

AVVERTENZA del 01/09/2025

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«MDR/MTB ELITe MGB Kit» Ref. RTS120ING

Questa nuova revisione dell'IFU contiene la seguente modifica:

- *Test aggiuntivo sui campioni negativi di sputum*
- *Verifica dell'efficacia nel rilevamento di nuove mutazioni identificate nei geni *rpoB* e *katG*, associate rispettivamente alla resistenza alla Rifampicina e all'Isoniazide, in campioni di *Mycobacterium tuberculosis*.*
- *I messaggi relativi al risultato della rilevazione di MTB complex e dell'analisi della resistenza agli antibiotici di MTB sono stati allineati agli output della versione corrente dell'assay protocol.*

Composizione, utilizzo e prestazioni del prodotto restano del tutto invariate.

NOTA BENE



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



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



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



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



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



DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS



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

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

MDR/MTB ELITe MGB[®] Kit

reagente per l'amplificazione real time del DNA

REF RTS120ING



IVD



INDICE

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 2
MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE RICHiesto NON INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
ALTRI PRODOTTI RICHiesti	pag. 3
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 4
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 5
PROCEDURA	pag. 7
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 15
BIBLIOGRAFIA	pag. 27
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 28
RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	pag. 29
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 30
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 31

USO PREVISTO

Il prodotto «**MDR/MTB ELITe MGB[®] Kit**» è parte di un saggio qualitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la rilevazione del DNA del *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*) e per l'identificazione delle principali mutazioni associate alla resistenza alla Rifampicina e/o Isoniazide.

Il saggio deve essere eseguito con il sistema ELITe InGenius[®] partendo da campioni di espettorato, bronco aspirati (BA), lavaggi bronco alveolari (BAL), urine, liquidi cavitari, biopsie e aspirati gastrici precedentemente fluidificati, decontaminati e inattivati.

Il prodotto può essere impiegato per due diverse finalità:

- come un aiuto nella diagnosi della tubercolosi da *Mycobacterium tuberculosis* complex, in associazione con i dati clinici del paziente e ai risultati di altri esami di laboratorio, in particolare i metodi di coltura per micobatterio,
- come un aiuto nella diagnosi della tubercolosi e della resistenza genotipica del *Mycobacterium tuberculosis* complex, in associazione con i dati clinici del paziente e ai risultati di altri esami di laboratorio, in particolare test fenotipici per la suscettibilità agli antimicrobici.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio consiste in una reazione di amplificazione real time multiplex eseguita in associazione a **ELITe InGenius®**, un sistema integrato e automatizzato di estrazione, amplificazione, rilevazione e interpretazione dei risultati.

Ai fini della rilevazione della tubercolosi e dell'identificazione della resistenza genotipica dell'MTB complex, a partire dal DNA estratto da ciascun campione in esame, nella stessa sessione analitica si eseguono due reazioni di amplificazione utilizzando la TB1 PCR Mix e la TB2 PCR Mix in due PCR Cassette.

La provetta **TB1 PCR Mix** amplifica i seguenti target:

- una regione della sequenza ripetuta IS6110, rilevata mediante una sonda specifica (Canale MTB), per l'identificazione dell'MTB complex,
- la regione hot spot di 81 bp del gene rpoB, rilevata mediante tre sonde specifiche (Canali rpoB2, rpoB3, rpoB4), per l'identificazione della resistenza genotipica alla Rifampicina.

La provetta **TB2 PCR Mix** amplifica i seguenti target:

- la regione hot spot di 81 bp del gene rpoB, rilevata mediante una sonda specifica (Canale rpoB1), per l'identificazione della resistenza genotipica alla Rifampicina,
- la regione del codone 315 del gene katG, rilevata mediante una sonda specifica (Canale katG), per l'identificazione della resistenza genotipica all'Isoniazide,
- la regione -15 / -8 del promotore del gene inhA, rilevata mediante una sonda specifica (Canale inhA), per l'identificazione della resistenza genotipica all'Isoniazide.

Inoltre, nella TB1 PCR Mix e nella TB2 PCR Mix è amplificato il Controllo Interno esogeno. Il Controllo Interno è basato su una sequenza artificiale (IC2) ed è rilevato mediante una sonda specifica (Canale IC).

Le sonde con tecnologia ELITe MGB® sono attivate quando ibridano con il prodotto specifico della reazione di amplificazione. L'emissione della fluorescenza viene misurata e registrata dall'apparecchio. Alla fine del ciclo di amplificazione, lo strumento ELITe InGenius analizza automaticamente:

- le curve di fluorescenza allo scopo di calcolare i "cicli soglia" (Ct) per la rilevazione dell'MTB complex,
- le curve di dissociazione allo scopo di calcolare le temperature di fusione (Tm) che permettono di identificare la presenza dei geni target normali e/o mutati (rpoB, katG e inhA).

Il saggio è stato validato con il sistema **ELITe InGenius** partendo da campioni di espettorato, lavaggi bronco alveolari (BAL), bronco aspirati (BA), urine, liquidi cavitari, biopsie e aspirati gastrici precedentemente fluidificati, decontaminati e inattivati.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto «**MDR/MTB ELITe MGB® Kit**» fornisce due miscele complete di reazione per l'amplificazione real time, TB1 PCR Mix e TB2 PCR Mix. **pronte per l'uso e pre-aliquotate in quattro provette** per ogni PCR Mix. Ogni provetta contiene **280 µL** di soluzione, che consentono di effettuare **12 test** in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 campioni per sessione) in associazione allo strumento **ELITe InGenius**.

La miscela **TB1 PCR Mix** contiene i primer e le sonde specifici per:

- la sequenza ripetuta **IS6110** dell'MTB complex. La sonda (MTB) è marcata con il fluoroforo FAM, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente,
- la regione hot-spot di 81 bp del gene **rpoB**. Le sonde (rpoB2, rpoB3 e rpoB4) sono marcate con i fluorofori AP639, AP525 e AP593, rispettivamente, stabilizzate dal gruppo MGB® e inattivate da un quencher non fluorescente,
- la sequenza artificiale **IC2** del Controllo Interno. La sonda (IC) è marcata con il fluoroforo AP680, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente.

La miscela **TB2 PCR Mix** contiene i primer e la sonda specifici per:

- la regione hot-spot di 81 bp del gene **rpoB**. La sonda (rpoB1) è marcata con il fluoroforo AP639, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente,
- la regione del codone 315 del gene **katG**. La sonda (katG) è marcata con il fluoroforo FAM, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente,
- la regione -15 / -8 del promotore del gene **inhA**. La sonda (inhA) è marcata con il fluoroforo AP593, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente,
- la sequenza artificiale **IC2** del Controllo Interno. La sonda (IC) è marcata con il fluoroforo AP680, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente.

Le miscele TB1 PCR Mix e TB2 PCR Mix contengono inoltre buffer, magnesio cloruro, nucleosidi trifosfati, stabilizzatori e l'enzima DNA polimerasi con attivazione termica (hot start).

Il prodotto consente di effettuare **48 test in associazione con ELITe InGenius**, inclusi i controlli.

MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
TB1 PCR Mix	Miscela di reazione completa Tappo ROSSO	4 x 280 µL	-
TB2 PCR Mix	Miscela di reazione completa Tappo BIANCO	4 x 280 µL	-

MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO

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

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

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

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione degli acidi nucleici, dell'amplificazione real time e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare sono richiesti lo strumento «**ELITe InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT030) e i seguenti Assay Protocol specifici (ELITechGroup S.p.A.).

parametri per il controllo positivo di amplificazione «**MDR-MTB ELITe_PC**»,

- parametri per il controllo negativo di amplificazione «**MDR-MTB ELITe_NC**»,
- parametri per i campioni in analisi «**MDR-MTB ELITe_SP_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_BAL_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_U_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_CL_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_B_200_100**», «**MDR-MTB ELITe_GA_200_100**».

Con lo strumento «**ELITe InGenius®**» sono inoltre richiesti i seguenti prodotti generici:

- cartucce di estrazione «**ELITe InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., cod. INT032SP200),
- materiali di consumo per estrazione ed amplificazione «**ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A, cod. INT032CS),
- cartucce di amplificazione «**ELITe InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A, cod. INT035PCR),
- puntali «**300 µL Filter tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, cod. TF-350-L-R-S),
- raccoglitori «**ELITe InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A, cod. F2102-000).

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

Come controllo positivo di amplificazione, è richiesto il prodotto specifico «**MDR/MTB - ELITe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., cod. CTR120ING), una soluzione stabilizzata contenente DNA plasmidici.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

Avvertenze e precauzioni generali

I campioni clinici di pazienti con sospetta tubercolosi devono essere manipolati nel rispetto delle disposizioni statali o locali vigenti in materia di sicurezza (ambiente di lavoro e addestramento del personale).

I campioni clinici di pazienti con sospetta tubercolosi devono essere e inattivati prima di utilizzarli in associazione all'ELITe InGenius.

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 il materiale che viene a contatto con i campioni biologici in autoclave a 121 °C per un'ora prima di smaltirlo.

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.

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.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

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

I campioni devono essere adatti e possibilmente dedicati a questo tipo di analisi. I campioni devono essere manipolati sotto una cappa a flusso laminare. Le pipette utilizzate per manipolare i campioni devono essere dedicate solo a questo uso. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, esenti da DNasi ed RNasi, esenti da DNA ed RNA.

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

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Le miscele **TB1 PCR Mix** e **TB2 PCR Mix** devono essere conservate al buio a -20 °C.

Le miscele **TB1 PCR Mix** e **TB2 PCR Mix** possono essere congelate e scongelate per un massimo di **sette volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

Espettorato (Sputum)

Prelevare e identificare i campioni di Espettorato destinati all'estrazione del DNA secondo le linee guida del laboratorio di micobatteriologia, trasportarli e conservarli a +2 / +8 °C per un massimo di due giorni. Fluidificare i campioni con una soluzione di N-Acetil L-Cisteina e decontaminarli con una soluzione di idrossido di sodio (Mycobacteriology Laboratory Manual, Global Laboratory Initiative). Una volta fluidificato e decontaminato, inattivare il campione a 95 °C per 30 minuti. Per effettuare l'analisi con questo prodotto è necessario trasferire 0,2 mL di campione inattivato nel **Extraction tube** fornito con «**ELITE InGenius SP 200 Consumable Set**».

