

Instructions for use

MTB EXTRA ELITe MGB® Kit

reagenti per la Real-Time PCR del DNA



REF RTS121ING

UDI 08033891487263



IVD

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Rev.	Notice of change	Date (dd/mm/yy)
03	Test aggiuntivo sui campioni negativi di sputum	02/09/25
02	Espansione dell'uso del prodotto in associazione con lo strumento ELiTe BeGenius® e le matrici lavaggi broncoalveolari/ bronco aspirati, Urine, Liquidi cavitari, Biopsie e aspirati gastrici. Nuovo formato grafico e nuova impostazione dei contenuti dell'IFU	29/11/24
01	Espansione dell'uso del prodotto in associazione con lo strumento ELiTe BeGenius® e la matrice Sputum.	22/02/24
00	Nuovo sviluppo di prodotto	—

NOTA

La revisione di questa IFU è compatibile anche con la versione precedente del kit

TABLE OF CONTENT

1 USO PREVISTO	4
2 PRINCIPIO DEL SAGGIO.....	4
3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	4
4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	4
5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO	5
6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	5
7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI	6
8 CAMPIONI E CONTROLLI	8
9 PROCEDURA ELITe InGenius.....	10
10 PROCEDURA ELITe BeGenius	15
11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	19
12 BIBLIOGRAFIA	24
13 LIMITI DELLA PROCEDURA	25
14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	26
15 LEGENDA DEI SIMBOLI	28
16 AVVISO PER L'UTILIZZATORE	29
17 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA.....	29
Appendix A QUICK START GUIDE.....	30

1 USO PREVISTO

Il prodotto **MTB EXTRA ELITE MGB® Kit** è un dispositivo medico diagnostico in vitro destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come test di real-time PCR qualitativa per la rilevazione del DNA del *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*).

Il saggio è validato in associazione agli strumenti **ELITE InGenius®** ed **ELITE BeGenius®**, sistemi integrati e automatizzati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, a partire da campioni umani di espettorato, bronco aspirati (BA), lavaggi bronco alveolari (BAL), urine, liquidi cavitari, biopsie e aspirati gastrici precedentemente fluidificati, decontaminati e inattivati.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi dell'infezione da *Mycobacterium tuberculosis* complex, insieme a tutte le osservazioni cliniche rilevanti e agli esiti degli esami di laboratorio, in particolare i metodi di coltura per *Mycobacterium*.

2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è una Real-Time PCR qualitativa multiplex per la rilevazione del DNA del *Mycobacterium tuberculosis* complex isolato dai campioni e amplificato utilizzando il reagente **MTB EXTRA PCR Mix** che contiene primers e sonde con tecnologia ELITE MGB.

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

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

3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **MTB EXTRA ELITE MGB Kit** fornisce il reagente di saggio **MTB EXTRA PCR Mix**,

una miscela ottimizzata e stabilizzata di oligonucleotidi e reagenti per PCR che contiene i primers e le sonde specifici per:

- la sequenza ripetuta **IS6110** dell'MTB complex, rilevata nel canale **MTB**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher® e marcata con il fluoroforo FAM,
- la sequenza artificiale **IC2** del Controllo Interno IC, rilevato nel canale IC; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher e marcata con il fluoroforo AquaPhluor 680 (AP680).

MTB EXTRA PCR Mix contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfato e la DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

Il prodotto **MTB EXTRA ELITE MGB Kit** consente di effettuare **96 test** in associazione con **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius**, utilizzando 20 µL per reazione.

Il prodotto **MTB EXTRA ELITE MGB Kit** può essere anche utilizzato in associazione con strumenti equivalenti.

4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Tabella 1

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
MTB EXTRA PCR Mix cod. RTS121ING	Miscela di reagenti per la Real-Time PCR in provetta con Tappo ROSSO	8 x 280 µL	

5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

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

6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

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

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

Tabella 2

Strumenti e Software	Prodotti e Reagenti
<p>ELiTe InGenius (ELiTechGroup S.p.A., EG SpA, cod. INT030).</p> <p>ELiTe InGenius Software versione 1.3.0.19 (o successiva).</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_PC, Assay Protocol (Protocollo di Saggio) con i parametri per il test del Controllo Positivo.</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_NC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo.</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_SP_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di espettorato.</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_BAL_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di lavaggi bronco alveolari (BAL) e bronco aspirati (BA).</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_U_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di urine.</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_CL_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di liquidi cavitari.</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_B_200_100 Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di biopsie.</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_GA_200_100 Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di aspirati gastrici.</p>	<p>MDR/MTB - ELiTe Positive Control (EG SpA, cod. CTR120ING)</p> <p>ELiTe InGenius SP 200 (EG SpA, cod. INT032SP200).</p> <p>Materiali di consumo per ELiTe InGenius ed ELiTe BeGenius (vedere i Manuali di Istruzioni per l'uso di ELiTe InGenius ed ELiTe BeGenius)</p>
<p>ELiTe BeGenius (ELiTechGroup S.p.A., EG SpA, cod. INT040).</p> <p>ELiTe InGenius Software versione 2.3.0 (o successiva).</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_Be_PC, Assay Protocol con i parametri per il test del Controllo Positivo.</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_Be_NC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo.</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_Be_SP_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di espettorato.</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_Be_BAL_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di lavaggi bronco alveolari (BAL) e bronco aspirati (BA).</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_Be_U_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di urine.</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_Be_CL_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di liquidi cavitari.</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_Be_B_200_100 Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di biopsie.</p> <p>MTB EXTRA ELiTe_Be_GA_200_100 Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di aspirati gastrici.</p>	

7 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 gestiti secondo le normative di sicurezza statali o locali (ambiente di lavoro e formazione del personale).

