

Istruzioni per l'uso

***C. difficile* ELITe MGB® Kit**

reagenti per la Real-Time PCR del DNA



REF M800358

UDI 08033891486563



CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Rev.	Notifiche dei cambiamenti	Data (gg/mm/aa)
08	Implementazione dell'analisi con il modello 13 per gli strumenti ELITE InGenius e BeGenius	05/09/25
07	Espansione dell'uso del prodotto in associazione con lo strumento ELITE BeGenius Nuovo formato grafico e nuova impostazione dei contenuti dell'IFU	22/11/24
06	ELITE InGenius - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI: Aggiornamento di "markers potenzialmente interferenti" per includere <i>Clostridium Nexile</i> .	09/09/24
05	Aggiunta di dati analitici (Verifica LoD, equivalenza pretrattamento matrice, organismi e sostanze potenzialmente interferenti) e metodo alternativo di pretrattamento del campione	15/03/24
00-04	Nuovo sviluppo di prodotto e cambiamenti successivi	—

INDICE

1 USO PREVISTO	4
2 DESCRIZIONE DEL SAGGIO	4
3 PRINCIPIO DEL SAGGIO	4
4 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	5
5 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	5
6 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO	5
7 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	5
8 AVVERTENZE E PRECAUZIONI	7
9 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITE InGenius ed ELITE BeGenius	8
10 PROCEDURA ELITE InGenius	10
11 PROCEDURA ELITE BeGenius	16
12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius and ELITE BeGenius	20
13 CAMPIONI E CONTROLLI PER ALTRI STRUMENTI	31
14 PROCEDURA ALTRI STRUMENTI	33
15 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con ALTRI STRUMENTI	39
16 BIBLIOGRAFIA	51
17 LIMITI DELLA PROCEDURA	51
18 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	52
19 LEGENDA DEI SIMBOLI	56
20 AVVISO PER L'UTILIZZATORE	56
21 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	56
Appendix A QUICK START GUIDE	58

1 USO PREVISTO

Il prodotto **C. difficile ELiTe MGB® Kit** è un dispositivo medico diagnostico in vitro destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come un saggio qualitativo Real Time PCR degli acidi nucleici per **rilevazione dei geni codificanti le tossine A e B del *Clostridium difficile* (alias *Clostridioides difficile*, *C. difficile*), variante tossinogenica**, incluso il ceppo ipervirulento NAP1/BI/027, su campioni di DNA estratto da campioni di feci o feci non formate.

Il saggio è validato in associazione agli strumenti **ELiTe InGenius®** ed **ELiTe BeGenius®**, sistemi integrati e automatizzati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, a partire da campioni di feci o feci non formate.

Il saggio inoltre è validato in associazione al **7500 Real-Time PCR System** con campioni di feci o feci non formate.

Il prodotto ha lo scopo di aiutare nella diagnosi del *C. difficile* variante tossinogenica, nelle strutture sanitarie con fattori di rischio clinico ed epidemiologico.

I risultati devono essere interpretati insieme a tutte le osservazioni cliniche rilevanti e agli esiti degli esami di laboratorio.

2 DESCRIZIONE DEL SAGGIO

L'infezione da *C. difficile*, variante tossinogenica, si manifesta di solito con diarrea da lieve a moderata, con crampi addominali occasionali. In alcuni rari casi, pazienti con un'infezione da *Clostridium difficile* presentano colite acuta con rischio di mortalità. Circa il 20% dei pazienti ospedalizzati viene a contatto con *Clostridium difficile*, e nel 30% si possono avere manifestazioni diarroiche; la colite da *Clostridium difficile* si attesta infatti come una delle infezioni acquisite più comuni e la diagnosi dovrebbe essere sospettata in ogni paziente con diarrea che ha ricevuto antibiotici nei precedenti 2 mesi e/o quando la diarrea si prolunga per 72 o più ore dal ricovero ospedaliero. La colonizzazione avviene tramite la via oro- fecale. I ceppi patogeni di *Clostridium difficile* producono 2 distinte tossine: la tossina A, che è un'enterotossina, e la B, una citotossina. Sia la Tossina A che la Tossina B sembrano avere un ruolo nella patogenesi della colite umana da *Clostridium difficile*.

Il **C. difficile ELiTe MGB Kit** è un saggio di amplificazione Real Time con modalità triplex per la rilevazione della tossina A, della tossina B e del controllo interno di amplificazione. I saggi di amplificazione real time riducono in modo significativo il tempo dedicato alle analisi di laboratorio rispetto ai test standard su coltura, migliorando l'efficienza della procedura.

Il **C. difficile ELiTe MGB Kit** è in grado di rilevare sia la tossina A *gene (tcdA)* sia la B *gene (tcdB)*, e ciò permette di discriminare tutti i possibili genotipi tossinogenici (A+/B+; A+/B-; A-/B+).

3 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è una Real-Time PCR qualitativa per la rilevazione **dei geni codificanti le tossine A e B del *Clostridium difficile* (*C. difficile*)**, incluso il ceppo ipervirulento NAP1/BI/027, isolati da campioni e amplificato utilizzando il reagente **PCR Mix**, che contiene primers e sonde con tecnologia ELiTe MGB.

Le sonde ELiTe MGB sono attivate quando ibridate con il prodotto specifico della PCR. **ELiTe InGenius** ed **ELiTe BeGenius** monitorano l'incremento di fluorescenza emessa e calcolano i "cicli soglia" (Ct) e le temperature di melting (Tm).

Nelle sonde ELiTe MGB i fluorofori non emettono segnale quando la sonda non ibrida con il prodotto di reazione specifico. Quando la sonda ibrida con il prodotto specifico di amplificazione, il quencher viene separato dal fluoroforo ed emette il segnale di fluorescenza. Da notare che la sonda non viene idrolizzata durante la PCR e può essere utilizzata per l'analisi di dissociazione e il calcolo della temperatura di melting.

4 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **C. difficile ELITE MGB Kit** fornisce il reagente **C. difficile PCR Mix**, una miscela ottimizzata e stabilizzata di oligonucleotidi e reagenti per PCR che contiene i primers e le sonde specifici per:

- il gene **C. difficile toxin A-specific**, rilevato nel canale **Toxin A**: la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher®, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 525 (AP525).
- il gene **C. difficile toxin B-specific**, rilevato nel canale **Toxin B**: la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher®, e marcata con il fluoroforo FAM.
- la sequenza artificiale **IC2** del Controllo Interno esogeno, rilevata nel canale **IC**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor 642 (AP642).

La miscela di reazione **C. difficile PCR Mix** contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfati e la DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

Il prodotto **C. difficile ELITE MGB Kit** consente di effettuare **96 test** in associazione con **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**, utilizzando 20 µL per reazione.

Il prodotto consente di effettuare **100 test** in associazione con gli altri sistemi validati, utilizzando 20 µL per reazione.

5 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Tabella 1

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
C. difficile PCR Mix cod. M800358	Miscela di reagenti per la Real-Time PCR, in provetta con tappo GIALLO	4 × 540 µL	-

6 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o materiale analogo.
- Agitatore Vortex.
- Centrifuga da banco (~5,000 giri/minuto).
- Microcentrifuga da banco (~13,000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a spostamento positivo (intervallo di volume: 0,5-1000 µL).
- Provette sterili da 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005).
- Provette sterili da 0,5 mL con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.730.005)
- Acqua per biologia molecolare.

7 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

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

Per l'estrazione automatica degli acidi nucleici, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati delle analisi eseguite sui campioni da analizzare, sono richiesti i seguenti prodotti.

Tabella 2

Strumenti e Software	Prodotti e Reagenti
ELITE InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA cod. INT030) ELITE InGenius Software versione 1.3.0.19 (o successiva) Cdiff ELITE_PC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo Cdiff ELITE_NC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo Cdiff ELITE_ST_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di feci.	C. difficile – ELITE Positive Control (EG SpA, cod. M800373) ELITE InGenius SP 200 (EG SpA, cod. INT032SP200) CPE - Internal Control (EG SpA, cod. CTRCPE) Reagenti e consumabili ELITE InGenius e ELITE BeGenius (vedi Manuale di utilizzo di ELITE InGenius e ELITE BeGenius)
ELITE BeGenius (EG SpA cod. INT040) ELITE BeGenius Software versione 2.3.0. (o successiva) Cdiff ELITE_Be_PC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo Cdiff ELITE_Be_NC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo Cdiff ELITE_Be_ST_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di feci	
7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, cod. 4406985) NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, cod. 200111) ELITE STAR (EG SpA, cod. INT010) ELITE GALAXY (EG SpA, cod. INT020)	MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (Life Technologies, ref. 4346906) NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux SA, cod. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), InviMag Universal Kit / IG (INVITEK, cod. 2450120100). ELITE GALAXY 300 Extraction Kit (EG SpA, cod. INT021EX), CPE – Internal Control (EG SpA, cod. CTRCPrE) C. difficile – ELITE Positive Control (EG SpA, cod. M800373) S.T.A.R. buffer (Roche Diagnostics GmbH, cod. 3 335 208).

8 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Questo prodotto è riservato esclusivamente all'uso *in vitro*.

8.1 Avvertenze e precauzioni generali

- Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare provette, puntali, e gli altri materiali che vengono a contatto con i campioni biologici per almeno 30 minuti con ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o in autoclave a 121 °C per un'ora prima di smaltirli.
- Manipolare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali utilizzati per eseguire il saggio come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare e smaltire i rifiuti nel rispetto di norme di sicurezza adeguate. Incenerire il materiale monouso combustibile. Neutralizzare i rifiuti liquidi contenenti acidi o basi prima di smaltirli. Evitare che i reagenti di estrazione entrino in contatto con l'ipoclorito di sodio (candeggina).
- Indossare indumenti protettivi e guanti adatti a proteggersi gli occhi e il viso.
- Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.
- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici sul posto di lavoro.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.
- Eliminare i reagenti avanzati e i rifiuti secondo le norme vigenti.
- Prima di eseguire il saggio, leggere attentamente tutte le istruzioni fornite con il prodotto.
- Durante l'esecuzione del saggio attenersi alle istruzioni fornite con il prodotto.
- Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.
- Utilizzare solo i reagenti in dotazione con il prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.
- Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

8.2 Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

Le procedure di biologia molecolare devono essere eseguite da personale qualificato e addestrato per evitare il rischio di risultati errati, soprattutto a causa della degradazione degli acidi nucleici contenuti nei campioni o della contaminazione dei campioni stessi da parte di prodotti di amplificazione.

Quando la sessione di amplificazione deve essere eseguita manualmente, è necessario disporre di aree separate per l'estrazione / preparazione delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevamento dei prodotti di amplificazione. Non introdurre mai un prodotto di amplificazione nell'area destinata all'estrazione / preparazione delle reazioni di amplificazione.

Quando la sessione di amplificazione deve essere eseguita manualmente, è necessario disporre di camici, guanti o strumenti da laboratorio da usare esclusivamente per l'estrazione / preparazione delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevamento dei prodotti di amplificazione.

Non trasferire mai camici, guanti o strumenti da laboratorio dall'area designata per l'amplificazione / rilevamento dei prodotti di amplificazione all'area designata per l'estrazione / preparazione delle reazioni di amplificazione.

Utilizzare camici, guanti e strumenti per la preparazione delle sessioni di lavoro.

I campioni devono essere idonei e, se possibile, specifici per questo tipo di analisi. Manipolare i campioni sotto una cappa a flusso laminare. Utilizzare le pipette destinate alla manipolazione dei campioni solo per questo specifico scopo. Utilizzare pipette a spostamento positivo o con puntali con filtro per aerosol. Utilizzare puntali sterili, esenti da DNasi e RNasi, come anche da DNA e RNA.

Manipolare i reagenti sotto una cappa a flusso laminare. Utilizzare le pipette destinate alla manipolazione dei reagenti unicamente per questo scopo. Utilizzare pipette a spostamento positivo o con puntali con filtro per aerosol. Utilizzare puntali sterili, esenti da DNasi e RNasi, come anche da DNA e RNA.

Manipolare i campioni estratti in modo tale da ridurre quanto più possibile la dispersione nell'ambiente per prevenire il rischio di contaminazione.

Gestire le cassette di PCR (PCR Cassette) in modo tale da ridurre quanto più possibile la diffusione dei prodotti di amplificazione nell'ambiente come pure la contaminazione dei campioni e dei reagenti.

8.3 Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Tabella 3

Componente	Temperatura di conservazione	Utilizzo dalla prima apertura	Cicli di congelamento/scongelamento	Stabilità On board (ELITE InGenius ed ELITE BeGenius)
C. difficile PCR Mix	-20 °C o inferiore (protetta dalla luce)	entro un mese	fino a cinque	fino a cinque sessioni indipendenti da tre ore circa ciascuna

9 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITE InGenius ed ELITE BeGenius

9.1 Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato su **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** con i seguenti campioni clinici identificati e gestiti secondo le linee guida di laboratorio e raccolti, trasportati e conservati nelle seguenti condizioni:

Tabella 4

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto e conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2° / +8°C*	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
Feci native	raccolte senza conservanti	≤ 24 ore	≤ 48 ore	≤ 1 mese	> 1 mese

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.

Seguire le istruzioni descritte di seguito per il pretrattamento dei campioni con InhibitEX Buffer (QIAGEN, Germania, rif. 19593):

Procedura di pre-trattamento a partire da feci native raccolte senza conservanti

- trasferire 1 mL di InhibitEX Buffer in una provetta Sarstedt da 2 mL,
- raccogliere il campione di feci con un tampone Minitip Flocked Swab with 80mm Break (Copan), raccogliere il campione da diverse porzioni di feci e scartare l'eccesso appoggiandosi alla parete del contenitore,
- immergere il tampone nella provetta Sarstedt da 2 mL contenente il tampone InhibitEX e ruotarlo almeno 10 volte, appoggiandolo alla parete
- gettare il tampone e chiudere il tappo della provetta, miscelare con vortex per ~60 secondi,
- incubare in un termomixer a ~+80 °C e ~800 RPM per 10 min, centrifugare a 10.000x RCF per 15 secondi,
- trasferire con cautela 200 µL del surnatante delle feci chiarificate in un Extraction tube (per lo strumento ELITE InGenius) o in una provetta Sarstedt da 2 mL (per lo strumento ELITE BeGenius) facendo attenzione a non prelevare il pellet di materiale fecale.

Seguire le istruzioni descritte di seguito per il pretrattamento dei campioni con il tampone S. T. A. R. (Roche Diagnostics GmbH, rif. 3 335 208):

Procedura di pre-trattamento a partire da feci native raccolte senza conservanti

- preparare due tubi da 1,5 mL per ogni campione di feci e dispensare 0,8 mL di S.T.A.R. buffer dentro un tubo.

- vortexare il campione di feci e utilizzare una pipetta dotata di puntale resistente all'aerosol per trasferire circa 200 µL di feci (usare un puntale a punta larga o una spatola di plastica per campioni densi) dentro il tubo da 1,5 mL contenente lo S.T.A.R. buffer.
- chiudere il tubo e vortexare per mescolare la soluzione in modo omogeneo (20-30 sec). Centrifugare la soluzione omogenea a 13.000xg (RCF) per 1 minuto per chiarificare il campione.
- trasferire con attenzione il surnatante limpido dentro un Extraction Tube (per lo strumento ELITE InGenius) o in una provetta Sarstedt da 2 mL (per lo strumento ELITE BeGenius) facendo attenzione a non prelevare il pellet di materiale fecale.
- conservare le feci chiarificate a +2 /+8 °C per un massimo di 7 giorni prima di procedere con l'estrazione.

NOTA

Lo S.T.A.R. Buffer deve essere mantenuto a temperatura ambiente. Si possono formare dei precipitati bianchi quando il buffer è conservato a temperature inferiori. Prima di iniziare la procedura di estrazione verificare la presenza di eventuali precipitati e, in caso affermativo, scaldare la soluzione a 30-40 °C in un bagnetto termico fino a che i precipitati siano completamente dissolti

Conservare gli acidi nucleici purificati a +2/+8° C se saranno utilizzati lo stesso giorno dell'estrazione oppure a temperatura inferiore a -20° C se il periodo di conservazione è più lungo

Per eseguire l'analisi dei campioni su **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius**, è necessario utilizzare gli Assay Protocols di seguito indicati. Questi protocolli di saggio IVD sono stati validati per l'uso specifico con i kit ELITE MGB e **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius** con le matrici indicate.

