram preparados seis níveis de diluições de um material de referência *E. coli* positivo para mcr-1 (estirpe DSM 105182, igual a NCTC 13846, de DSMZ, Alemanha) em esfregaços retais negativos a partir da concentração acima do LoD esperado. Foram processadas doze réplicas de cada nível de diluição no sistema ELITE InGenius no modo "Extração + PCR". O LoD para o alvo mcr-1 foi calculado por análise de regressão Probit dos dados com a concentração a corresponder a 95% de probabilidade de um resultado positivo. O LoD calculado foi confirmado através da análise de 30 réplicas de uma diluição alvo mcr-1 à concentração correspondente.

O resultado final é comunicado na tabela seguinte.

Limite de detecção do gene mcr-1 com esfregaços retais e o sistema ELITE InGenius (CFU/mL)		
LoD	intervalo de 95% de confiança	
	limite inferior	limite superior
32	19	472

Como não estava disponível nenhuma estirpe ou isolado positivos para mcr-2, o LoD para o alvo mcr-2 foi calculado em 50 cópias/mL (correspondente a 50 CFU/mL), semelhante ao valor de LoD do alvo mcr-1. O LoD calculado foi confirmado através da análise de 30 réplicas de uma diluição alvo mcr-2 (ADN de plasmídeo) numa matriz retal negativa à concentração correspondente.

### Eficiência da detecção (inclusividade)

A eficiência de detecção do ensaio para os genes mcr-1 e mcr-2 (inclusividade) foi avaliada através da comparação de sequências com a base de dados de nucleótidos.

As regiões escolhidas para a hibridização dos primários e as sondas fluorescentes foram verificadas no alinhamento das sequências disponíveis na base de dados para os genes mcr-1 e mcr-2. A análise revelou a respetiva conservação e ausência de mutações significativas.

A eficiência da detecção do ensaio para o gene mcr-1 foi também verificada para um conjunto de 27 isolados de cultura resistente à Colistina caracterizados como *Enterobacteriaceae* positiva para mcr-1.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Eficiência de detecção (inclusividade) do produto COLISTIN-R ELITE MGB Kit					
Amostras	N	Positivo para mcr-1	Positivo para mcr-2	Negativo	Inválido
Isolados de cultura positivos para mcr-1	27	27	0	0	0

Este produto é capaz de detetar a resistência à colistina transmissível (mediada pelo plasmídeo) através da detecção dos genes mcr-1 e mcr-2, não sendo capaz de detetar os tipos mcr do 3 ao 5 e do 7 ao 10. O tipo mcr-6 pode ser detetado com o detetador de mcr-2.

### Marcadores potencialmente interferentes

A potencial reatividade cruzada do ensaio com outros alvos não pretendidos foi avaliada através da análise *in silico* de sequências nas bases de dados de nucleótidos.

As regiões escolhidas para a hibridização dos primários e as sondas fluorescentes foram verificadas no alinhamento das sequências de organismos com grande probabilidade de estarem presentes em amostras de esfregaços retais. A análise revelou a ausência de homologies significativas e não indicaram uma potencial interferência.

A ausência de reatividade cruzada com outros organismos potencialmente encontrados em amostras de esfregaços retais também foi verificada através de testes a um painel de estirpes certificadas a uma concentração de cerca de 10<sup>4</sup> CFU/mL em associação com o sistema ELITE InGenius no modo "Extração + PCR".

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Potencial reatividade cruzada		
Organismo	Estirpe	Resultado
<i>K. pneumoniae</i>	NCTC 13439 (VIM)	Sem reatividade cruzada
<i>E. coli</i>	NCTC 13476 (IMP)	Sem reatividade cruzada
<i>S. marcescens</i>	UCLA 14-13-A11	Sem reatividade cruzada
<i>A. baumannii</i>	NCTC 13301	Sem reatividade cruzada
<i>A. lwoffii</i>	ATCC 15309	Sem reatividade cruzada
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703	Sem reatividade cruzada
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	Sem reatividade cruzada
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33292	Sem reatividade cruzada
<i>C. albicans</i>	Zeptomatrix Z006	Sem reatividade cruzada
<i>C. freundii</i>	UCLA-14-13-A2 (KPC)	Sem reatividade cruzada
<i>C. difficile</i>	ATCC 43593	Sem reatividade cruzada
<i>C. perfringens</i>	ATCC 13124	Sem reatividade cruzada
<i>P. mirabilis</i>	ATCC 12453	Sem reatividade cruzada
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	Sem reatividade cruzada
<i>S. enterica</i>	ATCC 700720	Sem reatividade cruzada
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-126	Sem reatividade cruzada
<i>E. coli</i>	DICON-055	Sem reatividade cruzada
<i>E. coli</i>	DICON-045	Sem reatividade cruzada
<i>E. coli</i>	NCTC13400	Sem reatividade cruzada

Todas as estirpes tiveram resultado negativo quando testadas com o ensaio.