I campioni di Espettorato fluidificati e decontaminati possono essere conservati a -20 °C per un massimo di un mese o a -70 °C per periodi più lunghi. Evitare di sottoporre i campioni a cicli di congelamento / scongelamento.

Nota bene: per eseguire l'estrazione del DNA dai campioni di Espettorato con lo strumento **ELITE InGenius** e l'**ELITE InGenius Software** versione **1.3** (o successive), utilizzare il protocollo di estrazione **MDR-MTB ELITE_SP_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** ed eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Lavaggi bronco alveolari (BAL), bronco aspirati (BA)

Prelevare e identificare i campioni di BAL / BA destinati all'estrazione del DNA secondo le linee guida del laboratorio di micobatteriologia, trasportarli e conservarli a +2 / +8 °C per un massimo di due giorni. Fluidificare i campioni con una soluzione di N-Acetil L-Cisteina e decontaminarli con una soluzione di idrossido di sodio (Mycobacteriology Laboratory Manual, Global Laboratory Initiative). Una volta fluidificato e decontaminato, inattivare il campione a 95 °C per 30 minuti. Per effettuare l'analisi con questo prodotto è necessario trasferire 0,2 mL di campione inattivato nel **Extraction tube** fornito con «**ELITE InGenius SP 200 Consumable Set**».

I campioni di BAL / BA fluidificati e decontaminati possono essere conservati a -20 °C per un massimo di un mese o a -70 °C per periodi più lunghi. Evitare di sottoporre i campioni a cicli di congelamento / scongelamento.

Nota bene: per eseguire l'estrazione del DNA dai campioni di BAL / BA con lo strumento **ELITE InGenius** e l'**ELITE InGenius Software** versione **1.3** (o successive), utilizzare il protocollo di estrazione **MDR-MTB ELITE_BAL_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** ed eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Urine

Prelevare e identificare i campioni di urine destinati all'estrazione del DNA secondo le linee guida del laboratorio di micobatteriologia, trasportarli e conservarli a +2 / +8 °C per un massimo di due giorni. Concentrare e decontaminare i campioni con una soluzione di idrossido di sodio (Mycobacteriology Laboratory Manual, Global Laboratory Initiative). Una volta concentrato e decontaminato, inattivare il campione a 95 °C per 30 minuti. Per effettuare l'analisi con questo prodotto è necessario trasferire 0,2 mL di campione inattivato nel **Extraction tube** fornito con «**ELITE InGenius SP 200 Consumable Set**».

I campioni di urine concentrati e decontaminati possono essere conservati a -20 °C per un massimo di un mese o a -70 °C per periodi più lunghi. Evitare di sottoporre i campioni a cicli di congelamento / scongelamento.

Nota bene: per eseguire l'estrazione del DNA dai campioni di urine con lo strumento **ELITE InGenius** e l'**ELITE InGenius Software** versione **1.3** (o successive), utilizzare il protocollo di estrazione **MDR-MTB ELITE_U_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** ed eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Liquidi cavitari

Prelevare e identificare i campioni di liquidi cavitari destinati all'estrazione del DNA secondo le linee guida del laboratorio di micobatteriologia, trasportarli e conservarli a +2 / +8 °C per un massimo di due giorni. Concentrare e decontaminare i campioni con una soluzione di idrossido di sodio (Mycobacteriology Laboratory Manual, Global Laboratory Initiative). Una volta concentrato e decontaminato, inattivare il campione a 95 °C per 30 minuti. Per effettuare l'analisi con questo prodotto è necessario trasferire 0,2 mL di campione inattivato nel **Extraction tube** fornito con «**ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**».

I campioni di liquidi cavitari concentrati e decontaminati possono essere conservati a -20 °C per un massimo di un mese o a -70 °C per periodi più lunghi. Evitare di sottoporre i campioni a cicli di congelamento / scongelamento.

Nota bene: per eseguire l'estrazione del DNA dai campioni di liquidi cavitari con lo strumento **ELITe InGenius** e l'**ELITe InGenius Software** versione **1.3** (o successive), utilizzare il protocollo di estrazione **MDR-MTB ELITe_CL_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** ed eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Biopsie

Prelevare e identificare i campioni di biopsie destinati all'estrazione del DNA secondo le linee guida del laboratorio di micobatteriologia, trasportarli e conservarli a +2 / +8 °C per un massimo di due giorni. Disgregare i campioni secondo le procedure del laboratorio e decontaminarli con una soluzione di idrossido di sodio (Mycobacteriology Laboratory Manual, Global Laboratory Initiative). Una volta decontaminato, inattivare il campione a 95 °C per 30 minuti. Per effettuare l'analisi con questo prodotto è necessario trasferire 0,2 mL di campione inattivato nel **Extraction tube** fornito con «**ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**».

I campioni di biopsie decontaminati possono essere conservati a -20 °C per un massimo di un mese o a -70 °C per periodi più lunghi. Evitare di sottoporre i campioni a cicli di congelamento / scongelamento.

Nota bene: per eseguire l'estrazione del DNA dai campioni di biopsie con lo strumento **ELITe InGenius** e l'**ELITe InGenius Software** versione **1.3** (o successive), utilizzare il protocollo di estrazione **MDR-MTB ELITe_B_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** ed eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Aspirati gastrici

Prelevare e identificare i campioni di aspirati gastrici destinati all'estrazione del DNA secondo le linee guida del laboratorio di micobatteriologia, trasportarli e conservarli a +2 / +8 °C per un massimo di due giorni. Fluidificare i campioni con una soluzione di N-Acetil L-Cisteina e decontaminarli con una soluzione di idrossido di sodio (Mycobacteriology Laboratory Manual, Global Laboratory Initiative). Una volta fluidificato e decontaminato, inattivare il campione a 95 °C per 30 minuti. Per effettuare l'analisi con questo prodotto è necessario trasferire 0,2 mL di campione inattivato nel **Extraction tube** fornito con «**ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**».

I campioni di aspirati gastrici fluidificati e decontaminati possono essere conservati a -20 °C per un massimo di un mese o a -70 °C per periodi più lunghi. Evitare di sottoporre i campioni a cicli di congelamento / scongelamento.

Nota bene: per eseguire l'estrazione del DNA dai campioni di aspirati gastrici con lo strumento **ELITe InGenius** e l'**ELITe InGenius Software** versione **1.3** (o successive), utilizzare il protocollo di estrazione **MDR-MTB ELITe_GA_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** ed eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Sostanze interferenti

I dati disponibili in merito all'inibizione causata da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo "Sostanze interferenti" nell'ambito del capitolo "Caratteristiche delle prestazioni".

Controlli di amplificazione

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

- come controllo positivo utilizzare il reagente **TB Positive Control** (non incluso in questo kit) in associazione con il protocollo **MDR-MTB ELITe_PC**,
- come controllo negativo (**TB Negative Control**) utilizzare acqua per biologia molecolare (non inclusa in questo kit) in associazione con il protocollo **MDR-MTB ELITe_NC**.

Nota bene: Il sistema **ELITE InGenius** richiede risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di amplificazione inserito nel database.

I risultati dei controlli di amplificazione, approvati e inseriti nel database, scadranno **dopo 15 giorni**. Alla data di scadenza, sarà necessario ripetere i controlli positivi e negativi in associazione con il lotto in uso del reagente di amplificazione.

Inoltre, i controlli di amplificazione devono essere ripetuti nei seguenti casi:

- quando si inizia un nuovo lotto di reagenti di amplificazione,
- quando i risultati dei controlli di qualità (vedi paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche,
- è stato effettuato un intervento di manutenzione importante sullo strumento ELITE InGenius.

Controlli di qualità

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

PROCEDURA

La procedura di utilizzo del prodotto «**MDR/MTB ELITE MGB® Kit**» con il sistema **ELITE InGenius** si compone di tre fasi:

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

Verifica che il sistema sia pronto

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

- accendere lo strumento **ELITE InGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**",
- verificare che i controlli di amplificazione (Controls, TB Positive Control, TB Negative Control) siano stati eseguiti in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto e che i risultati siano approvati e validi (Status). In assenza di risultati dei controlli di amplificazione approvati o validi, generare gli stessi come descritto nei paragrafi seguenti,
- scegliere il tipo di sessione, seguendo le istruzioni riportate dall'Interfaccia Grafica (GUI) per la preparazione della sessione e utilizzando i protocolli di estrazione forniti da ELITEchGroup S.p.A. Questi protocolli IVD sono stati specificamente validati con il prodotto ELITE MGB® Kit, lo strumento **ELITE InGenius** e la matrice indicata.

Gli Assay Protocol disponibili con il prodotto **MDR/MTB ELITE MGB® Kit** sono descritti nelle tabelle seguenti.

Assay Protocol per il prodotto MDR/MTB ELITE MGB® Kit per la rilevazione della tubercolosi e l'identificazione della resistenza genotipica dell'MTB complex			
Nome	Matrice	Rapporto unitario	Caratteristiche
MDR-MTB ELITE_SP_200_100	Espettorato	Positivo / negativo / resistenza positivo / resistenza negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione estratto: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume iniziale PCR del campione: 20 µL
MDR-MTB ELITE_BAL_200_100	BAL/BA	Positivo / negativo / resistenza positivo / resistenza negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione estratto: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume iniziale PCR del campione: 20 µL

MDR-MTB ELITe_U_200_100	Urine	Positivo / negativo / resistenza positivo / resistenza negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione estratto: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume iniziale PCR del campione: 20 µL
MDR-MTB ELITe_CL_200_100	Liquidi cavitari	Positivo / negativo / resistenza positivo / resistenza negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione estratto: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume iniziale PCR del campione: 20 µL
MDR-MTB ELITe_B_200_100	Biopsie	Positivo / negativo / resistenza positivo / resistenza negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione estratto: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume iniziale PCR del campione: 20 µL
MDR-MTB ELITe_GA_200_100	Aspirati gastrici	Positivo / negativo / resistenza positivo / resistenza negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione estratto: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume iniziale PCR del campione: 20 µL

Nota bene: Nei saggi per la rilevazione della tubercolosi e l'identificazione della resistenza genotipica dell'MTB complex è richiesta la **TB1 PCR Mix** e la **TB2 PCR Mix**.