Tabella 5 Assay Protocol per C. difficile ELITE MGB Kit

Campione	Strumento	Nome Assay Protocol	Report	Caratteristiche
Feci native raccolte senza conservanti	ELITE InGenius	Cdiff ELITE_ST_200_100	Positivo / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL Analisi di melting
	ELITE BeGenius	Cdiff ELITE_Be_ST_200_100		

Per tutti i protocolli, è richiesto il trasferimento di 200 µL di campione in un Extraction tube (per ELITE InGenius) o in una provetta Sarstedt da 2 mL (per ELITE BeGenius).

NOTA

Il trasferimento con le pipette dei campioni nell' **Extraction Tube** o nella **provetta Sarstedt da 2 mL** potrebbe **generare contaminazione**. Utilizzare le pipette appropriate e seguire tutte le raccomandazioni riportate nella sezione 8 AVVERTENZE E PRECAUZIONI pagina 7.

Gli acidi nucleici purificati possono essere lasciati a temperatura ambiente per 16 ore e conservati a -20 °C o temperatura inferiore per periodi non più lunghi di un mese.

I dati disponibili relativi all'inibizione indotta da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo "Sostanze potenzialmente interferenti" al capitolo [12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius and ELITE BeGenius pagina 20](#).

9.2 Controlli di PCR

E' obbligatorio generare e approvare i controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione:

- come Controllo Positivo di PCR utilizzare il prodotto **C.difficile - ELITE Positive Control** (non fornito in questo kit), in associazione con gli Assay Protocol **Cdiff ELITE_PC** o **Cdiff ELITE_Be_PC**

- come Controllo Negativo di PCR utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita in questo kit) in associazione con gli Assay Protocol **Cdiff ELiTe_NC** o **Cdiff ELiTe_Be_NC**.

NOTA

ELiTe InGenius ed **ELiTe BeGenius** richiedono risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di PCR. La validazione dei risultati dei controlli di PCR approvati e memorizzati nel database, scade dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza è necessario eseguire nuovamente l'analisi dei controlli positivi e negativi. Inoltre, i controlli di amplificazione devono essere ritestati nei seguenti casi:

- quando si utilizza un nuovo lotto di reagenti di PCR,
- quando i risultati delle analisi di controllo qualità (vedi paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche,
- quando **ELiTe InGenius** o **ELiTe BeGenius** deve essere sottoposto ad un intervento di manutenzione principale.

9.3 Controlli di qualità

Si consiglia la verifica programmata della procedura di estrazione e amplificazione. Si possono utilizzare campioni testati o materiale di riferimento certificato. Quando disponibili, utilizzare i controlli esterni in conformità a leggi locali, statali, organizzazioni di accreditamento federali.

I controlli esterni per i saggi del *Clostridium difficile* sono disponibili presso diverse aziende (es. Qnostics Ltd, UK, e ZeptoMetrix Corp., US).

10 PROCEDURA ELiTe InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **C. difficile ELiTe MGB Kit** con **ELiTe InGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 6

FASE 1	Verifica che il sistema sia pronto	
FASE 2	Impostazione della sessione	A) Corsa dei campioni (Extract + PCR)
		B) Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
		C) Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).
FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	1) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		2) Validazione dei risultati dei campioni
		3) Refertazione dei risultati dei campioni

10.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- Accendere lo strumento **ELiTe InGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**",
- Nella sezione "Controls" della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**Positive Control**, **Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili Controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito,
- Selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").

Se l'Assay Protocol d'interesse non è presente nel sistema, rivolgersi al Servizio Clienti ELiTechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

10.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **C. difficile ELiTe MGB Kit** può essere utilizzato con **ELiTe InGenius** per eseguire:

- A. Corsa dei campioni (Extract + PCR),
- B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
- C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi nell'Assay Protocol disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay Protocol.

NOTA

ELiTe InGenius può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile scaricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Prima di impostare una sessione:

Scongelerare le provette necessarie di **PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (almeno 5 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

La miscela **PCR Mix** è fotosensibile per cui non va esposta alla luce diretta.

Per l'impostazione dei tre tipi di sessione procedere con i seguenti passaggi seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI).

Tabella 7

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Pretrattare i campioni secondo la procedura descritta al paragrafo "Campioni e Controlli". Per l'analisi, 200 µL di campione pretrattato devono essere trasferiti in un Extraction tube (tubo di estrazione) precedentemente etichettato.	Scongelerare a temperatura ambiente gli Elution tube (Provetta con eluato) con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelerare le provette di Controllo Positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 4 reazioni.
2	Scongelerare le provette necessarie di controllo interno CPE a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 12 reazioni.	Non applicabile	Preparare il Controllo Negativo trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un Elution tube (Provetta eluato), fornito con il prodotto ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (Esegui sessione)	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (Esegui sessione).
4	Verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (Volume di eluato estratto) sia 100 µL.	Verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (Volume di eluato estratto) sia 100 µL.	Verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (Volume di eluato estratto) sia 100 µL.

Tabella 7 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
5	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (ID campione, SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (ID campione, SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Non applicabile
6	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli") e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del Positive Control e dell'acqua per biologia molecolare.
7	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" (Protocollo) selezionare "PCR Only".	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) il protocollo visualizzato sia: "PCR Only".
8	Nella colonna "Sample Position" (Posizione campione) selezionare "Extraction Tube" (Tubo di estrazione) come posizione in cui caricare il campione.	Verificare nella colonna "Sample Position" (Posizione campione) che la posizione sia "Elution Tube".	Verificare nella colonna "Sample Position" (Posizione campione) che la posizione sia "Elution Tube".
9	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.
10	Caricare il CPE e la PCR Mix nell' "Inventory Block" (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi	Caricare la PCR Mix nell' "Inventory Block" (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.	Caricare la PCR Mix nell' "Inventory Block" (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
11	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
12	Nell'"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali)	Nell'"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali).	Nell'"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali).
13	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
14	Caricare le PCR cassette , le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200", tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre.	Caricare le PCR cassette e gli Elution tube con i campioni da analizzare.	Caricare le PCR cassette e le provette per il Controllo Positivo ed il Controllo Negativo.
15	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
16	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
17	Premere "Start" (Inizio).	Premere "Start" (Inizio).	Premere "Start" (Inizio).

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

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a -20 ± 10 °C al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto

NOTA

Alla fine della corsa la **PCR Mix** può essere rimossa dallo strumento, tappata e conservata a -20 °C o temperatura inferiore, o può essere conservata on board nel blocco refrigerato fino a 5 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna; mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento le provette di **Controllo Positivo**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Controllo Positivo. Smaltire le provette di **Controllo Negativo**.

NOTA

Il **Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

NOTA

Alla fine della corsa, rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

10.3 FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

ELITE InGenius monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri dell'Assay Protocol per generare curve di PCR e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display", nella quale sono riportati i risultati e le informazioni riguardanti la sessione. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

NOTA

ELITE InGenius può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile inviare i risultati della sessione di lavoro al centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

ELITE InGenius genera i risultati del prodotto **C. difficile ELITE MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

1. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
2. Validazione dei risultati dei campioni,
3. Refertazione dei risultati dei campioni.

10.3.1 Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo

Il software **ELITE InGenius** interpreta i risultati di PCR dei target del Controllo Positivo e del Controllo Negativo con i parametri inclusi negli Assay Protocol "**ELITE_PC**" e "**ELITE_NC**". I valori di Ct e Tm ottenuti sono utilizzati per validare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati del **Controllo Positivo** e **Controllo Negativo**, specifici per il lotto del reagente di PCR, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere consultati e approvati da personale avente la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo scadono **dopo 15 giorni**.

I risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo vengono utilizzati dal software **ELITE InGenius** per impostare i grafici di controllo che monitorano le prestazioni delle fasi di amplificazione. Per maggiori dettagli, consultare il manuale dello strumento.

NOTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Controls" appare il messaggio "Failed" che ne impedisce l'approvazione. In tal caso, ripetere la reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo.

NOTA

Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo sono amplificati insieme ai campioni da analizzare e il risultato non è valido, i campioni possono essere approvati, ma i risultati non sono validati. In tal caso, l'amplificazione dei Controlli non validi e di tutti i campioni deve essere ripetuta.

10.3.2 Validazione dei risultati dei campioni

Il **software ELITE InGenius** interpreta i risultati di amplificazione del target (canali **Toxin A** e **Toxin B**) e del controllo Interno (canale **IC**) con i parametri inclusi nell' Assay Protocol **Cdiff ELITE_ST_200_100**.

I risultati vengono mostrati nella schermata "Results Display".

La corsa del campione può essere approvata quando sono soddisfatte le condizioni riportate nella tabella sottostante.

Tabella 8

1) Controllo Positivo	Stato
C. difficile Positive Control	APPROVATO
2) Controllo Negativo	Stato
C. difficile Negative Control	APPROVATO

I risultati del campione vengono interpretati automaticamente dal **software ELITE InGenius** utilizzando i parametri dell'Assay Protocol. La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato ottenuto.

Per ogni campione il sistema riporta una combinazione dei seguenti messaggi specificando se il DNA dei patogeni è stato rilevato o non rilevato.

Tabella 9

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
Tossina A: DNA rilevato C.difficile	Il DNA del gene codificante la tossina A di C. difficile è stato rilevato nel campione. Il campione è positivo per <i>C. difficile</i>
Tossina B: DNA rilevato C.difficile	Il DNA del gene codificante la tossina B di C. difficile è stato rilevato nel campione. Il campione è positivo per <i>C. difficile</i> .
Tossina B: DNA rilevato C.difficile possibile 027	Il DNA del gene codificante la tossina B di C. difficile è stato rilevato nel campione e del ceppo ribotipo 027 ipervirulento. Il campione è positivo per <i>C. difficile</i> .
Tossina B: DNA rilevato Specie non determinata	È stata rilevata la presenza del gene della tossina B nel campione, sebbene non sia possibile determinare la specie. È possibile la presenza di DNA proveniente da altre specie correlate ai Clostridioides. Non è possibile escludere la presenza di basse copie di <i>C. difficile</i> .

Tabella 9 (segue)

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
Tossina B: DNA rilevato C.difficile DNA rilevato C. difficile possibile 027	Il DNA del gene codificante la tossina B di C. difficile è stato rilevato nel campione. È stata rilevata anche la presenza del DNA della tossina B del ceppo ipervirulento del ribotipo 027 di C. difficile. Il campione è positivo per C. difficile.
Tossina B: DNA rilevato Specie non determinata DNA rilevato C.difficile	Il DNA del gene codificante la tossina B di C. difficile è stato rilevato nel campione. È stata rilevata anche la possibile presenza di DNA della tossina B proveniente da altre specie correlate ai Clostridioides. Il campione è positivo al C. difficile.
Tossina B: DNA rilevato Specie non determinata DNA rilevato C.difficile possibile 027	Il DNA del gene codificante la tossina B di C. difficile è stato rilevato nel campione e potrebbe trattarsi di un ceppo ipervirulento del ribotipo 027. È stata rilevata anche la possibile presenza di DNA della tossina B proveniente da altre specie correlate ai Clostridioides. Il campione è positivo al C. difficile.
Tossina B: DNA rilevato Specie non determinata DNA rilevato C.difficile DNA rilevato C.difficile possibile 027	Il DNA del gene codificante la tossina B di C. difficile è stato rilevato nel campione. È stata rilevata anche la possibile presenza del DNA della tossina B del ceppo ipervirulento del ribotipo 027 di C. difficile e del DNA della tossina B di altre specie correlate ai Clostridioides. Il campione è positivo per C. difficile.
Tossina A:DNA non rilevato o inferiore LoD	Il DNA del gene codificante la tossina A di C. difficile non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per C. difficile o la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevabilità del saggio
Tossina B:DNA non rilevato o inferiore LoD	Il DNA del gene codificante la tossina B di C. difficile non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per C. difficile o la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevabilità del saggio.
Non Valido - Ripeti test su campione	Risultato del saggio non valido per un errore del controllo interno (es: estrazione errata, presenza di un inibitore). Il test deve essere ripetuto.

Campioni che riportano il risultato "Non Valido - Ripeti test su campione": in questo caso il DNA del Controllo Interno non è stato rilevato in maniera efficace per problemi nella fase di campionamento, estrazione o amplificazione (e.g. errato campionamento, degradazione o perdita di DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono generare risultati errati

Quando il volume è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato, mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only".

In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota in modalità "Extract + PCR" (vedi [18 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 52](#)).

I campioni segnalati come "non rilevato o inferiore LoD" sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA di C. difficile per i geni codificanti la tossina A e B. In tal caso non si può escludere che il DNA di C. difficile per i geni codificanti la tossina A e B sia presente ad una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedi [12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius and ELITe BeGenius pagina 20](#)). In alternativa, nel campione potrebbe essere presente un C. difficile, variante non tossinogenica.

I campioni rilevati come "DNA rilevato Specie non determinata" sono idonei all'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA di C. difficile per i geni della tossina A e della tossina B. In questo caso non si può escludere che il DNA di C. difficile per i geni della tossina A e della tossina B sia presente a una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del test (vedi). In alternativa, nel campione potrebbe essere presente un C. difficile, variante non tossinogenica.

NOTA

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

I risultati della sessione analitica sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Results Display) da personale avente la qualifica di "Administrator" o "Analyst" seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Dalla finestra "Results Display" è possibile stampare e salvare i risultati della sessione analitica sotto forma di "Sample Report" e "Track Report".

10.3.3 Refertazione dei risultati dei campioni

I risultati del campione sono memorizzati nel database e possono essere visualizzati o esportati sotto forma di "Sample Report" e "Track Report".

Il "Sample Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per campione selezionato (SID).

Il "Track Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per track selezionato.

Il "Sample Report" e il "Track Report" possono essere stampati e firmati da personale autorizzato.

11 PROCEDURA ELITe BeGenius

La procedura di utilizzo del prodotto **C. difficile ELITe MGB Kit** con **ELITe BeGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 10

FASE 1	Verifica che il sistema sia pronto	
FASE 2	Impostazione della sessione	A) Corsa dei campioni (Extract + PCR)
		B) Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
		C) Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).
FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	1) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		2) Validazione dei risultati dei campioni
		3) Refertazione dei risultati dei campioni

11.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITe BeGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**",
- nella sezione "Controls" della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**Positive Control**, **Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito,
- selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").

Se l'Assay Protocol d'interesse non è presente nel sistema, rivolgersi al Servizio Clienti ELITechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

11.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **C. difficile ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con il sistema **ELITe BeGenius** per eseguire:

A. Corsa dei campioni (Extract + PCR),

B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only),

C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi nell'Assay Protocol disponibile sullo strumento e vengono richiamati automaticamente nel momento in cui lo si seleziona.

NOTA

ELiTe BeGenius può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile scaricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Prima di impostare una sessione:

Scongelare le provette necessarie di **PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (almeno 5 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

La miscela **PCR Mix** è fotosensibile per cui non va esposta alla luce diretta.

Per l'impostazione dei tre tipi di sessione procedere con i seguenti passaggi seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI).

Tabella 11

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Pretrattare i campioni secondo la procedura descritta al paragrafo "Campioni e Controlli". Per l'analisi, 200 µL di campione pretrattato devono essere trasferiti in un Tubo Sarstedt da 2 mL precedentemente etichettato.	Scongelare a temperatura ambiente gli " Elution tube " (Provetta con eluato) con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelare le provette di Controllo Positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 4 reazioni.
2	Scongelare le provette necessarie di controllo interno CPE a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene volume sufficiente per 12 reazioni.	Non applicabile	Preparare il Controllo Negativo trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un " Elution tube " (Provetta con eluato), fornito con il prodotto ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run " (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run " (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run " (Esegui sessione).
4	Rimuovere tutti i Racks dalla "Cooler Unit" e posizzarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i Racks dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizzarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i Racks dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizzarli sul tavolo di preparazione.
5	Selezionare il "Run mode": " Extract + PCR ".	Selezionare il "Run mode": " PCR Only ".	Selezionare il "Run mode": " PCR Only ".
6	Caricare i campioni nel " Sample Rack " (Rack campioni). Quando si utilizzano tubi secondari "2 mL Tube" utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack	Caricare gli eluati dei campioni estratti nell' " Elution Rack " (Rack di eluizione).	Caricare le provette di Controllo Positivo e di Controllo Negativo nell' "Elution Rack" (Rack di eluizione).