A ausência de interferência de outros organismos que podem ser encontrados em amostras de esfregaços retais também foi verificada através de testes a um painel de estirpes certificadas a uma concentração de cerca de 10<sup>4</sup> CFU/mL ou superior reforçadas com material certificado positivo para mcr-1 para uma concentração final de cerca de 3x o LoD em associação com o sistema ELITE InGenius no modo "Extração + PCR".

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Potencial interferência		
Organismo	Estirpe	Resultado
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603	Sem interferência
<i>E. coli</i>	ATCC BAA-201	Sem interferência
<i>S. marcescens</i>	UCLA 14-13-A11	Sem interferência
<i>A. baumannii</i>	NCTC 13301	Sem interferência
<i>A. lwoffii</i>	ATCC 15309	Sem interferência
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703	Sem interferência
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	Sem interferência
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33292	Sem interferência
<i>C. albicans</i>	Zeptomatrix Z006	Sem interferência
<i>C. freundii</i>	ATCC 8090	Sem interferência
<i>C. difficile</i>	ATCC 43593	Sem interferência
<i>C. perfringens</i>	ATCC 13124	Sem interferência
<i>P. mirabilis</i>	ATCC 12453	Sem interferência
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	Sem interferência
<i>S. enterica</i>	ATCC 700720	Sem interferência
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-126	Sem interferência
<i>E. coli</i>	DICON-055	Sem interferência
<i>E. coli</i>	DICON-045	Sem interferência
<i>E. coli</i>	NCTC13400	Sem interferência

Nenhuma das estirpes interferiu com a amplificação dos alvos quando testados pelo ensaio.

#### Substâncias interferentes

Foi testado com o ensaio um painel de substâncias potencialmente interferentes a concentrações relevantes. As substâncias testadas foram: sangue completo humano, Mucina, enemas (Óleo de vaselina), antibiótico (Vancomycin), antiácidos (Ácido algínico/Bicarbonato de sódio), medicação contra a diarreia (Hidrocloreto de loperamida) e laxantes (Senosida).

As substâncias foram adicionadas individualmente à matriz retal negativa reforçada com materiais de referência positivos para mcr-1 a uma concentração de 3x LoD. As amostras foram processadas em três réplicas no sistema ELITE InGenius no modo "Extração + PCR". Foi calculada a % do Coeficiente de variação (% CV) do valor Ct com amostras de referência.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Substâncias interferentes			
Substância	Concentrações testadas	Pos./Rep.	Resultado
Sangue total	5% v/v	3 / 3	ADN Mcr-1 detectado
Mucina	10 mg/mL	3 / 3	ADN Mcr-1 detectado
Óleo de vaselina	20 mg/mL	3 / 3	ADN Mcr-1 detectado
Vancomycin	12.5 mg/mL	3 / 3	ADN Mcr-1 detectado
Ácido algínico/ Bicarbonato de sódio	0.1 mg/mL	3 / 3	ADN Mcr-1 detectado
Cloridrato de loperamida	7 µg/mL	3 / 3	ADN Mcr-1 detectado
Senosides	0,1mg/mL	3 / 3	ADN Mcr-1 detectado
Ampicilina	18 µg / mL	3 / 3	ADN Mcr-1 detectado
Cefpodoxima	4.5 µg / mL	3 / 3	ADN Mcr-1 detectado
Ciprofloxacina	5 µg / mL	3 / 3	ADN Mcr-1 detectado
Azythromycin	10 µg / mL	3 / 3	ADN Mcr-1 detectado

Todas as amostras tiveram resultado positivo para o alvo. A %CV dos valores Ct foi inferior a 5%. Verificou-se que nenhuma das substâncias testada nas concentrações testadas interferiu com a deteção do alvo.