Se l'Assay Protocol d'interesse non è presente nel sistema, contattare il Servizio Clienti di ELITechGroup S.p.A..

Impostazione della sessione

Il prodotto **MDR/MTB ELITe MGB® Kit** può essere utilizzato insieme con il sistema **ELITe InGenius** per eseguire:

- A. Corsa integrata (Extract + PCR)
- B. Corsa di amplificazione (PCR only)
- C. Corsa di amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo (PCR only)

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

Nota bene: il sistema **ELITe InGenius** può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile caricare le informazioni della sessione di lavoro. Consultare il manuale di istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

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

A. Corsa integrata

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

1. Scongela le provette contenenti la TB1 PCR Mix e la TB2 PCR Mix. Ogni provetta è sufficiente per 12 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 campioni per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota bene: Scongela le provette contenenti la TB1 PCR Mix e la TB2 PCR Mix al riparo dalla luce perché i reagenti sono fotosensibili.

2. Scongela le provette di CPE per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
4. Assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
5. Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
6. Selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio MDR-MTB ELITe_SP_200_100).
7. Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
8. Nella colonna "Sample Position" selezionare la posizione in cui caricare il campione e quindi selezionare "ExtractionTube". Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
9. Nell'"Inventory Block" selezionato caricare la TB1 PCR Mix e la TB2 PCR Mix e il CPE seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
10. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare e controllare i Rack dei puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
11. Caricare le PCR Cassette, le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200", tutti i consumabili e i campioni da estrarre, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
12. Chiudere lo sportello dello strumento.
13. Premere "Start" per avviare la corsa.

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

Nota bene: Alla fine della corsa il campione estratto rimasto nell'"Elution Tube" deve essere prelevato dallo strumento, chiuso con il tappo, identificato e può essere conservato a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimossi dallo strumento ed eliminati senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

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

B. Corsa di amplificazione

Per preparare la sessione di amplificazione partendo dagli acidi nucleici estratti, procedere come segue, come indicato dalla GUI:

1. Scongela le provette contenenti la TB1 PCR Mix e la TB2 PCR Mix. Ogni provetta è sufficiente per 12 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota bene: Scongela le provette contenenti la TB1 PCR Mix e la TB2 PCR Mix al riparo dalla luce perché i reagenti sono fotosensibili.

2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
3. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
4. Per ogni Track di interesse compilare il SID digitando o scansionando il codice a barre del campione.
5. Selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio MDR-MTB ELITe_SP_200_100).
6. Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
7. Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Nell'"Inventory Block" selezionato caricare la TB1 PCR Mix e la TB2 PCR Mix seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
9. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare e controllare i Rack dei puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
10. Caricare le PCR Cassette e i campioni di acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
11. Chiudere lo sportello dello strumento.
12. Premere "Start" per avviare la sessione.

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

Nota bene: Alla fine della corsa il campione estratto rimasto nell'"Elution Tube" deve essere prelevato dallo strumento, chiuso con il tappo e può essere conservato a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimossi dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

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

C. Corsa di amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo

Per impostare la corsa di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo, procedere come segue, come indicato dalla GUI:

1. Scongela le provette contenenti TB1 PCR Mix e la TB2 PCR Mix. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota bene: Scongela le provette contenenti le miscele TB1 PCR Mix e la TB2 PCR Mix al riparo dalla luce perché i reagenti sono fotosensibili.

2. Scongela la provetta TB Positive Control per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 2 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
3. Trasferire almeno 100 µL di acqua per biologia molecolare in una "Elution tube", in dotazione con l'ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
5. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
6. Nelle "Track" di interesse, selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay".
7. Per il controllo positivo selezionare nella colonna "Assay" MDR-MTB ELITe_PC e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di TB Positive Control.
8. Per il controllo negativo selezionare nella colonna "Assay" MDR-MTB ELITe_NC e digitare il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua per biologia molecolare.
9. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
10. Nell'"Inventory Block" selezionato caricare la TB1 PCR Mix e la TB2 PCR Mix seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
11. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare e controllare i Rack dei puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
12. Caricare le "PCR Cassette", le provette del TB Positive Control per entrambi gli Assay Protocol e le provette del TB Negative Control (acqua per biologia molecolare) per entrambi gli Assay Protocol, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
13. Chiudere lo sportello dello strumento.
14. Premere "Start" per avviare la sessione.

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

Nota bene: Alla fine della corsa il controllo positivo rimasto nell'"Elution Tube" deve essere prelevato dallo strumento, chiuso con il tappo e può essere conservato a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del controllo positivo.

Nota bene: Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimossi dallo strumento ed eliminati senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

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

Lettura e approvazione dei risultati

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

Nota bene: Il sistema **ELITE InGenius** può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile inviare i risultati approvati della sessione di lavoro al centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Rilevazione della tubercolosi e identificazione della resistenza genotipica dell'MTB complex

Il sistema **ELITE InGenius** genera i risultati con il prodotto **MDR/MTB ELITE MGB® Kit** tramite la seguente procedura:

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

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

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde per i target (MTB, rpoB1, rpoB2, rpoB3, rpoB4, katG e inhA) nelle reazioni di amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay Protocol "MDR-MTB ELITE_PC" e "MDR-MTB ELITE_NC".

I risultati dell'amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere consultati e approvati dal personale qualificato come "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni della GUI.

Nota bene: Il Controllo Positivo e il Controllo Negativo sono processati con le due PCR Mix, TB1 PCR Mix e a TB2 PCR Mix, per cui i risultati devono essere approvati per entrambe le PCR Mix. La GUI è impostata di default per mostrare i risultati associati alla TB1 PCR Mix (Controls). Facendo clic sul campo del saggio, si apre la relativa finestra ed è possibile selezionare la TB2 PCR Mix per approvare i relativi risultati dei controlli.

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

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

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

Nota bene: Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo sono analizzati insieme ai campioni da testare e il risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

B. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde dei target (MTB, rpoB1, rpoB2, rpoB3, rpoB4, katG, inhA) e dalla sonda per il controllo interno (IC) nelle reazioni di amplificazione del campione sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi nel Assay Protocol MDR-MTB ELITE_SP_200_100, MDR-MTB ELITE_BAL_200_100, MDR-MTB ELITE_U_200_100, MDR-MTB ELITE_CL_200_100, MDR-MTB ELITE_B_200_100, MDR-MTB ELITE_GA_200_100.

I risultati sono mostrati nei rapporti generati dallo strumento ("Result Display").

La corsa del campione può essere approvata quando si verificano le due condizioni riportate nella tabella sottostante.

1) Controllo positivo	Status
TB Positive Control	APPROVATO
2) Controllo negativo	Status
TB Negative Control	APPROVATO

Per ciascun campione il risultato del saggio è interpretato automaticamente dal sistema a partire dai valori di Ct (per MTB complex e IC) e di Tm (per MTB e per l'analisi delle resistenze) come stabilito dall'algoritmo dell'**ELITE InGenius software** e dai parametri dell'Assay Protocol.

La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato della rilevazione di MTB complex.

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
MTB:DNA detected Typing as follow	Il DNA dell'MTB complex è stato rilevato nel campione in quantità sufficiente per effettuare l'analisi della resistenza agli antibiotici (vedi tabella successiva).
MTB:DNA not detected or below the LoD	Il DNA dell'MTB complex non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo valido oppure la concentrazione target è inferiore al limite di rilevazione (LoD) del saggio.
Invalid - Retest Sample	Risultato del saggio non valido per problemi con il Controllo Interno (estrazione errata o carry-over di inibitori). Il test deve essere ripetuto.
Inconclusive – Retest Sample	Risultato del saggio non determinato per problemi nella rilevazione dell'MTB complex. Il test deve essere ripetuto.

La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato dell'analisi della resistenza agli antibiotici di MTB.

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
RIF:Resistance Negative	Assenza di mutazioni nella regione del gene rpoB analizzata. Il campione potrebbe essere sensibile alla Rifampicina .
RIF:Resistance Positive: Probe/s	Presenza di mutazioni nella regione del gene rpoB analizzata. Il campione potrebbe essere resistente alla Rifampicina . Le sonde che hanno rilevato le mutazioni sono indicate nei risultati.
INH:Resistance Negative	Assenza di mutazioni nelle regioni dei geni katG e inhA analizzate. Il campione potrebbe essere sensibile all'Isoniazide .
INH:Resistance Positive: Probe/s	Presenza di mutazioni nelle regioni dei geni katG e inhA analizzate. Il campione potrebbe essere resistente all'Isoniazide . Le sonde che hanno rivelato le mutazioni sono indicate nei risultati.
RIF:Typing Invalid - Retest Sample INH:Typing Invalid - Retest Sample	Risultato del saggio non valido per problemi nell'analisi della resistenza agli antibiotici. Il test deve essere ripetuto.

Quando il DNA dell'MTB complex è rilevato nel campione e si esegue l'analisi per la resistenza agli antibiotici, i messaggi relativi al risultato dell'analisi possono apparire in combinazioni differenti (es. MTB:DNA Detected. Typing as follow, RIF:Resistance Negative, INH:Resistance Positive: katG, inhA).

Occasionalmente, un campione positivo con un titolo elevato di MTB DNA può presentare IC non rilevato o IC Ct al di sopra dell'IC cut-off (34). Questo caso potrebbe portare a risultati errati nella tipizzazione della resistenza (geni bersaglio rpoB, katG, inhA) a causa di un'estrazione o un trasferimento errato degli inibitori. (vedere RISOLUZIONE DEI PROBLEMI).

Quando il volume dell'eluato è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato tramite un ciclo di amplificazione in modalità "PCR Only" diluito in acqua di grado biologico molecolare. Quando il volume dell'eluato non è sufficiente, il campione può essere diluito a partire dall'estrazione di una nuova aliquota del campione in modalità "Extract + PCR" (vedere RISOLUZIONE DEI PROBLEMI).