Tabella 11 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
7	Inserire il "Sample Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 5" (L5). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse inserire il "SampleID" (ID campione, SID). (Se si utilizzano tubi secondari, selezionare "2 mL Tube". Se il tubo secondario non ha etichetta o barcode, digitare manualmente il "SID".	Inserire il "Elution Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (ID campione, SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol."	Inserire il "Elution Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (ID campione, SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol."
8	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.
9	Verificare che "Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluato estratto) sia impostato a 100 µL.	Non applicabile	Non applicabile
10	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.
11	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
	Nota: Quando devono essere analizzati più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.		Non applicabile
12	Caricare gli "Elution tube" (Provetta eluato) nell' "Elution Rack" (Rack di eluizione).	Non applicabile	Non applicabile
13	Inserire il "Elution Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). In caso di un numero di campioni maggiore di 12, ripetere usando "Lane 2" (L2).	Non applicabile	Non applicabile
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile	Non applicabile
15	Caricare il CPE e la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".
16	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR MIX e / o CPE inserire "S/N", "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR MIX inserire "S/N", "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR MIX inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).
17	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
18	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i "Tip Rack" (Rack Puntali).	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i "Tip Rack" (Rack Puntali).	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i "Tip Rack" . (Rack Puntali).
19	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.

Tabella 11 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
20	Caricare il "PCR Rack" con le "PCR Cassette" nell' Inventory Area.	Caricare il "PCR Rack con le "PCR Cassette" nell' Inventory Area.	Caricare il "PCR Rack con le "PCR Cassette" nell' Inventory Area.
21	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
22	Caricare l'"Extraction Rack" (rack di estrazione) con le cartucce di estrazione "ELiTe InGenius SP 200" e i consumabili richiesti.	Non applicabile	Non applicabile
23	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
24	Premere "Start" (inizio).	Premere "Start" (inizio).	Premere "Start" (inizio).

Dopo il completamento della procedura, **ELiTe BeGenius** permette di visualizzare, approvare e memorizzare i risultati, e di stampare e salvare il rapporto.

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a -20 ± 10 °C al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

NOTA

Alla fine della corsa, la **PCR Mix** può essere rimossa dallo strumento, tappata e conservata a -20 °C o temperatura inferiore, o può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 5 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna; mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento le provette di **Controllo Positivo**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Controllo Positivo. Smaltire le provette di **Controllo Negativo**.

NOTA

Il **Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

NOTA

Alla fine della corsa, rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

11.3 FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

ELiTe BeGenius monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri dell'Assay Protocol per generare curve di PCR e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display", nella quale sono riportati i risultati e le informazioni riguardanti la sessione. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

NOTA

ELITE BeGenius può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile inviare i risultati della sessione di lavoro al centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

ELITE BeGenius genera i risultati del prodotto **C. difficile ELITE MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

1. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
2. Validazione dei risultati dei campioni,
3. Refertazione dei risultati dei campioni.

NOTA

Per i dettagli fare riferimento agli stessi paragrafi della "Procedura" dello strumento **ELITE InGenius**.

12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius and ELITE BeGenius

12.1 Limite di rilevazione

La sensibilità analitica di questo saggio, come Limite di Rilevazione (LoD) dell'amplificazione del DNA, permette di rilevare la presenza di circa 10 copie in 10 µL di DNA aggiunto alla reazione di amplificazione.

L' LoD di questo saggio è stata testata utilizzando DNA plasmidico contenente i prodotti di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata mediante spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito a un titolo di circa 10 copie / 10 µL in presenza di 20.000 copie di Internal Control (IC) / 10 µL.

Questo campione è stato testato in 18 replicati effettuando l'amplificazione con prodotti ELITechGroup S.p.A. in associazione con due diversi strumenti.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 12

Campioni	N	positivi	negativi	Toxin A Ct medio	Toxin B Ct medio
10 copie plasmid DNA + 20,000 copie di IC	18	18	0	35,80	36,62

Il valore di LoD è stato verificato testando su ELITE InGenius campioni clinici di feci negative positivizzate con materiale di riferimento (Zeptomatrix) a 500 CFU / mL. Il test è stato eseguito utilizzando entrambe le procedure di pretrattamento **InhibitEX Buffer** (QIAGEN) e **S.T.A.R. buffer** (Roche Diagnostics GmbH).

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 13

campioni di feci	Titolo (CFU/mL)	N	C. difficile		% Positività
			Positivi	Negativi	
pretrattate con S.T.A.R Buffer	500	30	30	0	100 %
pretrattate con Inhibitex Buffer	500	30	30	0	100 %

Il valore di LoD di 500 CFU / mL è stato verificato testando con ELITE BeGenius campioni di feci native positivizzate con materiale di riferimento. I risultati ottenuti hanno confermato la concentrazione dichiarata.

12.2 Equivalenza del pretrattamento della matrice

L'equivalenza del pretrattamento della matrice tra **InhibitEX Buffer** (QIAGEN) e **S. T. A. R. buffer** (Roche Diagnostics GmbH) è stata verificata utilizzando campioni di feci native, presumibilmente negative, raccolte da diversi soggetti e gli stessi campioni addizionati con materiali di riferimento (ZeptoMetrix) a 3xLoD.

I risultati della concordanza percentuale negativa sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 14

Campioni di feci negative	N	C. difficile		% concordanza negativa
		Positivi	Negativi	
pretrattate con STAR Buffer	26	0	26	100%
pretrattate con Inibitex Buffer	26	0	26	100%

I risultati della concordanza percentuale positiva sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 15

Campioni di feci positivate	N	C. difficile		% concordanza positiva
		Positivi	Negativi	
pretrattate con STAR Buffer	25	25	0	100%
pretrattate con Inibitex Buffer	25	25	0	100%

12.3 Test con materiale di riferimento certificato

Le prestazioni del prodotto sono state valutate utilizzando il materiale di riferimento calibrato «Clostridium difficile 017 Evaluation Panel» (Qnostics, Ltd, Regno Unito). Ogni campione del pannello è stato testato in 2 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con i prodotti ELiTechGroup S.p.A. in associazione con lo strumento ELiTe InGenius.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 16 Test con «Clostridium difficile 017 Evaluation Panel»

Campioni	Contenuto del campione	Titolo nominale (CFU/mL)	Positivi / Replicati
CD1421749	C. difficile A-B+	8,0x10 ⁴	2/2
CD1421759	C. difficile A-B+	8,0x10 ⁵	2/2
CD1421769	C. difficile A-B+	8,0x10 ⁶	2/2
CD142CS53	C. sordellii A-B-	2,1x10 ⁵	0/2

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati

Un ulteriore test è stato effettuato utilizzando il materiale di riferimento calibrato «Clostridium difficile 027 Evaluation Panel» (Qnostics, Ltd, UK). Ogni campione del pannello è stato testato in 2 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rilevamento e interpretazione dei risultati con i prodotti ELiTechGroup S.p.A. in associazione con lo strumento ELiTe InGenius.

I risultati sono riportati nella tabella seguente

Tabella 17 Test con «Clostridium difficile 027 Evaluation Panel»

Campioni	Contenuto del campione	Titolo nominale (CFU/mL)	Positivi / Replicati
CD1422737	C. difficile A+B+	5,0x10 ³	2/2
CD1422747	C. difficile A+B+	5,0x10 ⁴	2/2
CD1422757	C. difficile A+B+	5,0x10 ⁵	2/2
CD1422767	C. difficile A+B+	5,0x10 ⁶	2/2

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati

Le prestazioni del prodotto sono state inoltre valutate utilizzando il materiale di riferimento calibrato «QCMD 2013 Clostridium difficile EQA Panel» (Qnostics Ltd, UK), un pannello di diluizioni di *C. difficile* entro la concentrazione limite. Ogni campione del pannello è stato testato in 2 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rilevamento e interpretazione dei risultati con i prodotti ELITechGroup S.p.A. in associazione con lo strumento ELITE InGenius

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 18 Test con «QCMD 2013 Clostridium difficile EQA Panel»

Campioni	Contenuto del campione	Titolo nominale (CFU/mL)	Sample Status	Positivi / Replicati
CD13-01	C. difficile 027	4,6x10 ⁵	Frequently detected	2/2
CD13-02	C. difficile 017	8,0x10 ⁶	Frequently detected	2/2
CD13-03	Cd Negative	-	Negative	0/2
CD13-04	C. difficile 027	4,6x10 ⁶	Detected	2/2
CD13-05	C. difficile 027	4,6x10 ⁶	Frequently detected	2/2
CD13-06	C. difficile 017	8,0x10 ⁵	Frequently detected	2/2
CD13-07	C. difficile 027	4,6x10 ³	Detected	2/2
CD13-08	C. sordellii	2,1x10 ⁵	Negative	0/2
CD13-09	C. difficile 027	4,6x10 ⁵	Frequently detected	2/2
CD13-10	C. difficile 017	8,0x10 ⁴	Detected	2/2

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati

12.4 Riproducibilità con materiale di riferimento

La riproducibilità dei valori di Ct ottenuti con *C. difficile* ELITE MGB Kit in associazione con ELITE InGenius è stata valutata analizzando il materiale di riferimento «NATtrol™ C. difficile Verification Panel» (ZeptoMetrix, US) contenente i ribotipi 002, 017, 078 e 027. La Riproducibilità è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni di panel in duplicato, in due corse giornaliere. Tre diversi lotti di prodotto sono stati testati in tre giorni diversi, su tre diversi strumenti da tre diversi operatori.

I valori Ct dei geni della tossina A e della tossina B sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente di variabilità percentuale (%CV) al fine di valutare la riproducibilità come imprecisione

Un riassunto dei risultati è mostrato nella tabella seguente

Tabella 19

Campioni	gene tossina A				gene tossina B			
	Pos. / rep.	Ct medio	SD	%CV	Pos. / rep.	Ct medio	SD	%CV
<i>C. difficile</i> 002	12/12	20,70	0,31	1,50	12/12	21,78	0,23	1,05
<i>C. difficile</i> 017	12/12	24,39	0,20	0,84	12/12	25,48	0,11	0,43
<i>C. difficile</i> 078	12/12	24,32	0,24	0,98	12/12	25,30	0,09	0,34
<i>C. difficile</i> 027-1	12/12	22,42	0,25	1,12	12/12	23,13	0,16	0,71
<i>C. difficile</i> 027-2	12/12	24,10	0,32	1,32	12/12	24,82	0,25	1,01
<i>C. sordelli</i>	0/12	-	-	-	0/12	-	-	-

La riproducibilità dei valori di Ct per i due target ha mostrato un basso CV% che non supera il 2%.

La Riproducibilità è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni di panel in duplicato, in due corse giornaliere. Tre diversi lotti di prodotto sono stati testati in tre giorni diversi, su tre diversi strumenti da tre diversi operatori.

Tabella 20

gene tossina B valori di Tm				
Altri <i>C. difficile</i>		cut-off Tm	<i>C. difficile</i> 027 ipervirulento presuntivo	
Tm media	Tm media + 4DS		Tm media - 4 DS	Tm media
60,63	61,71	62,00	62,12	63,05

12.5 Organismi Potenzialmente interferenti: Interferenza

L'inibizione da parte di marcatori potenzialmente interferenti è stata valutata attraverso l'analisi di un pannello di acidi nucleici purificati ad alta concentrazione (almeno 10^5 copie/reazione) comprendente i seguenti organismi: *Aeromonas hydrophilia* (AH), *Bacteroides fragilis* (BF), *Vibrio cholera* (VC), *Helicobacter pylori* (HP), *Saccharomyces cerevisiae* (SC), *Plesiomonas shigelloides* (PS), *Klebsiella pneumoniae* (KC), *Escherichia coli* (Ecoli), *Serratia marcescens* (SM), *Acinetobacter baumannii* (AB), *Bifidobacterium spp* (Bifido), *Candida albicans* (CA), *Citrobacter freundii* (CF), *Clostridium nexile* (Cnex), *Proteus mirabilis* (PM), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Enterobacter cloacae* (EC), *Giardia lamblia* (GL), *Cryptosporidium spp* (CP), *Entamoeba histolytica* (EH), Enterovirus, Adenovirus, Astrovirus, Norovirus, Rotavirus, Sapovirus.

I DNA genomici di ciascun organismo ad alta concentrazione (almeno 10^5 copie / reazione) sono stati aggiunti assieme al DNA genomico di *Clostridioides difficile* (Vircell Microbiologists, Spagna, codice MBC043), come materiale di riferimento a una concentrazione di circa 3x LoD (1500 CFU / mL) e aggiunti con 20.000 copie / reazione di template di controllo interno (CPE - Internal Control) per simulare i campioni clinici estratti.

Sono stati analizzati anche campioni di riferimento con i target di interesse ma senza i potenziali organismi interferenti.

Ogni organismo è stato analizzato in 6 replicati in posizioni randomizzate su ELITE InGenius in modalità "Solo PCR".

Un riepilogo dei risultati è riportato nelle tabelle seguenti.

Tabella 21

Campione	N		Ct medio			% Concordanza Positiva	Esito
	Tossina B	Tossina A	Tossina B	Tossina A	IC		
Reference (Cdif)	6/6	6/6	37,29	37,08	24,41	100%	No inibizione
Cdif + AH-BF-VC	6/6	6/6	36,97	36,57	24,27	100%	No inibizione
Cdif + HP-SC-PS	6/6	6/6	37,33	37,42	23,92	100%	No inibizione
Cdif + KP-Ecoli-SM	6/6	6/6	37,56	37,64	23,67	100%	No inibizione
Cdif + AB-Bifido-CA	6/6	6/6	37,93	38,37	24,26	100%	No inibizione
Cdif + CF-Cnex-PM	6/6	6/6	38,55	38,00	24,26	100%	No inibizione
Cdif + PA-EC-GL	6/6	6/6	38,66	38,11	24,16	100%	No inibizione
Cdiff+ EH	6/6	6/6	38,26	37,90	23,94	100%	No inibizione
Cdiff+ CP	6/6	6/6	38,03	38,29	23,97	100%	No inibizione
Cdiff-Adeno	6/6	6/6	37,81	37,49	23,64	100%	No inibizione
Cdiff-Entero	6/6	6/6	37,62	37,86	23,03	100%	No inibizione
Cdiff-Astro	6/6	6/6	37,58	37,34	24,11	100%	No inibizione
Cdiff-Noro	6/6	6/6	37,75	37,90	24,22	100%	No inibizione
Cdiff-Sapo	6/6	6/6	37,21	36,92	23,92	100%	No inibizione
Cdiff-Rota	6/6	6/6	37,74	37,45	22,90	100%	No inibizione
Cdiff Virulent-Cnex*	6/6	6/6	37.38	38.10	24.36	100%	No inibizione
Cdiff Hypervirulent-Cnex*	6/6	6/6	37.58	39.21	24.90	100%	No inibizione

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti testati non hanno mostrato alcuna inibizione dell'amplificazione del target *C. difficile* utilizzando il *C. difficile* ELiTe MGB Kit

* In base all'analisi della sequenza, il ceppo di *Clostridium Nexile* VPI C48-37 è stato amplificato dai primer e dalla sonda per il target della tossina B. *C. nexile* non esprime la tossina B, ma presenta una omologia di sequenza sufficiente a produrre un segnale nel test. Tuttavia, a causa della diversa temperatura di fusione (Tm) tra *C. difficile virulento* (ribotipo 027), *C. difficile ipervirulento* (ribotipo 027) e *C. nexile*, il test consente di discriminare una possibile coinfezione.

12.6 Organismi potenzialmente interferenti: Cross-Reattività

L'assenza di cross reattività con potenziali organismi interferenti è stata verificata anche attraverso l'analisi di un pannello di acidi nucleici purificati certificati di DNA genomico di diversi organismi forniti da ATCC, ZeptoMetrix e DSMZ, come riportato nella sezione Marcatori potenzialmente interferenti: Test di interferenza.

I DNA genomici di ciascun organismo ad alta concentrazione (almeno 10⁵ copie/reazione) sono stati aggiunti a 20.000 copie/reazione di template di controllo interno (CPE - Internal Control) per simulare i campioni clinici estratti.

Sono stati analizzati anche campioni di riferimento con i target di interesse ma senza i potenziali organismi interferenti.

Ogni organismo è stato analizzato in 6 replicati in posizioni randomizzate su ELiTe InGenius in modalità "Solo PCR".

Un riepilogo dei risultati è riportato nelle tabelle seguenti.