#### Capacidade de repetição

A Capacidade de repetição dos resultados obtidos pelo ensaio em associação com o sistema ELITe InGenius foi testada através da análise a um painel de matriz retal com uma amostra negativa e três amostras reforçadas com o material de referência positivo para mcr-1 (DSMZ) a concentrações de cerca de 0,5x LoD, 1,5x LoD e 3x LoD.

A Capacidade de repetição foi calculada através da análise de amostras de painel em três réplicas, em duas execuções por dia, com o mesmo lote de produto. Foram testados três lotes diferentes do produto em três dias diferentes com o mesmo instrumento e pelo mesmo operador. As amostras foram processadas no sistema ELITe InGenius no modo "Extração + PCR".

Os valores Ct de cada nível de diluição foram usados para calcular a %CV para avaliar a capacidade de repetição como imprecisão.

É mostrado nas tabelas seguintes um resumo dos resultados.

Capacidade de repetição				
Amostra	Pos./rep.	Ct média de mcr-1	Desv. Std de mcr-1	mcr-1 %CV
3x LoD (96 CFU/mL)	18/18	36,23	0,44	1,23
1,5x LoD (48 CFU/mL)	18/18	36,82	0,59	1,61
0,5x LoD (16 CFU/mL)	10/18	37,97	0,47	1,25
Matriz retal negativa	0/18	N.A.	N.A.	N.A.

No teste da Capacidade de repetição, o ensaio detetou o alvo mcr-1 como esperado e mostrou uma baixa %CV do valor Ct alvo que não excedeu os 5%.

#### Capacidade de reprodução

A Capacidade de reprodução dos resultados obtidos pelo ensaio em associação com o sistema ELITe InGenius foi testada através da análise a um painel de matriz retal com uma amostra negativa e três amostras reforçadas com materiais de referência positivos para mcr-1 (DSMZ) a concentrações de cerca de 0,5x LoD, 1,5x LoD e 3x LoD.

A Capacidade de reprodução foi calculada através da análise de amostras de painel em três réplicas, em duas execuções por dia. Foram testados três lotes diferentes do produto em três dias diferentes, em três instrumentos diferentes e por três operadores diferentes. As amostras foram processadas no sistema ELITe InGenius no modo "Extração + PCR".

Os valores Ct de cada nível de diluição foram usados para calcular a %CV para avaliar a capacidade de reprodução como imprecisão.

É mostrado nas tabelas seguintes um resumo dos resultados.

Capacidade de reprodução				
Amostra	Pos./rep.	Ct média de mcr-1	Desv. Std de mcr-1	mcr-1 %CV
3x LoD (96 CFU/mL)	18/18	36,07	0,60	1,66
1,5x LoD (48 CFU/mL)	18/18	36,86	0,53	1,44
0,5x LoD (16 CFU/mL)	9/18	37,91	0,71	1,88
Matriz retal negativa	0/18	N.A.	N.A.	N.A.

No teste da Capacidade de reprodução, o ensaio detetou o alvo mcr-1 como esperado e mostrou uma baixa %CV do valor Ct alvo que não excedeu os 5%.

#### Sensibilidade de diagnóstico (Positive Percent Agreement): confirmação de amostras positivas

Dada a dificuldade de encontrar amostras clínicas positivas para os genes mcr-1 e mcr-2, devido à baixa incidência de amostras com resistência transmissível à colistina, foram analisadas amostras positivas para avaliar a sensibilidade diagnóstica do produto.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras positivas, foi avaliada através da análise de 107 amostras de zaragoas retais reforçadas com isolados de *E. coli* positivos para mcr-1 ou mcr-2.

56 amostras de zaragoas retais foram certificadas como negativas por método de cultura e depois foram reforçadas com diferentes isolados de *E. coli* positivos para mcr-1.

51 amostras de zaragoas retais presumivelmente negativas para *Enterobacteriaceae* com resistência transmissível à colistina foram reforçadas com a estirpe de *E. Coli* positiva para mcr-2 NCTC 14378.

Todas as amostras foram analisadas com o COLISTIN-R ELITe MGB Kit e o sistema ELITe InGenius em modo "Extract + PCR".

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	mcr-2 positivo	mcr-21 positivo	negativo	inválido
Esfregaço retal reforçado com mcr-1	56	55	0	0	1
Esfregaço retal reforçado com mcr-2	51	0	51	0	0

55 de 56 amostras reforçadas com mcr-1 foram confirmadas como positivas para mcr-1; uma amostra forneceu um resultado inválido e foi excluída da análise.