I campioni segnalati come "Invalid - Retest Sample" dal **software ELITE InGenius** non sono adatti all'interpretazione dei risultati. In questo caso, il DNA di controllo interno non è stato rilevato in modo efficiente a causa di problemi nella fase di amplificazione o estrazione (degradazione del DNA, perdita di DNA durante l'estrazione o trasferimento di inibitori nell'eluato), che possono causare risultati errati (vedere RISOLUZIONE DEI PROBLEMI).

Quando il volume è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato tramite un ciclo di

amplificazione in modalità "PCR Only" "as is" o diluito in acqua di grado biologico molecolare. In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota utilizzando la modalità "Extract + PCR" mode" (vedere RISOLUZIONE DEI PROBLEMI).

I campioni segnalati come "Inconclusive - Retest Sample" dal **software ELITe InGenius** non sono adatti all'interpretazione dei risultati. In questo caso, si è verificato un errore nel rilevamento del DNA del complesso MTB a causa di problemi nella fase di estrazione o amplificazione (contaminazione da inibitori nell'eluato, mix-up mix PCR), che può causare risultati errati.

I campioni segnalati come "RIF Typing Invalid - Retest Sample" (Tipizzazione RIF non valida - Ripetere il test sul campione) e "INH Typing Invalid - Retest Sample" (Tipizzazione INH non valida - Ripetere il test sul campione) dal **software ELITe InGenius** non sono adatti all'analisi della resistenza agli antibiotici. Ciò può essere dovuto a una bassa concentrazione di MTB nel campione, a una quantità insufficiente di DNA (MTB Ct > 31) per ottenere risultati corretti in modo riproducibile o a problemi nella fase di amplificazione o estrazione (degradazione del DNA, perdita di DNA durante l'estrazione o trasferimento di inibitori nell'eluato). **Tuttavia, i campioni sono positivi al DNA del complesso MTB.**

Quando il volume dell'eluato è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato tramite un ciclo di amplificazione in modalità "PCR Only" "as is" o diluito in acqua di grado biologico molecolare. In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota utilizzando la modalità "Estrazione + PCR"

Nota: quando è necessario ripetere il test, tenere presente che l'analisi verrà eseguita sia con TB1 PCR Mix che con TB2 PCR Mix e quindi il volume dell'eluato deve essere sufficiente per due reazioni (almeno 50 µL).

I campioni riportati come: "MTB DNA Not Detected or below the LoD" sono idonei all'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA del complesso MTB. In questo caso non si può escludere che il DNA del complesso MTB sia presente in una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del test (vedere CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI).

Nota: i risultati ottenuti con questo test devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e degli altri esiti dei test di laboratorio relativi al paziente, in particolare i test fenotipici di sensibilità agli antimicrobici.

I risultati delle analisi dei campioni vengono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Result Display) dal personale qualificato come "Administrator" o 'Analyst, seguendo le istruzioni della GUI. Dalla finestra "Result Display" è possibile stampare e salvare i risultati delle analisi dei campioni come "Sample Report" e "Track Report".

C. Refertazione dei risultati del campione

I risultati della sessione analitica sono memorizzati nel database e possono essere 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.

Entrambi i rapporti possono essere stampati e firmati da personale autorizzato.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Limite di rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) del prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit è stato definito in associazione con i campioni di Espettorato fluidificati, decontaminati e disattivati e con il sistema ELITe InGenius.

L'LoD è stata calcolata testando un pannello di campioni di Espettorato certificati MTB-negativi e positività con un materiale di riferimento di *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), ceppo H37Ra (ATCC), quantificato con l'amplificazione real time. Sono stati preparati nove livelli di diluizioni di MTB, da 320 CFU/mL a 1 CFU/mL. Ciascun livello di diluizione è stato testato in 12 replicati con il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

L'LoD è stato calcolato mediante analisi dei dati con regressione Probit come la concentrazione che ha una probabilità del 95% di risultare positiva. Il limite di rilevazione stimato è stato verificato mediante analisi di 20 replicati di una diluizione di MTB alla concentrazione corrispondente. Inoltre, questo valore di LoD è stato verificato anche per la matrice BAL / BA mediante analisi di 20 replicati positività con MTB alla concentrazione corrispondente. I risultati ottenuti dai test supportano la concentrazione dichiarata.

L'LoD in associazione alle matrici Liquidi Cavitari, Urine e Biopsie è stato verificato mediante analisi di 20 replicati di ogni matrice positività con MTB alla concentrazione di 20 CFU/mL.

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Limite di rilevazione con sistema ELITE InGenius			
Matrice	LoD (CFU/ml)	Intervallo di confidenza 95% (CFU/ml)	
		limite inferiore	limite superiore
Espettorato	6	4	15
BAL/BA	6	-	-
Liquidi Cavitari	20	-	-
Urine	20	-	-
Biopsie	20	-	-

Rilevazione della resistenza a rifampicina e/o isoniazide

La rilevazione della resistenza a Rifampicina e/o Isoniazide mediante il prodotto MDR/MTB ELITE MGB® Kit utilizzato in associazione con il sistema ELITE InGenius è stata valutata analizzando alcuni campioni certificati di DNA genomico da isolati di MTB complex resistenti agli antibiotici (forniti da un laboratorio esterno) e DNA plasmidici, caratterizzati dalle mutazioni riportate nella tabella sottostante.

Mutazioni nella regione hot-spot di 81 bp del gene rpoB (numerazione dei codoni di <i>E. coli</i>)
Q510L, L511P, L511R, Q513L, Q513P, M515I, D516V, D516Y, D516G, Q517P, S522L, S522P, H526L, H526Y, H526D, H526N, H526R, H526C, H526P, S531L, S531W, A532V, L533P, S531F
Mutazioni nella regione del codone 315 del gene katG
S315N, S315T, S315I, S315R
Mutazioni nella regione del promotore del gene inhA
-15T, -8A, -8C, -7A

I campioni di DNA estratto sono stati diluiti e analizzati in associazione con il sistema ELITe InGenius in modalità "PCR Only".

Tutti gli isolati testati sono risultati come positivi per MTB e sono stati correttamente tipizzati come resistenti a rifampicina e/o isoniazide dal prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

Efficienza di rilevazione (inclusività)

L'efficienza di rilevazione delle specie di micobatteri incluse nel *Mycobacterium tuberculosis* complex del prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit è stata valutata mediante analisi *in silico* di sequenze disponibili nel database EBI ENA.

Le regioni scelte per l'ibridizzazione dei primer e delle sonde fluorescenti sono state verificate rispetto all'allineamento delle sequenze dei target MTB (IS6110), *rpoB*, *katG* e *inhA*. Le regioni di ibridizzazione hanno evidenziato conservazione delle sequenze e assenza di mutazioni significative in *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*.

L'efficienza della rilevazione delle specie di micobatteri incluse nel *Mycobacterium tuberculosis* complex è stata verificata anche mediante analisi di un pannello di DNA genomici certificati di *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*.

I campioni di DNA estratti sono stati diluiti e analizzati in associazione con il sistema ELITe InGenius in modalità "PCR Only".

Tutti gli isolati testati sono stati rilevati come positivi per MTB dal prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

Marcatori potenzialmente interferenti

La potenziale cross-reattività con altri target del prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit è stata valutata mediante analisi *in silico* di sequenze disponibili nel database EBI ENA.

Le regioni scelte per l'ibridizzazione dei primer e delle sonde fluorescenti sono state verificate rispetto all'allineamento delle sequenze procariotiche, inclusi i micobatteri non tubercolari (NTM) e altri organismi che potrebbero essere presenti nei campioni clinici. Le regioni di ibridizzazione hanno evidenziato l'assenza di omologie significative e non hanno indicato potenziali interferenze.

L'assenza di cross-reattività con NTM è stata verificata anche mediante l'analisi di un pannello di DNA genomici certificati di *M. avium*, *M. gordonae*, *M. abscessus*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. chelonae*. Inoltre, è stato analizzato anche un pannello di DNA genomici certificati di altri organismi potenzialmente presenti nei campioni di espettorato: *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pneumoniae* ed *Haemophilus influenzae*.

I campioni di DNA estratto sono stati analizzati in associazione con il sistema ELITe InGenius in modalità "PCR Only".

Tutti gli isolati sono risultati negativi per MTB quando analizzati con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

Sostanze interferenti

Un pannello di sostanze potenzialmente interferenti alla massima concentrazione rilevante è stato testato con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. Le sostanze testate sono state antibiotici (Rifampicina e Isoniazide) e componenti dell'espettorato (mucina, sangue intero umano).

Le sostanze sono state aggiunte singolarmente a campioni di Espettorato MTB-negativi positivizzati con materiale di riferimento di *Mycobacterium tuberculosis* alla concentrazione di circa 2500 CFU / mL.

I campioni sono stati testati in 3 replicati con il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Sostanza	Concentrazione	Risultati corretti
Rifampicina	25 µg/ml	3/3
Isoniazide	50 µg/ml	3/3
Mucina porcina	2% p/v (20 mg/ml)	3/3
Sangue intero EDTA	5% v/v	3/3

Nessuna delle sostanze testate alla massima concentrazione rilevante ha mostrato di interferire con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

Ripetibilità

La ripetibilità dei risultati ottenuti con il prodotto MDR/MTB ELITE MGB® Kit in associazione con il sistema ELITE InGenius è stata verificata mediante analisi dei campioni MTB-positivi e MTB-negativi.

Un campione di Espettorato MTB-negativo positivizzato con il materiale di riferimento di *Mycobacterium tuberculosis* alla concentrazione di circa 2500 CFU / mL e un campione di Espettorato MTB-negativo sono stati analizzati in tre replicati in due sessioni al giorno con uno stesso lotto di prodotto (ripetibilità intra-sessione). Tre differenti lotti di prodotto sono stati analizzati in tre giorni differenti (ripetibilità inter-lotto) con lo stesso strumento e dallo stesso operatore.