Tabella 22

Campione	Positivi / Replicati		Media IC Ct	% Concordanza Negativa	Esito
	Tossina A	Tossina B			
Reference	0 / 6	0 / 6	24.55	100%	No cross-reattività
AH-BF-VC	0 / 6	0 / 6	23.77	100%	No cross-reattività
HP-SC-PS	0 / 6	0 / 6	23.72	100%	No cross-reattività
KP-Ecoli-SM	0 / 6	0 / 6	23.85	100%	No cross-reattività
AB-Bifido-CA	0 / 6	0 / 6	25.58	100%	No cross-reattività
CF-Cnex-PM	0 / 6	0 / 6	25.50	100%	No cross-reattività
PA-EC-GL	0 / 6	0 / 6	23.90	100%	No cross-reattività
CP-EH-Entero	0 / 6	0 / 6	23.77	100%	No cross-reattività
Adeno-Astro-Noro	0 / 6	0 / 6	23.87	100%	No cross-reattività
Rota-Sapo	0 / 6	0 / 6	23.84	100%	No cross-reattività
C. nexile*	0/6	6/6	23,74	100%	No cross-reattività

Tutti i marcatori potenzialmente interferenti testati non hanno mostrato alcuna cross-reattività con il target *C. difficile* utilizzando il *C. difficile* ELITE MGB Kit, ad eccezione del ceppo *Clostridium Nexile* VPI C48-37, che ha cross-reagito con il gene della tossina B.

* In base all'analisi della sequenza, il ceppo di *Clostridium Nexile* VPI C48-37 è stato amplificato dai primer e dalla sonda per il target della tossina B. *C. nexile* non esprime la tossina B, ma presenta una omologia di sequenza sufficiente a produrre un segnale nel test. Tuttavia, a causa della diversa temperatura di fusione (Tm) tra *C. difficile* e *C. Nexile*, il test fornisce correttamente come risultato "DNA rilevato specie non determinata".

12.7 Sostanze potenzialmente interferenti: inibizione

L'effetto delle sostanze potenzialmente interferenti è stato valutato analizzando le sostanze endogene o esogene che possono essere presenti nei campioni di feci native (matrice più difficile), entro limiti clinicamente rilevanti. In particolare, nella tabella seguente sono state analizzate le seguenti sostanze esogene ed endogene, come indicato nel CLSI EP37 Ed1E:

Tabella 23

Sostanza interferente	Principio attivo / Prodotto	ID	Concentrazione
Clisteri	Olio di vaselina	VAS	20 mg/mL
Lubrificante spermicida	Nonoxynol-9	NON	1.2% v/v
Anti-diarroici	Bismuto subsalicilato	BISM	0,87 mg/mL
	Loperamide cloridrato	LOP	0,005 mg/mL
Lassativi	Bisacodile	BISA	0,25 mg /mL

Tabella 23 (segue)

Sostanza interferente	Principio attivo / Prodotto	ID	Concentrazione
Antibiotici	Azitromicina	AZI	10 µg /mL
	Vancomicina	VAN	0,12 mg/mL
	Metronidazolo	MET	0,12 mg/mL
	Ampicillina	AMP	0,08 mg/mL
	Cefpodoxima	CEF	4,5 µg/mL
	Ciprofloxacina	CIP	5 µg/mL
Anti-infiammatori	Idrocortisone	HYD	3 mg/mL
Antiacidi	Carbonato di calcio	CAL	0,5 mg/mL
	Acido alginico	ALG	0,01 mg/mL
	Idrossido di alluminio	ALU	0,03 mg/mL
	Magnesio trisilicato	MAG	0,01 mg/mL
Sangue Intero	Emoglobina, immunoglobuline, acidi nucleici, ecc.	WB	5% v/v
Componenti Fecali	Mucina	MUC	3 mg/mL
	Acido palmitico	PAL	0,85 mg/mL
	Acido stearico	STE	0,85 mg/mL

Le sostanze potenzialmente interferenti sono state testate in campione di feci native, diviso in 6 gruppi di 3 sostanze. Mucina, Cefpodoxima, Ciprofloxacina, Idrocortisone e Sangue intero sono stati testati da soli.

Il materiale di riferimento *Clostridioides difficile* NAP1 (ZeptoMetrix) è stato aggiunto ai campioni di feci a una concentrazione di circa 3xLoD.

A ciascun campione sono state aggiunte 20.000 copie/reazione del modello di controllo interno (CPE - Controllo interno).

Sono stati analizzati anche campioni di riferimento con i target di interesse ma senza le sostanze potenzialmente interferenti.

Ogni sostanza è stata analizzata in 6 replicati in posizioni randomizzate su ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

Un riepilogo dei risultati è riportato nella tabella seguente.

Tabella 24

Campione	Positivi / Replicati		Media Ct			% Concordanza Positivi		Esito
	Tossina B	Tossina A	Tossina B	Tossina A	IC	Tossina B	Tossina A	
Reference (C.diff)	6/6	6/6	34,68	34,53	25,35	100%	100%	No inibizione
C.diff+ VAN+MET+AMP	6/6	6/6	36,43	36,53	25,54	100%	100%	No inibizione
C.diff+ LOP+BISA+AZI	6/6	6/6	36,31	36,27	25,46	100%	100%	No inibizione
C.diff+ ALG+ALU+MAG	6/6	6/6	36,41	36,48	25,72	100%	100%	No inibizione

Tabella 24 (segue)

Campione	Positivi / Replicati		Media Ct			% Concordanza Positivi		Esito
	Tossina B	Tossina A	Tossina B	Tossina A	IC	Tossina B	Tossina A	
C.diff+ WB	6/6	6/6	35,64	35,41	25,72	100%	100%	No inibizione
C.diff+VAS+NON+BISM	6/6	6/6	34,75	34,31	25,36	100%	100%	No inibizione
C.diff+CAL+PAL+STE	6/6	6/6	35,95	36,20	25,70	100%	100%	No inibizione
C.diff+MUC	6/6	6/6	36,96	37,24	25,70	100%	100%	No inibizione
C.diff+ CEF	6/6	6/6	35,14	34,93	25,69	100%	100%	No inibizione
C.diff+ CIP	6/6	6/6	34,96	34,54	25,79	100%	100%	No inibizione
C.diff+ HYD	6/6	6/6	34,85	34,26	25,86	100%	100%	No inibizione

Tutte le sostanze potenzialmente interferenti testate non hanno mostrato alcuna inibizione dell'amplificazione del target del *C. difficile* utilizzando il *C. difficile* ELITE MGB Kit.

12.8 Sostanze potenzialmente interferenti: Cross-Reattività

L'assenza di **cross-reattività** con sostanze potenzialmente interferenti è stata verificata anche attraverso l'analisi di sostanze endogene o esogene che possono essere presenti nei campioni di feci native (la matrice più difficile), entro limiti clinicamente rilevanti come riportato nel test delle sostanze potenzialmente interferenti di cui sopra.

Le sostanze potenzialmente interferenti in campione di feci native, diviso sono state testate in 6 gruppi di 3 sostanze. La mucina e il sangue intero sono stati testati da soli.

In ogni campione sono state aggiunte 20.000 copie/reazione del template di controllo interno (CPE - Internal Control).

È stato analizzato anche un campione di riferimento privo di potenziali sostanze interferenti.

Ogni campione è stato estratto e amplificato in 6 repliche in posizioni randomizzate in modalità "Extract + PCR" sul sistema ELITE InGenius.

Ogni sostanza è stata analizzata in 6 repliche in posizioni randomizzate sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

Una sintesi dei risultati è riportata nelle tabelle seguenti..

Tabella 25

Campione	Positivi / Replicati		Media Ct IC	% Concordanza Negativi	Esito
	Tossina B	Tossina A			
Reference	0 / 6	0 / 6	25,91	100%	No cross-reattività
LOB+BISA+AZI	0 / 6	0 / 6	25,69	100%	No cross-reattività
VAN+MET+AMP	0 / 6	0 / 6	25,58	100%	No cross-reattività
ALG+ALU+MAG	0 / 6	0 / 6	25,79	100%	No cross-reattività
CEF+CIP+HYD	0 / 6	0 / 6	25,77	100%	No cross-reattività
WB	0 / 6	0 / 6	25,50	100%	No cross-reattività
VAS+NON+BISM	0 / 6	0 / 6	25,88	100%	No cross-reattività

Tabella 25 (segue)

Campione	Positivi / Replicati		Media Ct IC	% Concordanza Negativi	Esito
	Tossina B	Tossina A			
CAL+PAL+STE	0 / 6	0 / 6	25,64	100%	No cross-reattività
MUC	0 / 6	0 / 6	25,63	100%	No cross-reattività

Tutte le sostanze potenzialmente interferenti testate non hanno mostrato alcuna crossreattività per l'amplificazione del target del *C. difficile* utilizzando il *C. difficile* ELITE MGB Kit.

12.9 Ripetibilità

La ripetibilità del saggio è stata valutata su ELITE InGenius ELITE BeGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di feci native negative o positivizzate con materiale di riferimento di *C. difficile* (Zeptomatrix).

Un esempio di risultati del test di Ripetibilità Intra-Sessione (su un giorno) è mostrato nelle tabelle seguenti.

Tabella 26 ELITE InGenius Ripetibilità Intra-Sessione (giorno 1)

Campione	N	Tossina B			Tossina A			% Concordanza
		Ct medio	SD	%CV	Ct medio	SD	%CV	
Neg	8	-	-	-	-	-	-	100%
3 x LoD	8	36,14	0,35	0,96	35,74	0,57	1,59	100%
10 x LoD	8	33,68	0,33	0,99	33,05	0,39	1,19	100%

Tabella 27 ELITE BeGenius Ripetibilità Intra-Sessione (giorno 1)

Campione	N	Tossina B			Tossina A			% Concordanza
		Ct medio	SD	%CV	Ct medio	SD	%CV	
Neg	8	-	-	-	-	-	-	100%
3 x LoD	8	36,84	0,37	1,01	36,31	0,51	1,41	100%
10 x LoD	8	34,12	0,44	1,29	33,17	0,45	1,35	100%

Un esempio di risultati del test di Ripetibilità Inter-Sessione (su due giorni) è mostrato nelle tabelle seguenti.

Tabella 28 ELITE InGenius Ripetibilità Inter-Sessione

Campione	N	Tossina B			Tossina A			% Concordanza
		Ct medio	SD	%CV	Ct medio	SD	%CV	
Neg	16	-	-	-	-	-	-	100%
3 x LoD	16	36,11	0,35	0,96	35,75	0,44	1,22	100%
10 x LoD	16	33,51	0,31	0,93	32,88	0,41	1,24	100%

Tabella 29 ELITE BeGenius Ripetibilità Inter-Sessione

Campione	N	Tossina B			Tossina A			% Concor- danza
		Ct medio	SD	%CV	Ct medio	SD	%CV	
Neg	16	-	-	-	-	-	-	100%
3 x LoD	16	36,73	0,39	1,06	36,03	0,61	1,70	100%
10 x LoD	16	33,97	0,39	1,16	33,02	0,47	1,44	100%

Nel test di ripetibilità, il C. difficile ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come atteso e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct come CV% inferiore al 5%.

12.10 Riproducibilità

La Riproducibilità del saggio è stata valutata su ELITE InGenius ELITE BeGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di feci native negative o positivizzate con materiale di riferimento di C. difficile (Zeptomatrix).

Un esempio di risultati del test di Riproducibilità Inter-Lotto (su due lotti) è mostrato nelle tabelle seguenti.

Tabella 30 ELITE InGenius Riproducibilità Inter-Lotto

Campione	N	Tossina B			Tossina A			% Concor- danza
		Ct medio	SD	%CV	Ct medio	SD	%CV	
Neg	8	-	-	-	-	-	-	100%
3 x LoD	8	36,22	0,67	1,85	35,24	0,28	0,78	100%
10 x LoD	8	33,86	0,27	0,81	32,72	0,34	1,05	100%

Tabella 31 ELITE BeGenius Riproducibilità Inter-Lotto

Campione	N	Tossina B			Tossina A			% Concor- danza
		Ct medio	SD	%CV	Ct medio	SD	%CV	
Neg	8	-	-	-	-	-	-	100%
3 x LoD	8	36,47	0,61	1,69	34,63	0,44	1,28	100%
10 x LoD	8	33,92	0,24	0,72	32,20	0,23	0,72	100%

Un esempio di risultati del test di Riproducibilità Inter-Strumento (su due strumenti) è mostrato nelle tabelle seguenti.

Tabella 32 ELITE InGenius Riproducibilità Inter-Strumento

Campione	N	Tossina B			Tossina A			% Concor- danza
		Ct medio	SD	%CV	Ct medio	SD	%CV	
Neg	16	-	-	-	-	-	-	100%
3 x LoD	16	35,74	0,27	0,75	34,92	0,34	0,96	100%
10 x LoD	16	33,41	0,69	2,05	32,47	0,59	1,82	100%

Tabella 33 ELITE BeGenius Riproducibilità Inter-Strumento

Campione	N	Tossina B			Tossina A			% Concor- danza
		Ct medio	SD	%CV	Ct medio	SD	%CV	
Neg	16	-	-	-	-	-	-	100%
3 x LoD	16	36.26	0.46	1.27	34.74	0.63	1.81	100%
10 x LoD	16	33,55	0,35	1,03	32,04	0,36	1,13	100%

Nel test di Riproducibilità, il C. difficile ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come atteso e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct come CV% inferiore al 5%.

12.11 Specificità diagnostica: conferma dei campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici negativi, è stata valutata in associazione a ELITE InGenius, analizzando campioni clinici di feci certificate negative per il DNA di C. difficile.

Poiché ELITE BeGenius ha prestazioni analitiche equivalenti a ELITE InGenius, anche le prestazioni diagnostiche del test eseguito sui due strumenti sono considerate equivalenti. Pertanto, la Specificità Diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITE InGenius è applicabile anche a ELITE BeGenius.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 34

Feci Negative	N	Positivi	Negativi	Specificità Diagnostica %
C. difficile	45	1	44	97,8%

Il cut-off del Ct del Controllo Interno è impostato a 32 per ELITE InGenius ed ELITE BeGenius.

12.12 Sensibilità diagnostica: conferma dei campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici positivi, è stata valutata in associazione a ELITE InGenius analizzando campioni clinici di feci certificate positive per il DNA di C. difficile.

Poiché ELITE BeGenius ha prestazioni analitiche equivalenti a ELITE InGenius, anche le prestazioni diagnostiche del test eseguito sui due strumenti sono considerate equivalenti. Pertanto, la Sensibilità Diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITE InGenius è applicabile anche a ELITE BeGenius.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 35

feci positive	N	Positivi	Negativi	Sensibilità Diagnostica %
C. difficile	30	30	0	100%

NOTA

I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto di C. difficile ELITE MGB Kit, FTP M800358

13 CAMPIONI E CONTROLLI PER ALTRI STRUMENTI

13.1 Campioni

Il prodotto deve essere usato con DNA estratto da campioni clinici di feci o feci liquide.

I campioni fecali destinati all'estrazione del DNA devono essere raccolti secondo quanto prescritto dalle procedure standard per la raccolta e manipolazione delle feci e devono essere poi identificati attenendosi alle linee guida del laboratorio. Conservare le feci non trattate in un contenitore sterile con tappo a vite per prevenirne la fuoriuscita accidentale e trasportarle nel rispetto di tutti i regolamenti applicabili al trasporto di agenti eziologici. Conservare i campioni refrigerati (+2/+8° C) per un massimo di 48 ore prima di prepararli. Se le feci non possono essere chiarificate entro 48 ore dalla raccolta, conservare i campioni a ≤ -70° C.

Per ogni campione fecale da trattare preparare una provetta etichettata da 1,5 ml e distribuirvi 0,8 ml di S.T.A.R. buffer. Miscelare il campione fecale in un agitatore e quindi, con l'ausilio di un pipettatore con puntale resistente all'aerosol, trasferirne circa 200 µl (in caso di feci dense, utilizzare un puntale a punta larga o una spatola di plastica a seconda del caso) nella provetta da 1,5 ml contenente lo S.T.A.R. buffer. Chiudere bene la provetta e introdurla in un agitatore per omogeneizzare il contenuto (20-30 sec). Centrifugare la soluzione omogeneizzata a 13.000×g (RCF) per 1 minuto per chiarificare il campione. Aggiungere con cautela 400-650 µl di surnatante fecale chiarificato in una provetta secondaria etichettata, facendo attenzione a non compromettere il sedimento. Consultare il manuale d'istruzioni per l'uso del kit per l'estrazione per poter identificare i volumi e le provette secondarie compatibili con i sistemi di estrazione. Conservare le feci chiarificate a +2/+8° C per un massimo di 7 giorni prima di procedere all'estrazione.