Todas as amostras reforçadas com mcr-2 (51 em 51) foram confirmadas como positivas para mcr-2.

Neste teste, a sensibilidade de diagnóstico para amostras de zaragoas retais foi equivalente a 100% tanto para os alvos de mcr-1 como mcr-2.

#### Especificidade de diagnóstico (Negative Percent Agreement): confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas negativas, foi avaliada através da análise de 58 amostras de esfregaço retal negativas para mcr-1 e mcr-2.

As 58 amostras de esfregaços retais foram certificadas como negativas para *Enterobacteriaceae* contendo resistência transmissível à Colistina por método de cultura e, em seguida, foram testadas com o COLISTIN-R ELITe MGB Kit e o sistema ELITe InGenius no modo "Extract + PCR" (Extract+PCR).

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	mcr-1 positivo	mcr-2 positivo	negativo	inválido
Esfregaço retal negativo para mcr-1 e mcr-2	58	1	0	54	3

No teste, 54 de 58 amostras foram confirmadas válidas e negativas, 1 amostra teve um resultado discrepante com positivo baixo para mcr-1. Três amostras forneceram um resultado inválido e foram excluídas da análise. Neste teste, a especificidade diagnóstica do ensaio para amostras de esfregaço rectal foi de 98% para o alvo mcr-1 e 100% para o alvo mcr-2.

**Nota:** Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e o instrumento estão registados no Ficheiro técnico do produto "COLISTIN-R ELITe MGB Kit", FTP 202ING.

#### REFERÊNCIAS

- Y. Y. Liu et al. (2016) *Lancet Infect Dis.* 16 (2): 161 – 168  
 B. B. Xavier et al. (2016) *Euro Surveill.* 21(27): doi 10.2807/1560-7917  
 H. Giamarellou (2016) *Int. J. Antimicrob. Agentes.* 48 (6): 614 - 621  
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

**LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**

Não use este produto com amostras de origem animal e alimentar.  
Não use este produto com amostras que contenham demasiada matriz fecal: as amostras com elevada turvação inibem a reação de amplificação de ácidos nucleicos e podem causar resultados inválidos.

Não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: cultura de sangue, sobrenadante fecal, urina.

Os resultados obtidos com este produto dependem de uma identificação, uma recolha, um armazenamento de transporte e um processamento adequados das amostras. Para evitar resultados incorretos, é por isso necessário ter cuidado durante estes passos e seguir cuidadosamente as instruções de utilização fornecidas com os produtos para extração de ácido nucleico.

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de amplificação em Tempo real usado neste produto é sensível a contaminações cruzadas a partir de amostras positivas, dos controlos positivos e dos mesmos produtos de amplificação. Contaminações cruzadas causadas por falsos resultados positivos. O formato do produto é capaz de limitar contaminações cruzadas. No entanto, as contaminações cruzadas podem ser evitadas simplesmente através de boas práticas laboratoriais e do cumprimento destas instruções de utilização.

Este produto deve ser manuseado por pessoal qualificado e com formação no processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de vestuário e áreas de trabalho que sejam adequados para o processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de vestuário especial e instrumentos específicos para preparação da sessão de trabalho, para evitar falsos resultados positivos.

Devido a diferenças inerentes entre tecnologias, é recomendado que os utilizadores realizem estudos de correlação do método para calcular diferenças tecnológicas antes de mudar para uma nova tecnologia.

Um resultado negativo obtido com este produto significa que o ADN alvo não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode negligenciar-se o facto de o ADN alvo ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (Ver Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

No caso de co-infeções, a sensibilidade de um alvo pode ser afetada pela amplificação de um segundo alvo.

Os resultados obtidos com este produto podem, por vezes, ser inválidos devido a uma falha do controlo interno. Neste caso, a amostra deve ser novamente testada, começando pela extração, que pode levar a um atraso na obtenção dos resultados finais.

Possíveis polimorfismos na região do ADN alvo abrangidos pelos primários do produto e as sondas podem prejudicar a deteção do ADN alvo.

Este produto não é capaz de detetar os tipos mcr do 3 ao 5 e do 7 ao 10. Este produto é capaz de detetar o tipo mcr-6 no detetor de mcr-2.