I campioni sono stati elaborati su sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori di Ct del target dell'MTB complex (IS6110) e del target del Controllo Interno (IC2), come anche i valori di Tm di tutti i target del patogeno (IS6110, rpoB, katG e inhA) sono stati utilizzati per calcolare il Coefficiente di variazione percentuale (CV%) allo scopo di valutare la ripetibilità, intesa come imprecisione.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

Target	Ripetibilità intra-sessione		Ripetibilità inter-lotto	
	media Ct	CV% Ct	media Ct	CV% Ct
MTB	30,29	0,92	30,43	1,09
IC	29,11	1,91	29,89	2,54
Target	media Tm	CV% Tm	media Tm	CV% Tm
MTB	68,3	0,08	68,4	0,11
rpoB1	67,0	0,12	67,0	0,20
rpoB2	71,4	0,11	71,5	0,15
rpoB3	69,9	0,37	70,0	0,26
rpoB4	66,3	0,71	66,4	0,53
katG	70,8	0,08	70,8	0,13
inhA	67,7	0,24	67,0	0,20

La ripetibilità del prodotto MDR/MTB ELITE MGB® Kit per ciascun target ha mostrato un CV% che non ha superato il 3 %.

Riproducibilità

La riproducibilità dei risultati ottenuti con il prodotto MDR/MTB ELITE MGB® Kit in associazione con il sistema ELITE InGenius è stata verificata mediante analisi dei campioni MTB-positivi e MTB-negativi.

Un campione di Espettorato MTB-negativo positivizzato con il materiale di riferimento di *Mycobacterium tuberculosis* alla concentrazione di circa 2500 CFU / mL e un campione di Espettorato MTB-negativo sono stati analizzati in tre replicati in due sessioni al giorno. Tre differenti lotti di prodotto sono stati analizzati in tre giorni differenti, su tre strumenti differenti e da tre operatori differenti.

I campioni sono stati elaborati su sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori di Ct del target di MTB (IS6110) e del target del controllo interno (IC2), come anche i valori di Tm dei target del patogeno (IS6110, rpoB, katG e inhA) sono stati utilizzati per calcolare la percentuale dei coefficienti di variabilità (%CV) allo scopo di valutare la riproducibilità come imprecisione.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

Target	Riproducibilità	
	media Ct	CV% Ct
MTB	30,71	1,04
IC	30,88	2,39
Target	media Tm	CV% Tm
MTB	68,4	0,23
rpoB1	66,9	0,19
rpoB2	71,5	0,21
rpoB3	70,0	0,30
rpoB4	66,4	0,51
katG	70,9	0,16
inhA	67,2	0,61

La Riproducibilità del prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit per ciascun target ha mostrato un CV% che non ha superato il 3 %.

Espettorato: Sensibilità e Specificità Diagnostica

La Sensibilità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando 50 campioni clinici di espettorato MTB-positivi testati mediante coltura.

La Specificità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata utilizzando 52 campioni clinici di espettorato MTB-negativi testati mediante coltura.

I campioni di Espettorato sono stati raccolti, pretrattati (vedi "Campioni e controlli"), posti in coltura e certificati come MTB-positivi o MTB-negativi da un laboratorio esterno. I campioni sono stati quindi inattivati e testati con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

		Coltura		
		Pos.	Neg.	Totale
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	50	1	51
	Neg.	0	51	51
	Totale	50	52	102

Tutti i campioni MTB-positivi sono risultati positivi con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. In questo test, la Sensibilità Diagnostica del saggio è uguale al 100 %.

Tra i campioni MTB negativi, 52 sono risultati validi, 51 sono risultati negativi con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. Il risultato positivo discordante è stato confermato come positivo mediante un nuovo test sul campione di espettorato. In questo test, la specificità diagnostica del test è pari al 98,1%.

Inoltre, gli stessi campioni MTB-positivi e MTB-negativi sono stati testati anche mediante un altro saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD e mediante AFB Smear Microscopy.

I campioni clinici analizzati mediante un altro saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD sono risultati 50 MTB-positivi e 50 MTB-negativi come quando testati mediante coltura. La tabella sottostante riporta in sintesi il confronto dei risultati con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

		Saggio MDx CE-IVD		
		Pos.	Neg.	Totale
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	50	1	51
	Neg.	0	51	51
	Totale	50	52	102

Tutti i campioni MTB-positivi sono risultati positivi con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. In questo test, la Sensibilità Diagnostica del saggio è uguale al 100 %.

Tra i campioni MTB negativi, 52 sono risultati validi, 51 sono risultati negativi con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. Dei 52 campioni validi, 51 sono risultati negativi con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. Il risultato positivo discordante è stato confermato come positivo mediante un nuovo test sul campione di espettorato. In questi test, la specificità diagnostica del test è pari al 98,1%.

I campioni clinici testati mediante AFB Smear Microscopy sono risultati 44 MTB-positivi e 56 MTB-negativi. La tabella sottostante riporta in sintesi il confronto dei risultati con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

		AFB Smear Microscopy		
		Pos.	Neg.	Totale
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	44	7	51
	Neg.	0	51	51
	Totale	44	58	102

Tutti i campioni MTB-positivi sono risultati positivi mediante il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

Tra i campioni MTB negativi, 58 sono risultati validi, 51 sono risultati negativi con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. Sei dei 7 campioni discordanti sono stati confermati positivi da altri due metodi di riferimento (coltura e test diagnostico molecolare marcato CE-IVD). L'ultimo risultato positivo discordante è stato confermato positivo mediante un nuovo test sul solo campione di espettorato con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit.

Espettorato: Conferma di campioni positivi per MTB resistenti agli antibiotici

La Sensibilità Diagnostica del saggio per la resistenza agli antibiotici, come conferma di campioni positivi per MTB resistenti agli antibiotici, è stata valutata analizzando i seguenti campioni:

- 20 campioni clinici di espettorato positivizzati con un isolato di MTB resistente alla Rifampicina (mutazione del gene *rpoB*),
- 20 campioni clinici di espettorato positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene *katG*),
- 20 campioni clinici di espettorato positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene *inhA*).

Campioni clinici di Espettorato MTB-negativo sono stati positivizzati alla concentrazione finale di circa 5000 CFU / mL con isolati di MTB certificati da un laboratorio esterno per mutazioni in uno dei tre geni target utilizzando un saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD. I campioni sono stati testati con MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni	MTB positivi	RIF Res. (<i>rpoB</i>)	INH Res. (<i>katG</i>)	INH Res. (<i>inhA</i>)	Typing not feasible
Campioni MTB-positivi, resistenti a Rifampicina (mutazione di <i>rpoB</i>)	20	20	0	0	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di <i>katG</i>)	20	0	17	0	3
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di <i>inhA</i>)	20	0	0	18	2

Tutti i campioni sono risultati MTB-positivi.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB resistente alla Rifampicina (mutazione del gene *rpoB*) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti alla Rifampicina.

Diciassette campioni su 20 positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene *katG*) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti all'Isoniazide. Non è stato possibile tipizzare 3 campioni per via del basso segnale di MTB e sono stati quindi esclusi dall'analisi.

Diciotto campioni su 20 positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene *inhA*) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti all'Isoniazide. Non è stato possibile tipizzare 2 campioni per via del basso segnale di MTB e sono stati quindi esclusi dall'analisi.

In questi test, la Sensibilità Diagnostica del saggio per l'antibiotico-resistenza è uguale al 100%.

Espettorato: Conferma di campioni positivi per MTB sensibili agli antibiotici

La Specificità Diagnostica del saggio per la resistenza agli antibiotici, come conferma di campioni positivi per MTB sensibili agli antibiotici, è stata valutata analizzando 50 campioni clinici di Espettorato positivi per MTB sensibili agli antibiotici.

I campioni di espettorato sono stati raccolti, pretrattati (vedi "Campioni e controlli"), posti in coltura e certificati come MTB-positivi e sensibili a Rifampicina e Isoniazide da un laboratorio esterno utilizzando un test di suscettibilità agli antimicrobici. I campioni sono stati quindi inattivati e testati con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit e sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni	MTB positivi	RIF Resistance negative + INH Resistance negative	Typing not feasible
Campioni MTB-positivi, sensibili agli antibiotici	50	47	3

Tutti i campioni sono risultati MTB-positivi e 47 su 50 sono stati correttamente tipizzati come possibili sensibili a Rifampicina e a Isoniazide. Non è stato possibile tipizzare 3 campioni per via del basso segnale di MTB e sono stati quindi esclusi dall'analisi.

In questo test, la Specificità Diagnostica del saggio per la resistenza agli antibiotici è uguale al 100%.

BAL / BA: Sensibilità e Specificità Diagnostica

La Sensibilità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando 6 campioni clinici di BAL / BA MTB-positivi testati mediante coltura e 40 campioni clinici di BAL/BA positivizzati.

La Specificità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata utilizzando 40 campioni clinici di BAL / BA MTB-negativi testati mediante coltura.

I campioni di BAL / BA sono stati raccolti, pretrattati (vedi "Campioni e controlli"), posti in coltura e certificati come MTB-positivi o MTB-negativi da un laboratorio esterno. I campioni positivizzati sono stati addizionati di un isolato di MTB sensibile agli antibiotici alla concentrazione finale di circa 20 CFU / mL. I campioni sono stati quindi inattivati e testati con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

		Coltura		
		Pos.	Neg.	Totale
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	42	1	43
	Neg.	4	39	43
	Totale	46	40	86

Tra i campioni MTB-positivi o positivizzati, 42 su 46 sono risultati positivi con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. In questo test, la sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 91,3 %.

Tra i campioni MTB-negativi, 39 su 40 sono risultati negativi con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. In questo test, la specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 97,5 %.

BAL / BA: Conferma di campioni positivi per MTB resistenti agli antibiotici

La Sensibilità Diagnostica del saggio per la resistenza agli antibiotici, come conferma di campioni positivi per MTB resistenti agli antibiotici, è stata valutata analizzando i seguenti campioni:

- 2 campioni clinici di BAL / BA MTB-positivi testati mediante coltura e resistenti alla Rifampicina e all'Isoniazide
- 40 campioni clinici di BAL / BA positivizzati con un isolato di MTB resistente alla Rifampicina (mutazione del gene *rpoB*),
- 40 campioni clinici di BAL / BA positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene *katG*),
- 40 campioni clinici di BAL / BA positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene *inhA*).