NOTA

Conservare lo S.T.A.R. buffer a temperatura ambiente, perché una temperatura più bassa può favorire la formazione di precipitati bianchi. Prima di cominciare la procedura di estrazione, verificare se sono presenti precipitati; in tal caso riscaldare la soluzione a 30-40° C in un bagno d'acqua o in un'incubatrice fino alla loro dissoluzione.

NOTA

Per trattare i campioni fecali chiarificati con il sistema ELiTe STAR e con il software **versione 3.4.13** (o successive), utilizzare il protocollo di estrazione **UUNI_E100_S200_ELI**, che fa uso di 200 µl di campione ed eluisce l'estratto in 100 µl (l'eluizione ha luogo in 115 µl di cui 100 µl sono recuperati). Dopo averli trasferiti nelle provette secondarie, caricare i campioni chiarificati su **ELiTe STAR**. Si richiede sempre un volume minimo di 400-600 µl per ogni campione. Aggiungere **50 µl di CPE - Internal Control** e **750 µl di acqua per biologia molecolare** in una provetta contenente una **soluzione di proteinasi-vettore** come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per la procedura di estrazione si rimanda al manuale d'istruzioni per l'uso del kit di estrazione.

Conservare gli acidi nucleici purificati a +2/+8° C se saranno utilizzati lo stesso giorno dell'estrazione oppure a temperatura inferiore a -20° C se il periodo di conservazione è più lungo.

NOTA

Per trattare i campioni fecali chiarificati con il sistema **ELiTe GALAXY** e con il software **versione 1.3.1** (p successive), utilizzare il protocollo di estrazione **xNA Extraction (Universal)**, che fa uso di 300 µl di campione ed eluisce l'estratto in 100 µl (l'eluizione ha luogo in 110 µl di cui 100 µl sono recuperati). Dopo averli trasferiti nelle provette secondarie, caricare i campioni chiarificati su **ELiTe GALAXY**. Si richiede sempre un volume minimo di 400-650 µl, in funzione della classe di provetta utilizzata. Aggiungere **2,5 µl/campione di CPE - Internal Control** e **7,5 µl/campione di acqua per biologia molecolare** in una soluzione contenente **IC + vettore** come indicato nel manuale d'istruzioni del kit di estrazione. Per la procedura di estrazione si rimanda al manuale d'istruzioni per l'uso del kit di estrazione.

Conservare gli acidi nucleici purificati a +2/+8° C se saranno utilizzati lo stesso giorno dell'estrazione oppure a temperatura inferiore a -20° C se il periodo di conservazione è più lungo.

NOTA

Per trattare i campioni fecali chiarificati con **NucliSENS® easyMAG®**, versare 20 µl di ciascun campione campione fecale chiarificato nell'apposito recipiente monouso **NucliSENS easyMAG** (8 campioni per recipiente e fino a un massimo di tre recipienti per sessione) come prescritto nella lista di lavoro dello strumento.

Preparare una richiesta di estrazione sul sistema «**NucliSENS easyMAG**» come segue:

- Matrice = Feci;
- Protocollo = Generico 2.0.1;
- Volume (ml) = 0,02 ml;
- Eluato (µl) = 110 µl;
- Tipo = Primario.

Creare una nuova sessione di estrazione salvando il file con un nome univoco e riconoscibile (es. "year-month-day-Extract01") e quindi aggiungere cautamente le richieste di estrazione alla sessione nell'ordine in cui erano state collocate nel materiale da scartare, quindi iniziare il processo di lisi della durata di 10 minuti.

Nel corso di questo processo di lisi di 10 minuti, preparare la sospensione di silice magnetica per 8 campioni mescolando **550 µl di NucliSENS easyMAG Magnetic Silica**, **545 µl di acqua per biologia molecolare** e **5 µl di C. difficile Internal Control**. Per ogni campione, servirsi di un pipettatore BioHit o manuale per distribuire 125 µl di sospensione di silice magnetica nel prodotto NucliSENS easyMAG Strip for Premix. Con l'ausilio del pipettatore BioHit, versare 100 µl di sospensione di silice magnetica così ottenuta da ciascun campione nel contenitore monouso da 8 pozzetti, mescolare bene pipettando su e giù per tre volte e quindi avviare la procedura automatica di estrazione. Alla conclusione dell'estrazione, entro 30 minuti rimuovere dal materiale da scartare gli acidi nucleici isolati per evitare che i campioni vengano contaminati dalla silice magnetica.

13.2 Sostanze interferenti

È stato dimostrato che la presenza di sangue umano, mucina, grassi fecali, farmaci non interferisce con la rilevazione di *C. difficile* tossigeno se si usa il prodotto **C. difficile ELiTe MGB Kit** in associazione con **NucliSENS easyMAG**.

Tabella 36

Sostanza potenzialmente interferente	Principio attivo	Interferisce?
Anti-fungina / Anti-Itch Vaginale	Nystatin	No
Crema/pomate/supposte	Idrocortisone, 1%	No
Crema/pomate anti-emorroidi	Fenilnefrina, 0,25%	No
Antiacidi	Carbonato di calcio	No
Clisteri	Olio minerale	No
Lubrificante spermicida	Nonoxynol 9	No
Medicinali Anti-diarrea	loperamide cloridrato	No
Medicinali Anti-diarrea	Bismuth Subsalicitato	No
Lassativi	Sennosidi	No

Tabella 36 (segue)

Sostanza potenzialmente interferente	Principio attivo	Interferisce?
Antibiotici (orali o iniettabili)	Metronidazolo (orale)	No
	Ciprofloxacina (orale)	No
	Azitromicina (orale)	No
	Vancomicina (orale)	No
	Zosyn (iniettabile)	No
Antinfiammatorio non steroideo	Naproxene sodico	No
Antinfiammatorio steroideo	Prednisone	No
Salvietta umidificata	Cloruro di benzalconio 0,40%	No
Salvietta umidificata	Alcool isopropilico, 70%	No
Grasso fecale (acido palmitico)	Acido palmitico	No
Grasso fecale (acido stearico)	Acido stearico	No
Sangue	Glucosio, ormoni, enzimi, ioni, ferro, ecc.	No
Muco	Immunoglobuline, lisozima, polimeri, ecc.	No

Non sono disponibili dati riguardanti l'inibizione conseguente alla somministrazione di altri antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

Un'elevata quantità di DNA genomico umano nel DNA estratto dal campione potrebbe inibire la reazione di amplificazione.

13.3 Controlli di amplificazione

È necessario convalidare ciascuna sessione di amplificazione allestendo una reazione di controllo negativo e una reazione di controllo positivo.

Per il controllo negativo usare acqua per uso in biologia molecolare (non fornita).

Per il controllo positivo usare il «**C. difficile - ELITE Positive Control**» cod. M800373 (non fornito).

13.4 Controlli di Qualità

Si consiglia di convalidare l'intera procedura di analisi di ciascuna sessione di estrazione ed amplificazione utilizzando un campione negativo e un campione positivo già testati o del materiale di riferimento calibrato.

14 PROCEDURA ALTRI STRUMENTI

Impostazione della sessione di amplificazione Real-Time

(Da eseguire nell'area di amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione)

Prima di iniziare la sessione, seguire le raccomandazioni del produttore fornite nella documentazione dello strumento e:

- accendere il computer, accendere il thermal cycler per real time, avviare il software dedicato e aprire una sessione "absolute quantification";
- quando si utilizza uno strumento Applied Biosystem® **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** o Applied Biosystem® **7500 Fast Real-Time PCR System**, impostare "Run mode: Fast 7500";

- quando si utilizza uno strumento Applied Biosystem® **7500 Real-Time PCR System** "Run mode: Standard 7500" è impostato automaticamente;
- impostare il rivelatore appropriato nel menu strumenti selezionando il Detector Manager;
- impostare il "detector" per la sonda del gene specifico per la tossina A con il "reporter" = "VIC" (AP525 è simile a VIC), il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "Tossina A";
- impostare il "detector" per la sonda del gene specifico per la tossina B con il "reporter" = "FAM", il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "Tossina B";
- impostare il "detector" per la sonda del controllo interno con il "reporter" = "Cy5" (AP642 è simile a Cy5), il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "IC";
- andare al menu "View", selezionare il "Well Inspector" e, per ciascun pozzetto in uso nella micropiastre, impostare il "detector" (tipo di fluorescenza da misurare), il "passive reference" = "ROX" (AP593 è simile a ROX, normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campione, controllo negativo di amplificazione, controllo positivo di amplificazione). Aggiungere queste informazioni al **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale oppure stampare l'organizzazione della micropiastre. Il **Piano di lavoro** dovrà essere seguito con attenzione durante il trasferimento nei pozzetti della miscela di reazione e dei campioni.

Vedere sotto un esempio di come si può organizzare un'analisi qualitativa di 12 campioni.

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
NC	PC										

Legenda: S1 - S12: campioni da analizzare; NC: controllo negativo di amplificazione; PC: controllo positivo di amplificazione

Facendo riferimento alla documentazione dello strumento, impostare sul software dedicato (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:

- aggiungere alla fase di amplificazione (Add step) il passaggio **di estensione a 72 °C**;

NOTA

l'acquisizione della fluorescenza (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve essere impostata durante la fase di ibridazione a 56 °C.

- modificare il tempo come indicato nella tabella seguente "**Ciclo termico**";
- impostare il numero di cicli su **45**;
- impostare il volume di reazione su **30 µL**.
- opzionale: aggiungere la fase di dissociazione (Add Dissociation Stage) e impostare le temperature da **40°C** a **80°C**.

Tabella 37 Parametri del ciclo termico

Fase	Temperature	Durata
Decontaminazione	50° C	2 min.
Denaturazione iniziale	93° C	2 min.
Amplificazione e rilevazione (45 cicli)	93° C	10 sec.
	56° C (raccolta dei dati)	30 sec.
	72° C	15 sec.
Dissociazione (facoltativa)	95° C	15 sec.
	40° C	1 min.
	80° C	15 sec.
	60° C	15 sec.

Allestimento dell'amplificazione

(Da eseguire nell'area di estrazione / allestimento della reazione di amplificazione).

Prima di iniziare la sessione è necessario:

- prelevare e scongelare le provette contenenti i campioni da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
 - prelevare e scongelare le provette **C. difficile PCR Mix** necessarie per la sessione, ricordandosi che ciascuna provetta è sufficiente per preparare **25 reazioni**. Mescolare delicatamente, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio per un massimo di quattro ore;
 - prelevare e scongelare una provetta di **C. difficile Positive Control** (non fornito, ref. M800373, controllo positivo per le reazioni di amplificazione real time per il gene specifico per la tossina A e per la tossina B). Mescolare delicatamente, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio per un massimo di quattro ore;
 - prelevare l'**Amplification microplate** che verrà usata durante la sessione, prestando attenzione a manipolarla con guanti privi di polvere e a non danneggiare i pozzetti.
1. Trasferire, depositandoli accuratamente sul fondo dei pozzetti senza creare bolle **20 µL** di **C. difficile PCR Mix** della **Amplification microplate**, come stabilito in precedenza nel **Piano di lavoro**. Evitare la creazione di bolle d'aria.

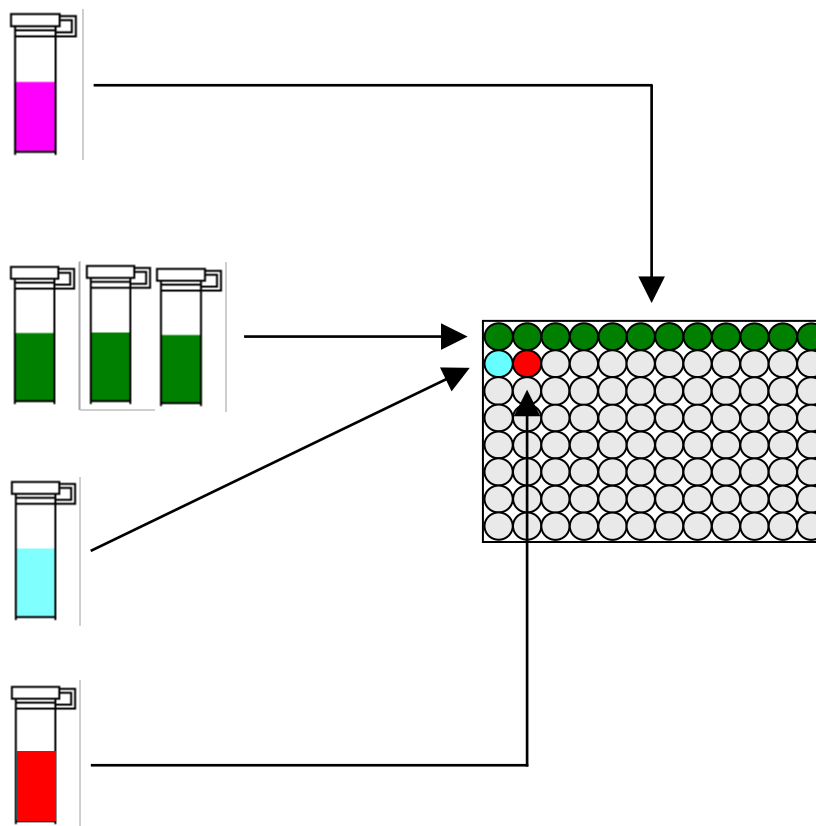
NOTA

Trasferire, depositandoli accuratamente sul fondo dei pozzetti senza creare bolle **20 µL** di **C. difficile PCR Mix** della **Amplification microplate**, come stabilito in precedenza nel **Piano di lavoro**. Evitare la creazione di bolle d'aria.

2. Aggiungere alla miscela di reazione **10 µL** del primo campione trattato nel pozzetto designato, come precedentemente stabilito nel **Piano di lavoro**. Procedere allo stesso modo con gli altri campioni estratti.
3. Aggiungere alla miscela di reazione **10 µL** di **acqua per uso in biologia molecolare** (non fornita) nel pozzetto del controllo negativo, come precedentemente stabilito nel **Piano di lavoro**.
4. Aggiungere alla miscela di reazione **10 µL** di **C. difficile Positive Control** nel pozzetto designato, come precedentemente stabilito nel **Piano di lavoro**.
5. Sigillare accuratamente l'**Amplification microplate** con l'**Amplification Sealing Sheet** (foglio adesivo di amplificazione).
6. Se è disponibile una centrifuga per piastre, eseguire una breve centrifugazione dell'**Amplification microplate** per raccogliere tutto il materiale di reazione sul fondo del pozzetto.

7. Trasferire l'**Amplification microplate** nel thermal cycler per real time posto nell'area di amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione e avviare il ciclo termico di amplificazione. Salvare le impostazioni della sessione con un nome del file univoco e riconoscibile (ad es. "anno-mese-giorno- C.difficile-EGSpA").

La figura sottostante illustra l'allestimento della reazione di amplificazione.



1. Versare 20 μ L di PCR Mix
2. Versare 10 μ L di DNA estratto
3. Versare 10 μ L Controllo Negativo
4. Versare 10 μ L di Controllo Positivo

NOTA

se l'allestimento dell'amplificazione è eseguito tramite lo strumento «**ELiTe GALAXY**», caricare la micropietra di eluizione, la miscela completa di reazione e la micropietra di amplificazione come previsto dal manuale di istruzioni d'uso dello strumento e seguendo quanto richiesto dalla GUI.

NOTA

Alla fine del ciclo termico l'**Amplification microplate** con i prodotti della reazione deve essere rimossa dallo strumento e smaltita senza produrre inquinamento ambientale. Per evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione, il **Sealing Optical Adhesive Sheet** non deve essere rimosso dalla **Amplification microplate**.

Analisi Qualitativa dei risultati

I valori registrati di fluorescenza emessa dalla sonda del gene specifico per la tossina A (detector VIC "toxin A"), per la tossina B (detector FAM "toxin B") e dalla sonda del controllo interno (detector Cy5 "IC") durante le reazioni di amplificazione devono essere analizzati con il software dello strumento.

Prima di iniziare l'analisi, seguire le raccomandazioni del produttore fornite nella documentazione dello strumento e:

- - impostare (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) le **Impostazioni di analisi** per tutti i rivelatori su **Auto Baseline** e **Manual Ct**, con la **soglia (Threshold)** a **0,05**. Premere il pulsante **Analyze** e **salvare** i risultati.