Este produto é capaz de detetar a resistência à colistina transmissível (mediada pelo plasmídeo) através dos genes mcr-1 e mcr-2, não sendo capaz de detetar resistência cromossómica.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e outros testes laboratoriais efetuados ao doente.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, existe um risco residual de resultados inválidos, falsos positivos e falsos negativos obtidos com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou ainda mais reduzido. Em alguns casos, este risco residual pode contribuir para decisões erradas com potenciais efeitos perigosos para o doente.

**RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS**

<b>Reação de Positive Control inválida</b>	
<b>Causas possíveis</b>	<b>Soluções</b>
Erro na preparação da sessão.	Verifique a posição da PCR Mix e do Positive Control. Verifique os volumes da PCR Mix e do Positive Control.
Degradação do Positive Control.	Utilize uma nova alíquota de Positive Control.
Degradação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

<b>Reação de Negative Control inválida</b>	
<b>Causas possíveis</b>	<b>Soluções</b>
Erro na preparação da sessão.	Verifique a posição da PCR Mix e do Negative Control. Verifique os volumes da PCR Mix e do Negative Control.
Contaminação do Negative Control.	Utilize uma nova alíquota de água de qualidade para biologia molecular.
Contaminação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Contaminação da área de extração, de Racks ou do Inventory Block.	Limpe as superfícies com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

<b>Reação da amostra inválida</b>	
<b>Causas possíveis</b>	<b>Soluções</b>
Erro na preparação da sessão.	Verifique a posição da PCR Mix, Controlo Interno e da amostra. Verifique os volumes da PCR Mix, Controlo Interno e da amostra.
Degradação do modelo de Controlo Interno.	Utilize novas alíquotas de Controlo Interno.
Inibição devido a substâncias que interferem na amostra. <i>(por exemplo, turbidez)</i>	Repita a amplificação com uma diluição 1:2 ou 1:5 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR Only". Repita a extração com uma diluição adicional de 1:2 em meio eNAT™ da amostra testada numa sessão "Extração + PCR".
Degradação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Erro 30103	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra.	Se for observada uma amplificação significativa no lote PCR: - seleccione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado. Se for necessário um valor Ct: - repita a amplificação com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão PCR Only” ou - repita a extração com uma diluição adicional de 1:10 em meio eNAT™ da amostra testada numa sessão “Extração + PCR”.

Elevada taxa anómala de resultados positivos na mesma sessão (reações com valores Ct recentes semelhantes)	
Causas possíveis	Soluções
Contaminação amostra-para-amostra durante as etapas pré-analíticas	Evitar qualquer contacto entre a micropipeta e a parede do tubo. Limpar a micropipeta com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% nova ou ADN/ARN mais limpo após usar a pipeta em cada amostra. Não usar pipetas Pasteur. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. Introduzir as amostras nas últimas posições dos instrumentos, tal como indicado nas GUI do ELITe InGenius. Siga a sequência de carregamento indicada pelo software.
Contaminação pelo ambiente laboratorial	Limpe todas as superfícies em contacto com o operador e as amostras (incluindo as pipetas) com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% nova ou ADN/ARN mais limpo. Realize um ciclo de descontaminação U.V. Utilize um novo tubo da PCR Mix e/ou CPE.

**SÍMBOLOS**

-  Número do catálogo.
-  Limite máximo da temperatura.
-  Código do lote.
-  Usar até (último dia do mês).
-  Dispositivo médico de diagnóstico in vitro.
-  Cumpre os requisitos do Regulamento (UE) 2017/746 sobre dispositivos médicos de diagnóstico in vitro. Certificação emitida pela DEKRA Certification B.V., Países Baixos.
-  Identificação única do dispositivo
-  Contém suficiente para “N” testes.
-  Atenção, consulte as instruções de utilização.
-  Conteúdo.
-  Manter afastado da luz solar.
-  Fabricante.

**NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES**

Qualquer incidente grave ocorrido relacionado com o dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e às autoridades competentes do Estado-Membro em que o utilizador e/ou o doente se encontram localizados. No momento da revisão atual das IU, não ocorreram incidentes graves ou a retirada do mercado do dispositivo.

Um "Resumo da segurança e desempenho" será disponibilizado ao público através da base de dados europeia para dispositivos médicos (Eudamed) quando este sistema informático estiver operacional.

**NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA  
LIMITADA**

Os reagentes de deteção ELITe MGB® são abrangidos por um ou mais dos números de patente dos EUA 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 números de patente EP 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 bem como pedidos que estejam atualmente pendentes.