Campioni clinici di BAL / BA MTB-negativi sono stati positivizzati alla concentrazione finale di circa 5000 CFU / mL con isolati di MTB certificati da un laboratorio esterno per mutazioni in uno dei tre geni target utilizzando un saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD. I campioni sono stati testati con MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni di BAL / BA	MTB positivi	RIF Res. (rpoB)	INH Res. (katG)	INH Res. (inhA)	Typing Invalid
Campioni MTB-positivi, resistenti a Rifampicina e Isoniazide	2	0	0	0	2
Campioni MTB-positivi, resistenti a Rifampicina (mutazione di rpoB)	40	40	0	0	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di katG)	40	0	40	0	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di inhA)	40	0	0	39	1

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB resistente alla Rifampicina (mutazione del gene rpoB) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti alla Rifampicina.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene katG) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti all'Isoniazide.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene inhA) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti all'Isoniazide eccetto 1 campione che non è stato possibile tipizzare per via del basso segnale di MTB ed è stato quindi escluso dall'analisi.

In questi test, la Sensibilità Diagnostica per l'antibiotico-resistenza del saggio è risultata uguale al 100 %.

BAL / BA: Conferma dell'assenza di mutazione in campioni positivi per MTB

La Specificità Diagnostica del saggio per la resistenza agli antibiotici, come corretta identificazione della sensibilità agli antibiotici per assenza di mutazione del gene correlato, è stata valutata analizzando 80 campioni clinici di BAL / BA positivizzati con un isolato di MTB portatore di una mutazione ma negativo per le altre due.

Campioni clinici di BAL / BA MTB-negativi sono stati positivizzati alla concentrazione finale di circa 5000 CFU / mL con isolati di MTB certificati da un laboratorio esterno per mutazioni in uno dei tre geni target utilizzando un saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD. I campioni sono stati testati con MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni di BAL / BA	MTB positivi	RIF Sens. (rpoB)	INH Sens. (katG)	INH Sens. (inhA)	Typing Invalid
Campioni MTB-positivi, resistenti a Rifampicina (mutazione di rpoB)	40	0	40	40	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di katG)	40	40	0	40	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di inhA)	40	39	39	0	1

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB con una mutazione del gene rpoB sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni katG e inhA.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB con una mutazione del gene katG sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni rpoB e inhA.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB con una mutazione del gene inhA sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni rpoB e katG eccetto 1 campione che non è stato possibile tipizzare per via del basso segnale di MTB ed è stato quindi escluso dall'analisi.

In questi test, la Specificità Diagnostica per l'antibiotico-resistenza del saggio è risultata uguale al 100 %.

Urine: Sensibilità e Specificità Diagnostica

La Sensibilità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando 12 campioni clinici di Urine MTB-positivi testati mediante coltura e 8 campioni clinici di Urine positivizzati.

La Specificità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata utilizzando 20 campioni clinici di Urine MTB-negativi testati mediante coltura.

I campioni di Urine sono stati raccolti, pretrattati (vedi "Campioni e controlli"), posti in coltura e certificati come MTB-positivi o MTB-negativi da un laboratorio esterno. I campioni positivizzati sono stati addizionati di un isolato di MTB sensibile agli antibiotici alla concentrazione finale di circa 20 CFU / mL. I campioni sono stati quindi inattivati e testati con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

		Coltura		
		Pos.	Neg.	Totale
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	16	0	16
	Neg.	4	20	24
	Totale	20	20	40

Tra i campioni MTB-positivi o positivizzati, 16 su 20 sono risultati positivi con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. In questo test, la Sensibilità Diagnostica del saggio è risultata uguale al 80 %.

Tra i campioni MTB-negativi, tutti sono risultati negativi con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. In questo test, la specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100 %.

Urine: Conferma di campioni positivi per MTB resistenti agli antibiotici

La Sensibilità Diagnostica del saggio per la resistenza agli antibiotici, come conferma di campioni positivi per MTB resistenti agli antibiotici, è stata valutata analizzando i seguenti campioni:

- 20 campioni clinici di urine positivizzati con un isolato di MTB resistente alla Rifampicina (mutazione del gene rpoB),
- 20 campioni clinici di urine positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene katG),
- 20 campioni clinici di urine positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene inhA).

Campioni clinici di urine MTB-negativo sono stati positivizzati alla concentrazione finale di circa 5000 CFU / mL con isolati di MTB certificati da un laboratorio esterno per mutazioni in uno dei tre geni target utilizzando un saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD. I campioni sono stati testati con MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni di Urine	MTB positivi	RIF Res. (rpoB)	INH Res. (katG)	INH Res. (inhA)	Typing Invalid
Campioni MTB-positivi, resistenti a Rifampicina (mutazione di rpoB)	20	20	0	0	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di katG)	20	0	20	0	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di inhA)	20	0	0	20	0

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB resistente alla Rifampicina (mutazione del gene rpoB) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti alla Rifampicina.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene katG) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti all'Isoniazide.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene inhA) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti all'Isoniazide.

In questi test, la Sensibilità Diagnostica per l'antibiotico-resistenza del saggio è risultata uguale al 100%.

Urine: Conferma dell'assenza di mutazione in campioni positivi per MTB

La Specificità Diagnostica del saggio per la resistenza agli antibiotici, come corretta identificazione della sensibilità agli antibiotici per assenza di mutazione del gene correlato, è stata valutata analizzando 40 campioni clinici di Urine positivizzati con un isolato di MTB portatore di una mutazione ma negativo per le altre due.

Campioni clinici di Urine MTB-negativi sono stati positivizzati alla concentrazione finale di circa 5000 CFU / mL con isolati di MTB certificati da un laboratorio esterno per mutazioni in uno dei tre geni target utilizzando un saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD. I campioni sono stati testati con MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni di Urine	MTB positivi	RIF Sens. (rpoB)	INH Sens. (katG)	INH Sens. (inhA)	Typing Invalid
Campioni MTB-positivi, resistenti a Rifampicina (mutazione di rpoB)	20	0	20	20	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di katG)	20	20	0	20	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di inhA)	20	20	20	0	0

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB con una mutazione del gene rpoB sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni katG e inhA.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB con una mutazione del gene katG sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni rpoB e inhA.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB con una mutazione del gene inhA sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni rpoB e katG eccetto 1 campione che non è stato possibile tipizzare per via del basso segnale di MTB ed è stato quindi escluso dall'analisi.

In questi test, la Specificità Diagnostica per l'antibiotico-resistenza del saggio è risultata uguale al 100 %.

Biopsie: Sensibilità e Specificità Diagnostica

La Sensibilità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando 22 campioni clinici di biopsie MTB-positivi testati mediante coltura e 20 campioni clinici di Biopsie positivizzati alla concentrazione finale di circa 20 CFU / mL con un isolato di MTB sensibile alla Rifampicina e Isoniazide.

La Specificità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata utilizzando 40 campioni clinici di Biopsie MTB-negativi testati mediante coltura.

I campioni di Biopsie sono stati raccolti, pretrattati (vedi "Campioni e controlli"), posti in coltura e certificati come MTB-positivi o MTB-negativi da un laboratorio esterno. I campioni positivizzati sono stati addizionati di un isolato di MTB sensibile agli antibiotici alla concentrazione finale di circa 20 CFU / mL. I campioni sono stati quindi inattivati e testati con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

		Coltura		
		Pos.	Neg.	Totale
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	38	0	38
	Neg.	4	40	44
	Totale	42	40	82

Tra i campioni MTB-positivi o positivizzati, 38 su 42 sono risultati positivi con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. In questo test, la sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 90,5 %.

Tra i campioni MTB-negativi, tutti sono risultati negativi con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. In questo test, la specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100 %.

Biopsie: Conferma di campioni positivi per MTB resistenti agli antibiotici

La Sensibilità Diagnostica del saggio per la resistenza agli antibiotici, come conferma di campioni positivi per MTB resistenti agli antibiotici, è stata valutata analizzando i seguenti campioni:

- 40 campioni clinici di Biopsie positivizzati con un isolato di MTB resistente alla Rifampicina (mutazione del gene rpoB),
- 40 campioni clinici di Biopsie positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene katG),
- 40 campioni clinici di Biopsie positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene inhA).

Campioni clinici di Biopsie MTB-negativo sono stati positivizzati alla concentrazione finale di circa 5000 CFU / mL con isolati di MTB certificati da un laboratorio esterno per mutazioni in uno dei tre geni target utilizzando un saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD. I campioni sono stati testati con MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni di Biopsie	MTB positivi	RIF Res. (rpoB)	INH Res. (katG)	INH Res. (inhA)	Typing Invalid
Campioni MTB-positivi, resistenti a Rifampicina (mutazione di rpoB)	40	40	0	0	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di katG)	40	0	40	0	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di inhA)	40	0	0	40	0

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB resistente alla Rifampicina (mutazione del gene rpoB) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti alla Rifampicina.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene katG) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti all'Isoniazide.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene inhA) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti all'Isoniazide.

In questi test, la Sensibilità Diagnostica per l'antibiotico-resistenza del saggio è risultata uguale al 100%.

Biopsie: Conferma dell'assenza di mutazione in campioni positivi per MTB

La Specificità Diagnostica del saggio per la resistenza agli antibiotici, come corretta identificazione della sensibilità agli antibiotici per assenza di mutazione del gene correlato, è stata valutata analizzando 80 campioni clinici di Biopsie positivizzati con un isolato di MTB portatore di una mutazione ma negativo per le altre due.

Campioni clinici di Biopsie MTB-negativi sono stati positivizzati alla concentrazione finale di circa 5000 CFU / mL con isolati di MTB certificati da un laboratorio esterno per mutazioni in uno dei tre geni target utilizzando un saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD. I campioni sono stati testati con MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni di Biopsie	MTB positivi	RIF Sens. (rpoB)	INH Sens. (katG)	INH Sens. (inhA)	Typing Invalid
Campioni MTB-positivi, resistenti a Rifampicina (mutazione di rpoB)	40	0	40	40	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di katG)	40	40	0	40	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di inhA)	40	40	40	0	0

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB con una mutazione del gene rpoB sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni katG e inhA.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB con una mutazione del gene katG sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni rpoB e inhA.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB con una mutazione del gene inhA sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni rpoB e katG eccetto 1 campione che non è stato possibile tipizzare per via del basso segnale di MTB ed è stato quindi escluso dall'analisi.