I valori di fluorescenza emessi dalle sonde specifiche durante la reazione di amplificazione e il valore **soglia** della fluorescenza permettono di determinare il **Ciclo soglia (Ct, Threshold cycle)**. Il Ct è il ciclo in cui la fluorescenza ha raggiunto il valore di **soglia** ed è proporzionale alla quantità iniziale target.

Nella reazione di amplificazione del **Positive Control**, i valori di **Ct** dei detector della tossina A e della tossina B (Results > Report) vengono usati per convalidare l'amplificazione e la rivelazione, come descritto nella tabella seguente:

Tabella 38

Reazione controllo positivo Detector VIC "Toxin A"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct < 35	POSITIVO	CORRETTO

Tabella 39

Reazione controllo positivo Detector FAM "Toxin B"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct < 35	POSITIVO	CORRETTO

Se il risultato dell'amplificazione con il **Positive Control** è **Ct ≥ 35** o **Ct indeterminato** per i detector della tossina A o della tossina B, il DNA target non è stato rivelato correttamente. Ciò significa che si sono verificati problemi durante la fase di amplificazione o di rivelazione (erogazione scorretta della miscela di reazione o dei controlli positivi, degradazione della miscela di reazione o dei controlli positivi, impostazione scorretta della posizione del controllo positivo, impostazione scorretta del ciclo termico), che possono determinare risultati non corretti. La sessione non è valida e deve essere ripetuta a partire dalla fase di amplificazione.

Nella reazione di amplificazione sul **controllo negativo**, i valori di **Ct** dei detector per le tossine A e B, come anche per IC (Results à Report) servono per validare l'amplificazione e la rivelazione, come descritto nella tabella sottostante:

Tabella 40

Reazione controllo negativo Detector VIC "Toxin A"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct indeterminato o Ct ≥ 40	NEGATIVO	CORRETTO

Tabella 41

Reazione controllo negativo Detector FAM "Toxin B"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct indeterminato o Ct ≥ 40	NEGATIVO	CORRETTO

Tabella 42

Reazione controllo negativo Detector Cy5 "IC"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct indeterminato o Ct ≥ 34	NEGATIVO	CORRETTO

Se il risultato dell'amplificazione del **controllo negativo** è **Ct < 40** per i detector della tossina A o della tossina B o **Ct < 34.0** per il detector IC, il DNA target non è stato rivelato correttamente. Ciò significa che si sono verificati problemi durante la fase di amplificazione (contaminazione) che possono determinare risultati non corretti e falsi positivi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta a partire dalla fase di amplificazione.

In ogni reazione di amplificazione del **campione**, i valori di **Ct** dei detector della tossina A o della tossina B vengono usati per rivelare il DNA target mentre il valore di **Ct** del controllo interno viene usato per convalidare l'estrazione, l'amplificazione e la rivelazione.

NOTA

Verificare sul software dello strumento (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) che il valore di **Ct** sia stato determinato mediante un aumento immediato e regolare della fluorescenza e non da fenomeni di picco o incremento del segnale di fondo (irregolare o elevato).

I valori di **Ct** delle reazioni di amplificazione di ciascun **campione** (Results > Report) vengono usati come descritto nella tabella seguente:

Tabella 43

Reazione con il campione			Risultato del saggio
Detector VIC"Toxin A"	Detector FAM"Toxin B"	Detector Cy5"IC"	
Indeterminato o Ct ≥ 40	Indeterminato o Ct ≥ 40	Ct < 34	Negativo
		Indeterminato o Ct ≥ 34	Non valido
Determinato, Ct < 40	Indeterminato o Ct ≥ 40	Non applicabile	Positivo
Indeterminato o Ct ≥ 40	Determinato, Ct < 40	Non applicabile	Positivo
Determinato, Ct < 40	Determinato, Ct < 40	Non applicabile	Positivo

Tabella 44

Risultato del saggio	Interpretazione dei risultati
Negativo	Il DNA del gene codificante la tossina A o B di C. difficile non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per C. difficile variante tossinogenica o la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevabilità del saggio.
Non valido	Risultato del saggio non valido. Ripetere la sessione a partire dall'estrazione dello stesso campione o procedere a una nuova estrazione da un altro campione.
Positivo	Il DNA del gene codificante la tossina A o B di C. difficile è stato rilevato nel campione. Il campione è positivo per C. difficile e potrebbe essere della variante tossinogenica.

La presenza di uno (gene codificante la tossina A o B) o di entrambi i marcatori è indicativa di C. difficile tossigeno.

Se il risultato della reazione di amplificazione sul campione è **Ct Undetermined** (Ct indeterminato) o **Ct ≥ 40** per i detector per la tossina A e B e **Ct Undetermined** o **Ct ≥ 34** per il detector per IC, ciò significa che è stato impossibile rilevare efficacemente i target e il DNA del controllo interno. In tal caso, vi sono stati dei problemi durante la fase di amplificazione (amplificazione inefficace o nulla) o di estrazione (degradazione del DNA, perdita di DNA durante l'estrazione o carryover sugli inibitori nel DNA estratto), che possono determinare risultati sbagliati o falsi negativi. In tal caso, il campione non è adatto, la sessione non è valida e deve essere ripetuta a partire dall'estrazione del campione o di un nuovo campione appartenente allo stesso paziente.

Se il risultato della reazione di amplificazione è **Ct Undetermined** o **Ct ≥ 40** per i detector per la tossina A o B e **Ct < 34** per il detector per IC, ciò significa che non è stata rilevata la presenza di DNA di C. difficile tossigeno nel campione trattato. Il campione viene considerato negativo. Tuttavia, il numero di organismi che contiene può essere inferiore al limite di rilevabilità del prodotto (v. Caratteristiche prestazionali). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

NOTA

Quando il DNA della tossina A e/o B viene rilevato in un campione, il detector per IC può essere **Ct Undetermined** o **Ct ≥ 34**. Anzi, l'elevata efficienza dell'amplificazione del DNA del gene codificante la tossina A e B può essere in competizione con la modesta efficienza dell'amplificazione del controllo interno. In tal caso, il campione è idoneo e il risultato positivo del saggio è valido.

15 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con ALTRI STRUMENTI

15.1 Prestazioni cliniche

Le prestazioni cliniche di **C. difficile ELITE MGB Kit** utilizzato in associazione con campioni di feci e con il sistema **ELITE STAR** sono state determinate mediante analisi di un pannello di campioni clinici precedentemente sottoposti a esame colturale di citotossicità per *C. difficile* come metodo di riferimento. Nel complesso, sono stati analizzati 82 campioni di feci, di cui 30 positivi e 52 negativi. Ogni campione è stato utilizzato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con prodotti ELITechGroup S.p.A.

Tabella 45

C. difficile ELITE MGB Kit	Metodo di riferimento		
	Tx C. difficile Positivo	Tx C. difficile Negativo	Totale
<i>C. difficile</i> , variante tossinogenica, Positivo	29	4	33
<i>C. difficile</i> , variante tossinogenica, Negativo	1	48	49
Totale campioni validi per l'analisi	30	52	82
Sensibilità diagnostica (percentuale concordanza positiva)	97%	-	
Specificità diagnostica (percentuale di concordanza negativa)	-	92%	

Rispetto al metodo di riferimento, il **C. difficile ELITE MGB Kit** ha identificato il 97% dei campioni positivi e il 92% di quelli negativi per *C. difficile*, variante tossinogenica. Il saggio non ha confermato 1 campione positivo risultato tale all'esame colturale. Il saggio ha identificato 4 campioni positivi risultati negativi all'esame colturale. L'analisi della curva di melting ha confermato che 4 campioni erano veri positivi per *C. difficile*, variante tossinogenica.

I risultati discrepanti sono stati verificati con un test molecolare indipendente (Xpert® C. difficile system, Cepheid). I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente

Tabella 46

C. difficile ELITE MGB Kit	Metodo di riferimento		
	Tx C. difficile Positivo	Tx C. difficile Negativo	Totale
<i>C. difficile</i> , variante tossinogenica, Positivo	33	0	33
<i>C. difficile</i> , variante tossinogenica, Negativo	0	49	49
Totale campioni validi per l'analisi	33	49	82
Sensibilità diagnostica (percentuale concordanza positiva)	100%	-	
Specificità diagnostica (percentuale di concordanza negativa)	-	100%	

Le prestazioni cliniche di **C. difficile ELITE MGB Kit** utilizzato in associazione con campioni di feci e con il sistema **ELITE GALAXY** sono state determinate mediante analisi di un pannello di campioni clinici precedentemente sottoposti a esame colturale di citotossicità come metodo di riferimento. Nel complesso, sono stati analizzati 82 campioni di feci affetti da *C. difficile*, di cui 30 positivi e 52 negativi. Ogni campione è stato utilizzato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con prodotti ELITechGroup S.p.A.

Tabella 47

C. difficile ELITE MGB Kit	Metodo di riferimento		
	Tx C. difficile Positivo	Tx C. difficile Negativo	Totale
<i>C. difficile</i> , variante tossinogenica, Positivo	28	4	32
<i>C. difficile</i> , variante tossinogenica, Negativo	2	48	50
Totale campioni validi per l'analisi	30	52	82
Sensibilità diagnostica (percentuale concordanza positiva)	93%	-	
Specificità diagnostica (percentuale di concordanza negativa)	-	92%	

Rispetto al metodo di riferimento, il **C. difficile ELITE MGB Kit** ha identificato il 93% dei campioni positivi e il 92% di quelli negativi per *C. difficile*, variante tossinogenica. Il saggio non ha confermato 2 campioni positivi risultati tali all'esame colturale. Il saggio ha identificato 4 campioni positivi risultati negativi all'esame colturale. L'analisi della curva di melting ha confermato che 4 campioni erano veri positivi per *C. difficile*, variante tossinogenica.

I risultati discrepanti sono stati verificati con un test molecolare indipendente (Xpert® C. difficile system, Cepheid). I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 48

C. difficile ELITE MGB Kit	Metodo di riferimento		
	Tx C. difficile Positivo	Tx C. difficile Negativo	Totale
<i>C. difficile</i> , variante tossinogenica, Positivo	32	0	32
<i>C. difficile</i> , variante tossinogenica, Negativo	1	49	50
Totale campioni validi per l'analisi	33	49	82
Sensibilità diagnostica (percentuale concordanza positiva)	100%	-	
Specificità diagnostica (percentuale di concordanza negativa)	-	100%	

Le prestazioni cliniche di **C. difficile ELITE MGB Kit** sono state determinate sulla base di uno studio sperimentale prospettivo che ha confrontato i risultati ottenuti con il **C. difficile ELITE MGB Kit** utilizzato in associazione con NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux) e con 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems) con un esame colturale di citotossicità come metodo di riferimento.

Nel complesso, 100 campioni di feci positivi e negativi per *C. difficile* già sottoposti a esame colturale sono stati testati con il **C. difficile ELITE MGB Kit**. Rispetto al metodo di riferimento, il **C. difficile ELITE MGB Kit** ha identificato il 100% dei campioni positivi e l'86% di quelli negativi per *C. difficile*, variante tossica.

Tabella 49

C. difficile ELITE MGB Kit	Metodo di riferimento		
	Tx C. difficile Positivo	Tx C. difficile Negativo	Totale
C. difficile, variante tossinogenica, Positivo	50	7	57
C. difficile, variante tossinogenica, Negativo	0	43	43
Totale campioni validi per l'analisi	50	50	100
Sensibilità diagnostica (percentuale concordanza positiva)	100%	-	
Specificità diagnostica (percentuale di concordanza negativa)	-	86%	

Rispetto al metodo di riferimento, il **C. difficile ELITE MGB Kit** ha identificato il 100% dei campioni positivi e il 86% di quelli negativi per *C. difficile*, variante tossinogenica. Il saggio ha identificato 7 campioni positivi risultati negativi all'esame colturale.

I risultati discrepanti sono stati verificati mediante PCR utilizzando primer specifici per il gene codificante la tossina B, ma non sono stati correlati a quelli ottenuti con il **C. difficile ELITE MGB Kit**. I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente

Tabella 50

C. difficile ELITE MGB Kit	Metodo di riferimento		
	Tx C. difficile Positivo	Tx C. difficile Negativo	Totale
C. difficile, variante tossinogenica, Positivo	50	5	55
C. difficile, variante tossinogenica, Negativo	0	45	45
Totale campioni validi per l'analisi	50	50	100
Sensibilità diagnostica (percentuale concordanza positiva)	100%	-	
Specificità diagnostica (percentuale di concordanza negativa)	-	90%	

15.2 Prestazioni non cliniche

15.2.1 Limite di rilevazione

Il LoD di **C. difficile ELITE MGB Kit** è stato calcolato mediante analisi di regressione con modello Probit. Il LoD di ogni ceppo è stato calcolato come concentrazione con il 95% di probabilità che il campione risulti positivo.

Il LoD di **C. difficile ELITE MGB Kit** utilizzato in associazione con campioni di feci chiarificati e con il sistema **ELITE STAR** è stato determinato utilizzando due ceppi di *C. difficile*, variante tossinogenica.

I materiali di riferimento contenenti *C. difficile* 027 o *C. difficile* 017 (Qnostics Ltd, UK) sono stati diluiti fino a ottenere feci chiarificate negative. Più diluizioni in un intervallo da 1000 CFU/ml a 1 CFU/ml sono state testate eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con prodotti ELITechGroup S.p.A

Si riportano di seguito i valori di LoD espressi in CFU/ml.

Tabella 51 Limite di rilevazione per i campioni fecali chiarificati e sistema ELITE STAR

Ceppo	CFU / mL
<i>C. difficile</i> 027, toxin A+B+, toxinotype III	187
<i>C. difficile</i> 017, toxin A-B+, toxinotype VIII	278

Il LoD di **C. difficile ELITE MGB Kit** utilizzato in associazione con campioni di feci chiarificati e con il sistema **ELITE GALAXY** è stato determinato utilizzando due ceppi di *C. difficile*, variante tossinogenica.

I materiali di riferimento contenenti *C. difficile* 027 o *C. difficile* 017 (Qnostics Ltd, UK) sono stati diluiti fino a ottenere feci chiarificate negative. Più diluizioni in un intervallo da 178 CFU/ml a 1,78 CFU/ml sono state testate eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, allestimento della reazione di PCR e amplificazione, con prodotti ELITechGroup S.p.A.

Si riportano di seguito i valori di LoD espressi in CFU/ml.

Tabella 52 Limite di rilevazione per i campioni fecali chiarificati e sistema ELITE GALAXY

Ceppo	CFU / mL
<i>C. difficile</i> 027, toxin A+B+, toxinotype III	88
<i>C. difficile</i> 017, toxin A-B+, toxinotype VIII	84

Il LoD di **C. difficile ELITE MGB Kit** utilizzato in associazione con campioni fecali chiarificati e con il sistema **NucliSENS easyMAG** è stato determinato utilizzando due ceppi di *C. difficile*, variante tossinogenica.

Colture fresche di *C. difficile* ceppo VPI 10463 e ceppo 4118 sono state quantificate e diluite fino a ottenere feci chiarificate negative. Più diluizioni sono state testate eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con prodotti BioMérieux e ELITechGroup S.p.A.

Dopo la determinazione, il LoD di ciascun ceppo è stato verificato testando 20 replicati alla concentrazione dichiarata. Si riportano di seguito i valori di LoD espressi in CFU/ml.

Tabella 53 Limite di rilevazione per i campioni fecali chiarificati e sistema NucliSENS easyMAG

Ceppo	CFU / mL
ATCC 43255, Strain VPI 10463, Toxinotype 0	1.121
ATCC BAA-1870, Strain 4118, Toxinotype III	3.750

15.2.2 Sensibilità analitica: riproducibilità con materiale di riferimento calibrato

La riproducibilità dei risultati del saggio rispetto ai risultati ottenuti utilizzando altri saggi di vari laboratori è stata controllata mediante test su un proficiency panel.

Per un test è stato utilizzato come materiale di riferimento il prodotto QCMD 2012 *C. difficile* DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, UK). Ogni campione è stato testato eseguendo l'estrazione con il sistema **ELITE STAR** e l'amplificazione con prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 54 Test con proficiency panel e sistema ELITE STAR

Campione	tipo	CFU/ml	Risultato
CD12-01	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁴	POS
CD12-02	<i>C. sordellii</i>	-	NEG

Tabella 54 Test con proficiency panel e sistema ELITE STAR (segue)

Campione	tipo	CFU/ml	Risultato
CD12-03	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ³	POS
CD12-04	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	POS
CD12-05	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	POS
CD12-06	Negative	-	NEG
CD12-07	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁶	POS
CD12-08	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁶	POS
CD12-09	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁴	POS
CD12-10	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁵	POS

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente.