Esta licença limitada permite à pessoa, ou entidade legal à qual este produto foi fornecido, usar o produto e os dados gerados pela utilização do produto, apenas para diagnóstico humano. Nem o ELITechGroup S.p.A. nem os respetivos licenciantes concedem quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, para quaisquer outros fins.

# COLISTIN\_R ELITE MGB® Kit used with ELITE InGenius®

Ref: RTS202ING-48

 This document is a simplified version of the official instruction for use. Before use please refer to the complete instruction for use downloadable at: [www.elitechgroup.com](http://www.elitechgroup.com)  
This document is available only in English.

## A. Intended use

The product **COLISTIN-R ELITE MGB® Kit** is an in vitro diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as qualitative nucleic acids amplification assay for the detection and identification of the transmissible Colistin-resistance *mcr-1* and *mcr-2* gene DNA of *Enterobacteriaceae* in clinical samples.

The assay is validated in association with the **ELITE InGenius®** instrument, an automated integrated system for extraction, real time PCR and results interpretation, starting from rectal swabs.

The product is intended for use as an aid in the diagnosis of infections of *Enterobacteriaceae* positive for Colistin transmissible resistance genes, together with the patient's clinical data and other laboratory test results.

## B. Amplified sequence

Target for Qualitative Application	Gene	Fluorophore
Target 1	<i>mcr-1</i> gene	AP639 (CH 5)
Target 2	<i>mcr-2</i> gene	FAM (CH 1)
Internal Control	IC2	AP525 (CH 2)

## C. Validated Matrices

› Rectal Swabs

## D. Tube type collection

Copan Ref.	Description
480CE	eSwab

## E. Kit content

### COL PCR Mix (Neutral)



X 4 (RTS202ING-48)

tubes of 280 µL  
48 reactions per kit (ref. RTS202ING-48)  
7 freeze-thaw cycles

Maximum Shelf-life: 24 Months

Storage temp.: - 20 °C

## F. Material required not provided in the kit

- › ELITE InGenius instrument: INT030
- › ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200
- › ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR
- › ELITE InGenius Waste Box: F2102-000
- › 300 µL Filter Tips Axygen: TF-350-L-R-S
- › COLISTIN-R - ELITE Positive Control: CTR202ING
- › CPE - Internal Control: CTCRPE
- › eSWAB: 480CE
- › eNAT: 606CS01R

## G. ELITE InGenius® Protocol

Protocol	Volume
Sample	200 µL
Total eluate	100 µL
PCR eluate input	20 µL
Complete PCR Mix	20 µL
Control Frequency	15 days
Calibration Frequency	60 days

## H. Performance

Target	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
mcr-1	Rectal swab	32 CFU/mL	100% 55/55*	98% 54/55*
mcr-2	Rectal swab	50 CFU/mL	100% 51/51*	100% 55/55*

\*confirmed samples / tested samples

## I. Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to setup the run. All the steps, extraction, amplification, and result interpretation, are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, extraction only or PCR only.

### Before analysis

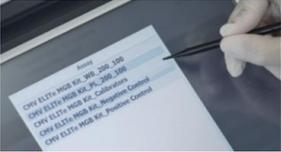
1. Switch on ELITE InGenius  
Login with username and password  
Select the mode "Closed"
2. Verify controls: COL pos. and neg.  
controls in the "Control menu"  
*NB:* Both must have been run,  
approved and not expired
3. Thaw COL PCR Mixes and the  
Internal Control tubes  
Vortex gently  
Spin down 5 sec

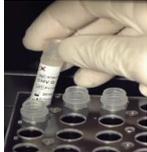
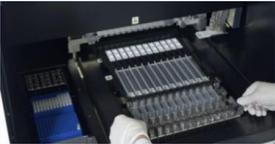
### Procedure - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch  
screen  

2. Verify the extraction volumes:  
Input: "200 µL", eluate: "100 µL"  

3. Scan the sample barcodes with hand-  
barcode reader or type the sample ID  

4. Select the "Assay protocol" of  
interest  

5. Select the sample position:  
"Extraction tube"  

6. Load the PCR Mixes and the Internal  
Control in the inventory block  

7. Load: PCR cassette, Extraction  
cartridge, Elution tube, Tip,  
Extraction tube racks  

8. Close the door Start the run  

9. View, approve and store the results  