In questi test, la Specificità Diagnostica per l'antibiotico-resistenza del saggio è risultata uguale al 100 %.

Liquidi cavitari: Sensibilità e Specificità Diagnostica

La Sensibilità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando 20 campioni clinici di Liquidi cavitari MTB-positivi testati mediante coltura e 20 campioni clinici di Liquidi cavitari positivizzati.

La Specificità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata utilizzando 40 campioni clinici di Liquidi cavitari MTB-negativi testati mediante coltura.

I campioni di Liquidi cavitari sono stati raccolti, pretrattati (vedi "Campioni e controlli"), posti in coltura e certificati come MTB-positivi o MTB-negativi da un laboratorio esterno. I campioni positivizzati sono stati addizionati di un isolato di MTB sensibile agli antibiotici alla concentrazione finale di circa 20 CFU / mL. I campioni sono stati quindi inattivati e testati con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

		Coltura		
		Pos.	Neg.	Totale
MDR/MTB ELITe MGB Kit	Pos.	39	0	39
	Neg.	1	40	41
	Totale	40	40	80

Tra i campioni MTB-positivi o positivizzati, 39 su 40 sono risultati positivi con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. In questo test, la sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 97,5 %.

Tra i campioni MTB-negativi, tutti sono risultati negativi con il prodotto MDR/MTB ELITe MGB® Kit. In questo test, la specificità diagnostica del saggio è uguale al 100 %.

Liquidi cavitari: Conferma di campioni positivi per MTB resistenti agli antibiotici

La Sensibilità Diagnostica del saggio per la resistenza agli antibiotici, come conferma di campioni positivi per MTB resistenti agli antibiotici, è stata valutata analizzando i seguenti campioni:

- 40 campioni clinici di Liquidi cavitari positivizzati con un isolato di MTB resistente alla Rifampicina (mutazione del gene *rpoB*),
- 40 campioni clinici di Liquidi cavitari positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene *katG*),
- 40 campioni clinici di Liquidi cavitari positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene *inhA*).

Campioni clinici di Liquidi cavitari MTB-negativo sono stati positivizzati alla concentrazione finale di circa 5000 CFU / mL con isolati di MTB certificati da un laboratorio esterno per mutazioni in uno dei tre geni target utilizzando un saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD. I campioni sono stati testati con MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni di Liquidi Cavitari	MTB positivi	RIF Res. (<i>rpoB</i>)	INH Res. (<i>katG</i>)	INH Res. (<i>inhA</i>)	Typing Invalid
Campioni MTB-positivi, resistenti a Rifampicina (mutazione di <i>rpoB</i>)	40	40	0	0	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di <i>katG</i>)	40	0	40	0	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di <i>inhA</i>)	40	0	0	40	0

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB resistente alla Rifampicina (mutazione del gene *rpoB*) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti alla Rifampicina.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene *katG*) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti all'Isoniazide.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene *inhA*) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti all'Isoniazide.

In questi test, la Sensibilità Diagnostica del saggio per l'antibiotico-resistenza è risultata uguale al 100%.

Liquidi cavitari: Conferma dell'assenza di mutazione in campioni positivi per MTB

La Specificità Diagnostica del saggio per la resistenza agli antibiotici, come corretta identificazione della sensibilità agli antibiotici per assenza di mutazione del gene correlato, è stata valutata analizzando 80 campioni clinici di Liquidi Cavitari positivizzati con un isolato di MTB portatore di una mutazione ma negativo per le altre due.

Campioni clinici di Liquidi Cavitari MTB-negativi sono stati positivizzati alla concentrazione finale di circa 5000 CFU / mL con isolati di MTB certificati da un laboratorio esterno per mutazioni in uno dei tre geni target utilizzando un saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD. I campioni sono stati testati con MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni di Liquidi Cavitari	MTB positivi	RIF Sens. (rpoB)	INH Sens. (katG)	INH Sens. (inhA)	Typing Invalid
Campioni MTB-positivi, resistenti a Rifampicina (mutazione di rpoB)	40	0	40	40	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di katG)	40	40	0	40	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di inhA)	40	40	40	0	0

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB con una mutazione del gene rpoB sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni katG e inhA.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB con una mutazione del gene katG sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni rpoB e inhA.

Tutti i campioni positivizzati con un isolato di MTB con una mutazione del gene inhA sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni rpoB e katG eccetto 1 campione che non è stato possibile tipizzare per via del basso segnale di MTB ed è stato quindi escluso dall'analisi.

In questi test, la Specificità Diagnostica per l'antibiotico-resistenza del saggio è risultata uguale al 100 %.

Aspirati gastrici: Sensibilità e Specificità Diagnostica

La Sensibilità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando 22 campioni clinici di Aspirati gastrici MTB-positivi testati mediante coltura.

La Specificità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata utilizzando 20 campioni clinici di Aspirati gastrici MTB-negativi testati mediante coltura.

I campioni di Aspirati gastrici sono stati raccolti, pretrattati (vedi "Campioni e controlli"), posti in coltura e certificati come MTB-positivi o MTB-negativi da un laboratorio esterno. I campioni sono stati quindi inattivati e testati con il prodotto MDR/MTB ELITE MGB® Kit e il sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

		Coltura		
		Pos.	Neg.	Totale
MDR/MTB ELITE MGB Kit	Pos.	18	0	18
	Neg.	4	20	24
	Totale	22	20	42

Tra i campioni MTB-positivi, 18 su 22 sono risultati positivi con il prodotto MDR/MTB ELITE MGB® Kit. In questo test, la sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 81,8 %.

Tra i campioni MTB-negativi, tutti sono risultati negativi con il prodotto MDR/MTB ELITE MGB® Kit. In questo test, la specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100 %.

Aspirati gastrici: Conferma di campioni positivi per MTB resistenti agli antibiotici

La Sensibilità Diagnostica del saggio per la resistenza agli antibiotici, come conferma di campioni positivi per MTB resistenti agli antibiotici, è stata valutata analizzando i seguenti campioni:

- 20 campioni clinici di Aspirati gastrici positivizzati con un isolato di MTB resistente alla Rifampicina (mutazione del gene rpoB),
- 20 campioni clinici di Aspirati gastrici positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene katG),
- 20 campioni clinici di Aspirati gastrici positivizzati con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene inhA).

Campioni clinici di Aspirati gastrici MTB-negativo sono stati positivizzati alla concentrazione finale di circa 5000 CFU / mL con isolati di MTB certificati da un laboratorio esterno per mutazioni in uno dei tre geni target utilizzando un saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD. I campioni sono stati testati con MDR/MTB ELITE MGB® Kit e il sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni	MTB positivi	RIF Res. (rpoB)	INH Res. (katG)	INH Res. (inhA)	Typing Invalid
Campioni MTB-positivi, resistenti a Rifampicina (mutazione di rpoB)	20	20	0	0	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di katG)	20	0	20	0	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di inhA)	20	0	0	20	0

Tutti i campioni positivamente con un isolato di MTB resistente alla Rifampicina (mutazione del gene rpoB) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti alla Rifampicina.

Tutti i campioni positivamente con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene katG) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti all'Isoniazide.

Tutti i campioni positivamente con un isolato di MTB resistente all'Isoniazide (mutazione del gene inhA) sono stati tipizzati correttamente come possibili resistenti all'Isoniazide.

In questi test, la Sensibilità Diagnostica del saggio per l'antibiotico-resistenza è risultata uguale al 100%.

Aspirati gastrici: Conferma dell'assenza di mutazione in campioni positivi per MTB

La Specificità Diagnostica del saggio per la resistenza agli antibiotici, come corretta identificazione della sensibilità agli antibiotici per assenza di mutazione del gene correlato, è stata valutata analizzando 40 campioni clinici di Liquidi Cavitari positivamente con un isolato di MTB portatore di una mutazione ma negativo per le altre due.

Campioni clinici di Liquidi Cavitari MTB-negativi sono stati positivamente alla concentrazione finale di circa 5000 CFU / mL con isolati di MTB certificati da un laboratorio esterno per mutazioni in uno dei tre geni target utilizzando un saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD. I campioni sono stati testati con MDR/MTB ELITe MGB® Kit e il sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni di Liquidi Cavitari	MTB positivi	RIF Sens. (rpoB)	INH Sens. (katG)	INH Sens. (inhA)	Typing Invalid
Campioni MTB-positivi, resistenti a Rifampicina (mutazione di rpoB)	20	0	20	20	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di katG)	20	20	0	20	0
Campioni MTB-positivi, resistenti a Isoniazide (mutazione di inhA)	20	20	20	0	0

Tutti i campioni positivamente con un isolato di MTB con una mutazione del gene rpoB sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni katG e inhA.

Tutti i campioni positivamente con un isolato di MTB con una mutazione del gene katG sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni rpoB e inhA.

Tutti i campioni positivamente con un isolato di MTB con una mutazione del gene inhA sono stati tipizzati correttamente come non mutati per i geni rpoB e katG eccetto 1 campione che non è stato possibile tipizzare per via del basso segnale di MTB ed è stato quindi escluso dall'analisi.

In questi test, la Specificità Diagnostica per l'antibiotico-resistenza del saggio è risultata uguale al 100 %.

Nota bene: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche prestazionali del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto" di MDR/MTB ELITe MGB Kit", FTP 120ING.

BIBLIOGRAFIA

- Thierry D. et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 188
 Heep M. et al. (2001) JCM 39: 107 – 110
 Seifert M. et al. (2015) PLOS ONE DOI 10.1371: 1 - 13
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35: e30
 Mycobacteriology laboratory manual (Global Laboratory Initiative, Prima edizione, aprile 2014).

LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con campioni clinici di espettorato, lavaggi bronco alveolari (BAL), bronco aspirati (BA), urine, liquidi cavitari, biopsie e aspirati gastrici fluidificati, decontaminati e inattivati.

Non utilizzare questo prodotto con campioni contenenti mucina in concentrazione superiore al 2%: la mucina inibisce la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e può causare risultati non validi.

Al momento, non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con i seguenti campioni clinici: liquor cerebrospinale (CSF), materiali necrotico-purulenti, feci, sangue.