Per un altro test è stato utilizzato come materiale di riferimento il prodotto QCMD 2012 *C. difficile* DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, UK). Ogni campione è stato testato utilizzando per l'estrazione e l'allestimento della reazione di PCR il sistema **ELITE GALAXY** e per l'amplificazione i prodotti ELITechGroup

S.p.A. I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 55 Test con proficiency panel e sistema ELITE GALAXY

Campione	tipo	CFU/ml	Risultato
CD12-01	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁴	POS
CD12-02	<i>C. sordellii</i>	-	NEG
CD12-03	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ³	POS
CD12-04	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	POS
CD12-05	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	POS
CD12-06	Negative	-	NEG
CD12-07	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁶	POS
CD12-08	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁶	POS
CD12-09	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁴	POS
CD12-10	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁵	POS

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente.

Per l'ultimo test è stato utilizzato come materiale di riferimento il prodotto QCMD 2013 *C. difficile* DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, UK). Ogni campione è stato testato utilizzando per l'estrazione NucliSENS® easyMAG® e per l'amplificazione prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 56 Test con proficiency panel e sistema NucliSENS easyMAG

Campione	tipo	CFU/mL.	Pos./ Rep.	Risultato
CD13-01	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	2/2	POS
CD13-02	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁶	2/2	POS
CD13-03	Negative	-	0/2	NEG
CD13-04	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁴	2/2	POS
CD13-05	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁶	2/2	POS
CD13-06	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁵	2/2	POS
CD13-07	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ³	2/2	POS
CD13-08	<i>C. sordellii</i>	2.1 x 10 ⁵	0/2	NEG
CD13-09	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	2/2	POS
CD13-10	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁴	2/2	POS

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente.

15.2.3 Efficienza della rilevazione del genotipo (inclusività)

Le prestazioni del **C. difficile ELITE MGB Kit** hanno correttamente identificato 30 ceppi isolati di *C. difficile*, variante tossinogenica, che rappresentano la diversità genetica globale includono 7 diverse tossine (0, III, V, VIII, X, XII, & XXII) e 13 diversi ribotipi di PCR (001, 002, 010, 012, 014, 017, 020, 027, 036, 056, 087, 110, & 154). Tutti i ceppi sono stati ottenuti e quantizzati da ATCC (American Tissue Culture Collection), con la sola eccezione del ceppo CCUG 8864 (Tossinotipo X) di *C. difficile*. Tutti i ceppi testati sono stati aggiunti a delle feci negative purificate in quantità vicina al limite di individuazione e testate con il **C. difficile ELITE MGB Kit**. Tutti i ceppi sono risultati positivi.

Tabella 57

ATCC	Ceppo	Isolato	Tossina A / B	Tossinotipo	Ribotipo PCR
9689	90556-M6S	(tipo ceppo)	A+B+	0	001
17857	870, N4	Sconosciuto	A+B+	0	001
43255	VPI 10463	Lesione addominale	A+B+	0	087
43594	W1194	Feci umane, Belgio	A+B+	0	005
43596	545	Feci umane, Belgio	A+B+	0	012
43597	Unknown	Feci umane, Belgio	A+B+	0	014
43598	1470 (F)	Feci umane, Belgio	A-B+	VIII	017
43599	2022	Feci umane, Belgio	A+B+	0	001
43600	2149	Feci umane, Belgio	A+B+	0	014
51695	BDMS 18 AN	Sconosciuto	A+B+	0	001
700792	14797-2	Michigan, feci di donna, 1977	A+B+	0	005
BAA-1382	630	Isolato clinico, Svizzera, 1982	A+B+	0	012
BAA-1803	Unknown	Isolato clinico di Quest	A+B+	IIIc	027

Tabella 57 (segue)

ATCC	Ceppo	Isolato	Tossina A / B	Tossinotipo	Ribotipo PCR
BAA-1804	Unknown	Isolato clinico di Quest	A+B+	0	053
BAA-1805	Unknown	Isolato clinico di Quest	A+B+	IIIb	027
BAA-1806	Unknown	Isolato clinico di Quest	A+B+	0	220
BAA-1808	Unknown	Isolato clinico di Quest	A+B+	0	020
BAA-1811	Unknown	Isolato clinico di Quest	A+B+	0	057
BAA-1812	Unknown	Isolato clinico di Quest	A+B+	XII	024
BAA-1813	Unknown	Isolato clinico di Quest	A+B+	0	002
BAA-1814	Unknown	Isolato clinico di Quest	A+B+	XXII	251
BAA-1870	4118	Umano, Maine, 2004 (ceppo ipervirulento NAP1/BI/027)	A+B+	IIIb	027
BAA-1871	4111	Umano, New Jersey	A+B+	0	001
BAA-1872	4206	Umano, Maine	A+B+	0	207
BAA-1873	5283	Umano, New York	A+B+	0	053
BAA-1874	4205	Umano, Oregon	A+B+	0	002
BAA-1875	5325	Umano, Georgia	A+B+	V	078
BAA-2155	LBM 0801058	Feci umane, Albuquerque, NM, USA	A+B+	XXII	251
BAA-2156	LBM 0801040	Feci umane, Cambridge, UK 2007	A+B+	0	118
-	CCUG 8864	Prof. M. Delmee, C. U. Louvain, Bruxelles	A-B+	X	036

15.2.4 Cross-reattività e interferenza

La specificità analitica di **C. difficile ELITE MGB Kit** è stata testata per verificarne la cross-reattività su *C. difficile*, variante non tossinogenica, specie filogeneticamente affine a *C. difficile* e altri microrganismi patogeni comunemente presenti nella normale microflora intestinale. Le specie testate sono state costituite da batteri e funghi (possibilmente in concentrazioni di 1×10^6 CFU), parassiti virali e intracellulari (in concentrazioni di 1×10^5 PFU o IFU). È stato testato anche DNA genomico umano (in concentrazioni di 1×10^6 cellule). Tutti gli organismi (130) testati con il prodotto **C. difficile ELITE MGB Kit** in associazione al sistema NucliSENS® easyMAG® non hanno evidenziato cross-reattività, tranne *Clostridium nexile*, che ha mostrato una reazione crociata con la reazione di amplificazione per il gene codificante la tossina B.

C. nexile è stato osservato in circa il 3% dei campioni clinici testati. *C. nexile* non esprime la tossina B, ma l'omologia tra sequenze è sufficiente a produrre un segnale nel saggio. La specificità analitica globale è stata del 99% (129/130).

La specificità analitica del **C. difficile ELITE MGB Kit** è stata anche valutata per le interferenze microbiche testando le stesse specie utilizzate per la cross reattività. I microrganismi sono stati inoculati come descritto in precedenza per il test di cross reattività, ma anche inoculati singolarmente con ognuno dei due ceppi tossici di *C. difficile* (ATCC 43255, VPI 10463, Tossinotipo 0 o ATCC BAA 1870, 4118, Tossinotipo III) vicino al limite di sensibilità. Tutti gli organismi testati usando il prodotto **C. difficile ELITE MGB Kit** sono risultati esenti da interferenze microbiche.

Tabella 58

Generi e specie	Cod.	Produttore	Quantità	Interferisce?
<i>Abiotrophia defectiva</i>	49176	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	15309	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Aeromonas hydrophila</i>	7966	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Alcaligenes faecalis subsp. faecalis</i>	15554	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Anaerococcus tetradius</i>	35098	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Bacillus cereus</i>	13472	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Bacteroides caccae</i>	43185	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Bacteroides merdae</i>	43184	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Bacteroides stercoris</i>	43183	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	15703	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Bifidobacterium longum</i>	15707	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Campylobacter coli</i>	BAA-370	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i>	33292	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Candida albicans</i>	10231	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Cedecea davisae</i>	33431	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Chlamydia trachomatis</i>	8017775	Zeptomatrix	1×10 ⁵	No
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	25405	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Citrobacter freundii</i>	8090	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Citrobacter koseri</i>	27028	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Citrobacter sedlakii</i>	51115	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium beijerinckii</i>	8260	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium bifermentans</i>	638	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium bolteae</i>	BAA-613	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium butyricum</i>	19398	ATCC	1.5×10 ⁵	No
<i>Clostridium chauvoei</i>	11957	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium difficile</i> (non tossigeno)	43593	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium difficile</i> (non tossigeno)	43601	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium difficile</i> (non tossigeno)	43602	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium difficile</i> (non tossigeno)	43603	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium difficile</i> (non tossigeno)	700057	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium difficile</i> (non tossigeno)	BAA-1801	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium difficile</i> (non tossigeno)	BAA-1807	ATCC	1×10 ⁶	No

Tabella 58 (segue)

Generi e specie	Cod.	Produttore	Quantità	Interferisce?
<i>Clostridium difficile</i> (non tossigeno)	BAA-1809	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium difficile</i> (non tossigeno)	BAA-1810	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium difficile</i> toxinotype Xla, A-/B-	R11402	Thermo-Fisher Diagnostics	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium difficile</i> toxinotype Xlb, A-/B-	IS58	Thermo-Fisher Diagnostics	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium fallax</i>	19400	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium haemolyticum</i>	9650	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium histolyticum</i>	19401	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium innocuum</i>	14501	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium methylpentosum</i>	43829	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium nexile</i>	27757	ATCC	1×10 ⁶	Yes
<i>Clostridium novyi</i>	19402	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium paraputrificum</i>	25780	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium perfringens</i>	13124	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium ramosum</i>	25582	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium scindens</i>	35704	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium septicum</i>	12464	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium sordellii</i>	9714	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium sphenoides</i>	19403	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium spiroforme</i>	29899	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium sporogenes</i>	15579	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium symbiosum</i>	14940	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium tertium</i>	14573	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Clostridium tetani</i>	19406	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Collinsella aerofaciens</i>	25986	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Corynebacterium genitalium</i>	33798	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Desulfovibrio piger</i>	29098	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Edwardsiella tarda</i>	15947	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Eggerthella lenta</i>	25559	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Enterobacter aerogenes</i>	51697	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Enterococcus casseliflavus</i> (vanC2)	25788	ATCC	1×10 ⁶	No

Tabella 58 (segue)

Generi e specie	Cod.	Produttore	Quantità	Interferisce?
<i>Enterococcus cecorum</i>	43198	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Enterococcus dispar</i>	51266	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Enterococcus faecalis (vanB)</i>	51299	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Enterococcus faecium (vanA)</i>	700221	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Enterococcus gallinarum (vanC)</i>	700425	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Enterococcus hirae</i>	10541	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Enterococcus raffinosus</i>	49427	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Escherichia coli</i>	35218	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Escherichia fergusonii</i>	35469	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Escherichia hermannii</i>	33650	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Flavonifractor plautii</i>	49531	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Fusobacterium varium</i>	8501	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Gardnerella vaginalis</i>	14019	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Hafnia alvei</i>	13337	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Helicobacter fennelliae</i>	35683	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Helicobacter pylori</i>	43504	ATCC	1×10 ⁶	No
Homo sapiens, Human Cells	-	Seattle Children Hospital Research Institute	1×10 ⁶	No
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8724	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	13883	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Lactobacillus reuteri</i>	23272	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Lactococcus lactis</i>	11454	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Leminorela grimontii</i>	33999	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Listeria grayi</i>	19120	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Listeria innocua</i>	33090	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Listeria monocytogenes</i>	13932	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	27337	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	14029	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	25260	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845	ATCC	1×10 ⁶	No

Tabella 58 (segue)

Generi e specie	Cod.	Produttore	Quantità	Interferisce?
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Proteus penneri</i>	35198	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Providencia alcalifaciens</i>	9886	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Providencia rettgeri</i>	9250	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Providencia stuartii</i>	33672	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Ruminococcus bromii</i>	27255	ATCC	1.75×10 ⁵	No
<i>Salmonella choleraesuis</i> (typhimurium)	14028	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Salmonella enterica</i> subsp. Arizonae	13314	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Salmonella enterica</i> subsp. Enterica	700720	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Serratia liquefaciens</i>	27592	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Serratia marcescens</i>	274	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Shigella boydii</i>	9207	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Shigella dysenteriae</i>	11835	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Shigella sonnei</i>	25931	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Staphylococcus aureus</i>	BAA-1556	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	13637	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12973	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	43078	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Streptococcus uberis</i>	19436	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Trabulsiella guamensis</i>	49490	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Veillonella parvula</i>	10790	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Vibrio cholerae</i>	25870	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17802	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Yersinia bercovieri</i>	43970	ATCC	1×10 ⁶	No
<i>Yersinia rohdei</i>	43380	ATCC	1×10 ⁶	No
Adenovirus	VR-1516	ATCC	1×10 ⁵	No
Coxsackievirus	VR-28	ATCC	1×10 ⁵	No
Cytomegalovirus	VR-1590	ATCC	1×10 ⁵	No
Echovirus	VR-41	ATCC	1×10 ⁵	No

Tabella 58 (segue)

Generi e specie	Cod.	Produttore	Quantità	Interferisce?
Enterovirus	VR-836	ATCC	1×10 ⁵	No
Norovirus Type I	0810086CF	ZeptoMetrix	1×10 ⁵	No
Rotavirus	VR-2018	ATCC	1×10 ⁵	No

15.2.5 Riproducibilità

La riproducibilità è stata valutata tramite un pannello di 7 campioni di feci compreso un negativo e varie concentrazioni di due ceppi di *C. difficile* (ATCC 43255 e BAA-1870), su tre replicati da due operatori. Per ogni ceppo di *C. difficile*, il pannello ha incluso un campione al di sotto del limite di sensibilità (con un intervallo atteso di positività tra il 20% e 80%), un basso positivo (con concentrazione al limite di sensibilità, la positività attesa si attesta al 95%), un positivo moderato (tre volte il limite di sensibilità, atteso al 100% di positività). Ognuno dei due operatori ha effettuato una corsa al giorno per 12 giorni con 3 lotti di reagenti (7 campioni x 3 replicati x 12 giorni x 2 corse PCR). Ogni campione è stato testato con l'intera procedura: estrazione con **NucliSENS® easyMAG®** e l'amplificazione con i prodotti di ELITechGroup S.p.A.

Il pannello negativo ha raggiunto un tasso del 100% di negatività. I campioni sotto il limite di sensibilità hanno raggiunto il 78% di positività. Il basso positivo ha raggiunto il 98%. Il moderato positivo ha raggiunto il 100%.

Tabella 59 Riproducibilità giorno per giorno

Tipo di campione	gior- no 1	gior- no 2	gior- no 3	gior- no 4	gior- no 5	gior- no 6	gior- no 7	gior- no 8	gior- no 9	gior- no 10	gior- no 11	gior- no 12	% totale di concor- danza
Negativo	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	72 / 72 (100%)
Inferiore a LoD	6 / 12	12 / 12	8 / 12	10 / 12	7 / 12	7 / 12	11 / 12	10 / 12	12 / 12	9 / 12	11 / 12	10 / 12	113 / 144 (78%)
Scarsamen- te positivo	10 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	11 / 12	12 / 12	12 / 12	141 / 144 (98%)
Moderata- mente positivo	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	144 / 144 (100%)

Tabella 60 Riproducibilità da lotto a lotto

Tipo di campione	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3	% totale di concordanza
Negativo	30 / 30	27 / 27	15 / 15	72 / 72 (100%)
Inferiore a LoD	50 / 60	38 / 54	25 / 30	113 / 144 (78%)
Scarsamente positivo	57 / 60	54 / 54	30 / 30	141 / 144 (98%)
Moderatamente positivo	60 / 60	54 / 54	30 / 30	144 / 144 (100%)

15.2.6 Carry-Over / Contaminazione crociata

È stato condotto uno studio analitico per valutare il potenziale di contaminazione crociata tra campioni a elevato contenuto di *C. difficile* (5×10^8 CFU/mL) e campioni negativi utilizzando il prodotto **C. difficile ELiTe MGB Kit** in associazione con NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux) e 7500 Fast Dx Real- Time PCR Instrument (Applied Biosystems). Due operatori hanno eseguito cinque estrazioni di 24 campioni (11 campioni a elevato contenuto di *C. difficile*, 11 campioni negativi, 1 controllo positivo e 1 controllo negativo per analisi) con uno schema a scacchiera (campioni a elevato contenuto di *C. difficile* interrotti da campioni completamente negativi). I campioni trattati sono stati quindi amplificati in cinque analisi separate usando due diversi schemi a scacchiera. La prova della contaminazione crociata non ha dato come risultato alcun falso positivo sui 55 campioni negativi di *C. difficile*.