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

La metodica di amplificazione real time utilizzata in questo prodotto ha un'elevata sensibilità analitica che la rende soggetta a cross-contaminazioni da parte di campioni clinici positivi, di controlli positivi e degli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le cross-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.

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il DNA target non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione, tuttavia non si può escludere che il DNA target abbia un titolo più basso del limite di rilevazione del prodotto (vedi "Caratteristiche delle prestazioni"). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi a causa di problemi con il 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.

I risultati ottenuti con questo prodotto sulla possibile resistenza a Rifampicina e/o a Isoniazide di MTB sono limitati alla rilevazione delle principali mutazioni come indicato nella sezione "Principio del saggio". Altre mutazioni non rilevate da questo prodotto possono essere associate a resistenza a Rifampicina e/o a Isoniazide. D'altra parte, questo prodotto può rilevare mutazioni silenziose che non sono associate a resistenza a Rifampicina e/o a Isoniazide. Un test fenotipico di suscettibilità agli antimicrobici è perciò richiesto per confermare la suscettibilità a Rifampicina e/o a Isoniazide.

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

Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e di altri esami di laboratorio eseguiti sul paziente.

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.

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Reazione non valida per il Controllo Positivo	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella preparazione della sessione.	Controllare la posizione delle PCR Mix e del controllo positivo. Controllare i volumi delle PCR Mix e del controllo positivo.
Degradazione del controllo positivo.	Utilizzare una nuova aliquota di controllo positivo.
Degradazione dei PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota delle PCR Mix.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.
Reazione del Controllo Negativo non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella preparazione della sessione.	Controllare la posizione delle PCR Mix e del controllo negativo. Controllare i volumi delle PCR Mix e del controllo negativo.
Contaminazione del controllo negativo	Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione delle PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota delle PCR Mix.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack e degli inventory block.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.
Reazione del Campione non valida	
Risultati inconclusivi / Tipizzazione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella preparazione della sessione.	Controllare la posizione delle PCR Mix e del campione. Controllare i volumi delle PCR Mix e del campione.
Degradazione del controllo interno.	Utilizzare nuove aliquote di controllo interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere l'amplificazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR only". Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione in una sessione in modalità "Extract + PCR".
Degradazione delle PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota delle PCR Mix.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.
DNA MTB rilevato con IC non rilevato o IC Ct superiore al valore di IC cut off	
Possibili cause	Soluzioni
Possibile inibizione nel campione.	Ripetere l'amplificazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR only". Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare di una nuova aliquota del campione.

Errore 30103	
Possibili cause	Soluzioni
Concentrazione troppo elevata del target nel campione.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa: - selezionare il track relativo al campione e approvare manualmente il risultato. Se è richiesto un valore di Ct: - ripetere l'amplificazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR only" oppure - ripetere l'estrazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione primario in una sessione in modalità "Extract + PCR".

LEGENDA DEI SIMBOLI



Numero di catalogo.



Limite superiore di temperatura.



Codice del lotto.



Da utilizzarsi entro (ultimo giorno del mese).



Dispositivo medico diagnostico *in vitro*.



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



Contenuto sufficiente per "N" test.



Consultare le istruzioni per l'uso.



Contenuto.



Conservare al riparo dalla luce del sole.



Fabbricante.

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.

Una "Sintesi della Sicurezza e delle Prestazioni" (Summary of Safety and Performance) sarà resa disponibile al pubblico attraverso la Banca Dati Europea sui Dispositivi Medici (Eudamed) quando questo sistema informatico sarà operativo. Prima della pubblicazione dell'avviso di piena funzionalità di Eudamed, il "Summary of Safety and Performance" sarà resa disponibile al pubblico su richiesta via e-mail all'indirizzo emd.support@elitechgroup.com, senza indebito ritardo.

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

Questo prodotto contiene reagenti prodotti da Life Technologies Corporation e sono venduti in base al contratto di licenza tra ELITechGroup S.p.A. e suoi affiliati e Life Technologies Corporation. Il prezzo di acquisto di questo prodotto include i diritti - limitati e non trasferibili - di utilizzare solo questa quantità di prodotto, unicamente per attività dell'acquirente che siano direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sull'acquisto di una licenza per questo prodotto per scopi diversi da quelli definiti sopra, contattare il Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Val Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefono: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. Email: outlicensing@thermofisher.com.

I reagenti di rilevazione ELITe® MGB sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. numero 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 e da brevetti EP numero 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161. Sono state presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

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

MDR/MTB ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius®

Ref: RTS120ING



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

A. Intended use

The «MDR/MTB ELITE MGB® Kit» is part of a qualitative nucleic acid amplification assay to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*) DNA and to identify the main mutations associated with resistance to Rifampicin and/or Isoniazid.

The product may be used for two different purposes:

- as an aid in the diagnosis of tuberculosis from *Mycobacterium tuberculosis* complex, in association with the patient's clinical data and other laboratory test results, in particular the culture methods for mycobacterium,
- as an aid in the diagnosis of tuberculosis and genotypic resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex, in association with the patient's clinical data and other laboratory test results, in particular phenotypic testing for antimicrobial susceptibility.

The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius®**.

B. Amplified sequence

Mix	Target	Gene	Fluorophore
TB1	MTB Complex	IS6110	FAM
	Rifampicin resistance	rpoB gene (rpoB2, rpoB3, rpoB4)	AP639; AP525; AP593
TB2	Rifampicin resistance	rpoB gene (rpoB1)	AP639
	Isoniazid resistance	katG	FAM
		inhA	AP593
TB1/TB2	Internal Control	Artificial sequence	AP680

C. Validated matrix

- › Sputum, bronchial aspirates (BA), bronchoalveolar lavages (BAL), urine, biopsies, cavity fluids and gastric aspirates previously liquefied, decontaminated and inactivated.

D. Kit content

TB1 PCR Mix	TB2 PCR Mix
Ready-to-use PCR Master Mix 4 tubes of 280 µL 7 freeze-thaw cycles per tube	Ready-to-use PCR master Mix 4 tubes of 280 µL 7 freeze-thaw cycles per tube
	
› 48 reactions per kit	› Storage Temperature: -20°C
	› Maximum shelf-life: 24 months

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|---|---|
| › ELITE InGenius instrument: INT030 | › MDR/MTB- ELITE Positive Control : CTR120ING |
| › ELITE InGenius SP 200 extraction cartridges: INT032SP200 | › CPE- Internal Control : CTCPE |
| › ELITE InGenius PCR Cassette amplification cartridges: INT035PCR | › ELITE InGenius Waste Box: F2102-000 |
| › ELITE InGenius SP 200 Consumable Set consumables for extraction: INT032CS | › 300 µL Filter Tips Axygen: TF-350-L-R-S |

F. ELITE InGenius protocol

- | | | | |
|--|--------|------------------------------|---------|
| › Sample volume | 200 µL | › Unit of qualitative result | CFU/mL |
| › Internal Control volume | 10 µL | | |
| › Total eluate volume | 100 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › PCR eluate input volume for each mix | 20 µL | | |
| › Q-PCR Mix volume for each mix | 20 µL | | |

G. Performance

Sample	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MTB Complex	Sputum	6 CFU/mL	100% 50/50*	98.1% 51/52*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Sputum	-	100% 55/55*	100% 47/47*
MTB Complex	BAL/BA	6 CFU/mL	91.3% 42/46*	97.5% 39/40*
Rifampicin and Isoniazid resistance	BAL/BA	-	100% 119/119*	100% 119/119*
MTB Complex	Urine	20 CFU/mL	80% 16/20*	100% 20/20*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Urine	-	100% 60/60*	100% 60/60*
MTB Complex	Biopsy	20 CFU/mL	90.5% 38/42*	100% 40/40*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Biopsy	-	100% 120/120*	100% 120/120*
MTB Complex	Cavitary Liquid	20 CFU/mL	97.5% 39/40*	100% 40/40*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Cavitary Liquid	-	100% 120/120*	100% 120/120*
MTB Complex	Gastric aspirates	20 CFU/mL	81.8% 18/22*	100% 20/20*
Rifampicin and Isoniazid resistance	Gastric aspirates	-	100% 60/60*	100% 60/60*

*confirmed samples/ tested samples

H. Procedures

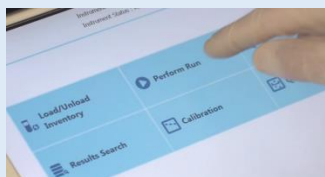
The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

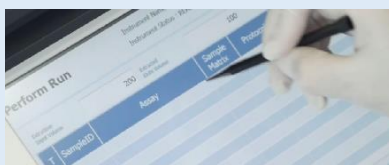
1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify controls: TB pos. and neg. controls in the "Control menu" NB: Both have been run, approved and not expired	3. Thaw TB1 and TB2 PCR Mixes and the Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec
---	--	---

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen



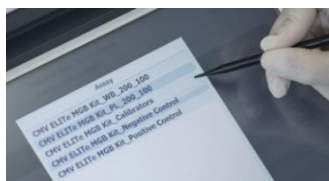
2. Verify the extraction volumes:
Input: "200 µL", eluate: "100 µL"



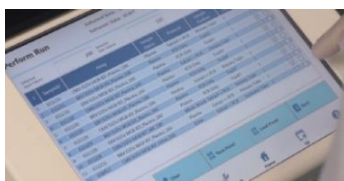
3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID



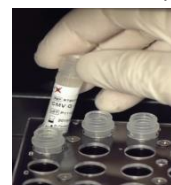
4. Select the "Assay protocol" of interest



5. Select the sample position:
"Extraction tube"



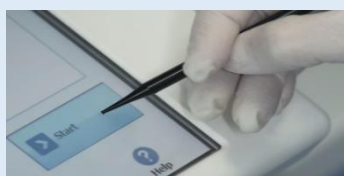
6. Load the PCR Mixes and the Internal Control in the inventory block



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



8. Close the door
Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

- 1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"

6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4

7. Load the PCR cassette rack
Load the PCR Mixes in the inventory block

8. Close the door
Start the run

9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

- 1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Extraction tube

6. Load the Internal Control in the inventory block

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

8. Close the door
Start the run

9. Archive the eluate sample

**confirmed samples/ tested samples*