NOTA

I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche prestazionali del prodotto sono registrati nel cap. 7 del Fascicolo Tecnico di Prodotto per "C. difficile ELiTe MGB® kit", FTP M800358.

16 BIBLIOGRAFIA

Cloud J. and Kelly C. P. (2007) Cur. Opin. Gastroenterology 23: 4 - 9.

Cohen, S. H. et al. (1998) Clin. Infect. Diseases 26: 410 - 412.

Kuijper, E. J. et al. (2006) Clin. Microb. and Infection 12: 2 - 18.

Article about LoB and LoD statistics: K. Linnet and M. Kondratovich (2004) Clin. Chem. 50: 732 - 740.

CLSI EP37, Ed1E: "Supplemental Tables for interference Testing in Clinical Chemistry"

17 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti campioni clinici: feci umane liquide o non formate.

I risultati ottenuti con questo prodotto dipendono dalla corretta identificazione, raccolta, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni. Per evitare risultati errati è necessario pertanto, procedere con cautela durante queste fasi e seguire attentamente le istruzioni per l'uso riportate nel manuale fornito con il prodotto.

La metodica di amplificazione Real-Time utilizzata in questo prodotto ha un'elevata sensibilità analitica che la rende soggetta a contaminazioni da campioni clinici positivi, da controlli positivi e dagli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le contaminazioni possono produrre risultati falsi positivi. Il formato del prodotto è in grado di limitare le cross-contaminazioni; tuttavia questi fenomeni possono essere evitati solo attenendosi alle buone prassi di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni riportate nel presente manuale.

Questo prodotto deve essere utilizzato da personale qualificato e addestrato alla manipolazione di campioni biologici potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati come pericolosi al fine di evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede l'uso di abbigliamento da lavoro e la disponibilità di aree idonee alla lavorazione di campioni biologici potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati come pericolosi al fine di evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e strumenti dedicati alla preparazione delle sessioni di lavoro per evitare risultati falsi positivi.

Questo prodotto deve essere utilizzato da professionisti qualificati e addestrati all'uso di tecniche di biologia molecolare, quali estrazione, PCR e rilevazione di acidi nucleici.

È necessario disporre di aree separate per l'estrazione/preparazione delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione/rilevamento dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

Questo prodotto richiede l'uso di indumenti e strumenti speciali per l'estrazione/preparazione delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione/rilevamento dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

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

Un risultato positivo ottenuto con questo prodotto non indica la presenza di *C. difficile* vitali ma presuppone la presenza di *C. difficile*. Un risultato positivo, quindi, non indica necessariamente il fallimento dell'intervento di eradicazione in quanto può persistere DNA non vitale.

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto significa che non è stato rivelato il DNA della Tossina A o della Tossina B nel DNA estratto dal campione, ma non si può escludere che il DNA di *C. difficile* abbia un titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedere Caratteristiche delle prestazioni). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

Un risultato negativo in seguito a un precedente risultato positivo potrebbe indicare o non indicare il successo dell'eradicazione.

In case of co-infections, the sensitivity for one target can be affected by the amplification of a second target (see Performance Characteristics).

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi per via di un difetto del controllo interno. In questo caso il campione dovrà essere analizzato di nuovo, a cominciare dall'estrazione, con conseguente possibile ritardo nel conseguimento dei risultati finali. Possibili polimorfismi, inserzioni o delezioni nella regione del DNA target coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione e la quantificazione del DNA target.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati insieme a tutte le osservazioni cliniche rilevanti e agli esiti degli esami di laboratorio.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, vi è un rischio residuo di ottenere con questo prodotto risultati non validi, falsi positivi e falsi negativi. Tale rischio residuo non può essere eliminato né ulteriormente ridotto. In taluni casi, potrebbe indurre decisioni sbagliate con effetti potenzialmente pericolosi per il paziente. Comunque, questo rischio residuo associato all'uso previsto del prodotto è stato valutato in rapporto ai benefici potenziali per il paziente ed è stato considerato accettabile.

18 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

ELITE InGenius ed ELITE BeGenius

Tabella 61

Reazione del Controllo Positivo non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix e del Controllo Positivo. Controllare i volumi della PCR Mix e del Controllo Positivo.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la PCR Mix per più di 5 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non utilizzare la PCR Mix per più di 5 sessioni consecutive (nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione del Controllo Positivo.	Non utilizzare il Controllo Positivo per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione o nel blocco refrigerato). Utilizzare nuove aliquote di Controllo Positivo.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A.

Tabella 62

Reazione del Controllo Negativo non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix e del Controllo Negativo. Controllare i volumi della PCR Mix e del Controllo Negativo.
Contaminazione del Controllo Negativo.	Non utilizzare il Controllo Negativo per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack e dell'area reagenti o dell'unità refrigerata.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

Tabella 63

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix, del Controllo Interno e del campione. Controllare i volumi della PCR Mix, del Controllo Interno e del campione.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la PCR Mix per più di 5 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non utilizzare la PCR Mix per più di 5 sessioni consecutive (nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione del Controllo Interno.	Utilizzare una nuova aliquota di Controllo Interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR). Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione in una sessione in modalità "Extract + PCR".
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

Tabella 64

Curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	Soluzioni
Assenza di un picco definito. Picco definito ma Tm differenti da quelle degli altri campioni e da quelle del Controllo Positivo.	Controllare che il Ct del target sia inferiore a 30. Elevate quantità del prodotto di amplificazione alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di dissociazione. Ripetere l'amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Il target nel campione deve essere sequenziato per confermare la mutazione.

Tabella 65

Errore nel calcolo del Ct	
Possibili cause	Soluzioni
Concentrazione troppo elevata del target nel campione o campione con anomala forma del plot.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa selezionare il track relativo al campione e approvare manualmente il risultato come positivo. Se nel PCR plot non appare nessuna amplificazione selezionare il rack relativo al campione e approvare manualmente il risultato come negativo o lasciarlo invalido. Se è richiesto un valore di Ct: - ripetere la reazione di amplificazione del campione eluito con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR) oppure - ripetere l'estrazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "Extract + PCR" (Estrazione + PCR).

Tabella 66

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

Piattaforme aperte

Tabella 67

DNA Target non rilevato nella reazione del Controllo Positivo	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastra.	Prestare attenzione quando si dispensano le reazioni nei pozzetti della micropiastra e attenersi al foglio di lavoro. Controllare i volumi della PCR Mix e del Controllo Positivo dispensati.
Degradazione della PCR Mix	Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Degradazione del Controllo Positivo	Utilizzare nuove aliquote di Controllo Positivo.
Errata impostazione dello strumento	Controllare la posizione della PCR Mix, e del Controllo Positivo nello strumento. Controllare il ciclo termico impostato sullo strumento.

Tabella 68

DNA Target non rilevato nella reazione del Controllo Negativo	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastra.	Evitare di versare il contenuto della provetta del campione. Cambiare sempre i puntali tra un campione e l'altro Fare attenzione quando si dispensano campioni, controlli negativi, controlli positivi nei pozzetti della micropiastra e attenersi al foglio di lavoro.
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix, del Controllo Negativo, del Controllo positivo sullo strumento
Micropiastra sigillata male	Sigillare con attenzione la micropiastra.
Contaminazione dell'acqua per biologia molecolare	Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack e dell'area reagenti o dell'unità refrigerata.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.

Tabella 69

Presenza di fluorescenza di fondo irregolare o elevata nelle reazioni	
Possibili cause	Soluzioni
Errata dispensazione del campione.	Controllare i volumi dei reagenti e dei campioni dispensati nelle micropiastre di Q-PCR.
Errore nell'impostazione della "baseline".	Impostare l'intervallo di calcolo della "baseline" in un ambito di cicli in cui la fluorescenza di fondo sia già stabilizzata (controllare le registrazioni "Results", "Component") e la fluorescenza del segnale non abbia ancora cominciato a crescere, per esempio dal ciclo 6 al ciclo 15. Impostare il calcolo automatico della "baseline" selezionando l'opzione "Auto Baseline".

Tabella 70

Curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	Soluzioni
Assenza di un picco definito. Picco definito ma Tm differente da quella degli altri campioni, degli Standard o del Controllo Positivo.	Controllare che il Ct del detector FAM sia minore di 30. Quantità elevate di prodotto di amplificazione presenti alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di dissociazione. Ripetere l'amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Per confermare la presenza di una mutazione il DNA bersaglio presente nel campione dovrebbe essere sequenziato.

19 LEGENDA DEI SIMBOLI



Numero di catalogo



Limite superiore di temperatura



Codice del lotto.



Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).



Dispositivo medico diagnostico *in vitro*.



Conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98/79/EC relativa ai dispositivi medici diagnostici *in vitro*.



Numero Unico Identificativo del dispositivo



Contenuto sufficiente per "N" test.



Consultare le istruzioni per l'uso



Contenuto.



Tenere lontano dalla luce solare.



Fabbricante.

20 AVVISO PER L'UTILIZZATORE

Qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiedono l'utilizzatore e/o il paziente. Per informare ELITechGroup S. p. A., fabbricante di questo dispositivo, si prega di utilizzare il seguente indirizzo e-mail: egspa.vigilance@elitechgroup.com.

21 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

Questo prodotto contiene reagenti fabbricati da Thermo Fisher Scientific e venduti sulla base di accordi di licenza stipulati tra ELITechGroup S.p.A. e le sue affiliate e Thermo Fisher Scientific. Il prezzo d'acquisto di questo prodotto include diritti non trasferibili, limitati a utilizzare solo questa quantità di prodotto esclusivamente per attività dell'acquirente direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sulla licenza d'acquisto per questo prodotto per fini diversi da quelli dichiarati sopra, rivolgersi a Licensing Department, Thermo Fisher Scientific. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

I reagenti di rilevazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più brevetti U. S. A. numero 7319022, 7348146, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8163910, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, e brevetti EP numero 2689031, 2714939, 2736916, 2997161. Sono state poi presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

Le tecnologie ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® sono coperte da brevetti e oggetto di domande di brevetto.

Questa licenza limitata permette all'individuo o alla persona giuridica alla quale il prodotto è stato fornito di utilizzarlo unitamente ai dati generati dal suo utilizzo solo per la diagnostica umana. Né ELiTechGroup S.p.A. né i suoi licenziatari concedono altre licenze, esplicite o implicite, per altri scopi.

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELiTe MGB®, il logo ELiTe MGB®, ELiTe InGenius® ed ELiTe BeGenius® sono marchi registrati di ELiTechGroup all'interno dell'Unione Europea.
QIAsymphony® è un marchio registrato di QIAGEN GmbH.
Ficoll® è un marchio registrato di GE Healthcare Bio-Sciences AB.

Appendix A C. difficile ELITE MGB Kit used in association with Genius series® platforms



CAUTION

This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com

Intended Use

The product **C. difficile ELITE MGB® Kit** is an in vitro diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as a qualitative multiplex nucleic acids Real-Time PCR assay for the **detection of toxin A and toxin B genes of toxigenic Clostridium difficile** (alias *Clostridiodes difficile*, **C. difficile**), including the hypervirulent epidemic NAP1/BI/027 strain, in DNA samples extracted from unformed or liquid stool specimens.

The assay is validated in association with the **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®** instruments, automated and integrated systems for extraction, Real-Time PCR and results interpretation, using human specimens of stool.

The assay is also validated in association with the **7500 Real-Time PCR System**, using human specimens of stool.

The product is intended for use as an aid in the diagnosis of toxigenic **C. difficile** in healthcare settings in conjunction with other laboratory test results and clinical data.

The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observations and laboratory outcomes.

Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target 1	C. difficile toxin A-specific gene	AP525	Toxin A
Target 2	C. difficile toxin B-specific gene	FAM	Toxin B
Target 3	IC2	AP642	IC

Validated matrix

- Native stool collected without preservatives

Kit content and related products

C. difficile ELITE MGB Kit (M800358)		C. difficile - ELITE Positive Control (M800373)	
 X 4		 X 2	
C. difficile PCR Mix 4 tubes of 540 µL 24 reactions per tube 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles per tube		C. difficile Positive Control 2 tubes of 160 µL 4 reactions per tube 8 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles per tube	
Maximum shelf-life:	24 months	Maximum shelf-life	24 months
Storage temperature	≤ -20°C	Storage temperature	≤ -20°C

Other products required not provided in the kit

• ELITE InGenius instrument: INT030. • ELITE BeGenius instrument: INT040. • ELITE InGenius SP 200: INT032SP200.	• CPE - Internal Control: CTCPE • ELITE InGenius and ELITE BeGenius Consumables (see ELITE InGenius and ELITE BeGenius Instruction for Use)
---	--

ELITE InGenius and ELITE BeGenius Protocol

• Sample volume • CPE volume • Total elution volume	200 µL 10 µL 100 µL	• Eluate PCR input volume • PCR Mix volume • Frequency of controls	20 µL 20 µL 15 days
---	---------------------------	--	---------------------------

ELITE InGenius and ELITE BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Sensitivity	Specificity
Native Stool	500 CFU/mL	100% (30/30)	97.8% (44/45)

Sample preparation

This product is intended for use on the **ELITE InGenius** and **ELITE BeGenius** with the following clinical specimens identified according to laboratory guidelines, and collected, transported, and stored under the following conditions.

Table 71

Specimen	Collection requirements	Transport/Storage conditions			
		+16 / +26 °C (room temperature)	+2° / +8°C*	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
Native stool	collected without preservatives	≤ 24 hours	≤ 48 hours	≤ 1 month	> 1 month

ELITE InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface (GUI) of ELITE InGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational modes are available: complete run (Extract + PCR) or PCR Only.

Before analysis

1. Switch on ELITE InGenius. Log in with username and password. Select the mode " CLOSED ".	2. Verify controls: Positive Control and Negative Control in the "Controls" menu. Note: Both must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the PCR Mix and the CTRCPE tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.
---	--	--

Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL"	3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay Protocol" of interest: C.diff ELiTe_ST_200_100	5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Extraction Tube	6. Load the PCR Mix and the Internal Control in the Inventory Block
7. Load: PCR Cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

NOTE

If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user's manual for procedure.

Procedure 2: PCR Only (e.g., eluates, controls)

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL"	3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay Protocol" of interest: C. diff ELiTe_ST_200_100 or C. diff ELiTe_PC or C. diff ELiTe_NC	5. Select the method "PCR Only" and the sample position "Elution Tube"	6. Load the PCR Mix in the Inventory Block
7. Load: PCR Cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

ELiTe BeGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface (GUI) of ELiTe BeGenius software to setup the run. All the steps, extraction, Real-Time PCR and result interpretation, are automatically performed. Two operational modes are available: complete run (Extract + PCR) or PCR Only.

Before analysis

1. Switch on ELiTe BeGenius. Log in with username and password. Select the mode " CLOSED ".	2. Verify controls: Positive Control and Negative Control in the "Controls" menu. Note: Both must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the PCR Mix and the CTRCPE tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.
--	---	---

Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extract + PCR»	2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the Cooler Unit. The barcode scan is already active	3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"
4. Select the "Assay Protocol" of interest: C.diff ELiTe_Be_ST_200_100 Note: If a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4	5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load the PCR Mix and the Internal Control in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
7. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette" and the "Extraction Basket" with the "ELiTe InGenius SP 200" extraction cartridges and the required extraction consumables	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

NOTE

If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user's manual for procedure.

Procedure 2: PCR Only (e.g., eluates, controls)

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «PCR Only»	2. Load the extracted nucleic acid or controls barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	3. For Controls: for each "Position" enter the "Reagent name" and the "S/N" (serial number), the "Lot No." (lot number), the "Exp.Date" (expiry date) and the "T/R" (number of reactions). For eluates: for each "Position" enter the "Sample ID", the "Sample matrix", the "Extraction kit" and the "Extracted eluate vol." (eluate volume).
4. Select the "Assay Protocol" of interest: C.diff ELITE_Be_ST_200_100 or C.diff ELITE_Be_PC or C.diff ELITE_Be_NC	5. Load the PCR-Mix in the Reagent/ Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette"
7. Close the door. Start the run	8. View, approve and store the results	



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