I campioni clinici di pazienti con sospetta tubercolosi devono essere inattivati prima dell'utilizzo in associazione a ELiTe InGenius ed ELiTe BeGenius.

Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare provette, puntali, e gli altri materiali che vengono a contatto con i campioni biologici per almeno 30 minuti con ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o in autoclave a 121 °C per un'ora prima di 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. Evitare che i reagenti di estrazione entrino in contatto con l'ipoclorito di sodio (candeggina).

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti a proteggersi gli occhi e il viso.

Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.

Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici sul posto di lavoro.

Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.

Eliminare i reagenti avanzati e i rifiuti secondo le norme vigenti.

Prima di eseguire il saggio, leggere attentamente tutte le istruzioni fornite con il prodotto.

Durante l'esecuzione del saggio attenersi alle istruzioni fornite con il prodotto.

Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.

Utilizzare solo i reagenti in dotazione con il prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

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

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

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

Manipolare i campioni estratti in modo tale da prevenire la dispersione nell'ambiente e per evitare la contaminazione dell'area di lavoro dello strumento.

Manipolare attentamente le cassette di PCR (PCR Cassette) e non aprirle in modo da prevenire la diffusione dei prodotti di PCR e la contaminazione dei campioni e dei reagenti.

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Tabella 3

Componente	Temperatura di conservazione	Utilizzo dalla prima apertura	Cicli di congelamento/scongelamento	Stabilità On board (ELiTe InGenius ed ELiTe BeGenius)
MTB EXTRA PCR Mix	-20°C o inferiore (protetta dalla luce)	entro un mese	fino a sette	fino a sette sessioni di lavoro indipendenti* da tre ore ciascuna oppure fino a 7 ore consecutive (2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna più il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro)

* con congelamento intermedio

8 CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

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

Tabella 4

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto e conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
Espettorato (Sputum)	Fluidificare i campioni con una soluzione di N-Acetil L-Cisteina e decontaminarli con una soluzione di idrossido di sodio ⁽²⁾ , poi inattivarli a 95 °C per 30 minuti	≤ 1 ora ⁽¹⁾	≤ 2 giorni ⁽²⁾	≤ 1 mese ⁽⁵⁾	≥ 1 mese
Lavaggi broncoalveolari (BAL) e bronco aspirati (BA)	Fluidificare i campioni con una soluzione di N-Acetil L-Cisteina e decontaminarli con una soluzione di idrossido di sodio ⁽²⁾ , poi inattivarli a 95 °C per 30 minuti	≤ 1 ora ⁽¹⁾	≤ 2 giorni ⁽²⁾	≤ 1 mese ⁽⁵⁾	≥ 1 mese
Urine	Concentrare i campioni e decontaminarli con una soluzione di idrossido di sodio ⁽²⁾ , poi inattivarli a 95 °C per 30 minuti	≤ 1 ora ⁽¹⁾	≤ 2 giorni ⁽²⁾	≤ 1 mese ⁽⁵⁾	≥ 1 mese
Liquidi cavitari	Concentrare i campioni e decontaminarli con una soluzione di idrossido di sodio ⁽²⁾ , poi inattivarli a 95 °C per 30 minuti	≤ 1 ora ⁽³⁾	≤ 2 giorni ⁽²⁾	≤ 1 mese ⁽⁵⁾	≥ 1 mese
Biopsie	Disgregare i campioni e decontaminarli con una soluzione di idrossido di sodio ⁽²⁾ , poi inattivarli a 95 °C per 30 minuti	≤ 1 ora ⁽³⁾	≤ 7 giorni ⁽⁴⁾	≤ 1 mese ⁽³⁾	≥ 1 mese
Aspirati gastrici	Fluidificare i campioni con una soluzione di N-Acetil L-Cisteina e decontaminarli con una soluzione di idrossido di sodio ⁽²⁾ , poi inattivarli a 95 °C per 30 minuti	≤ 1 ora ⁽¹⁾	≤ 2 giorni ⁽²⁾	≤ 7 giorni ⁽⁴⁾	≥ 1 mese

- 1) (CLSI MP48 2nd Edition, "Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria")
- 2) (Mycobacteriology Laboratory Manual, Global Laboratory Initiative).
- 3) (KPNW Specimen Requirements)
- 4) (Mayo Clinic Laboratories)
- 5) (ARUP Laboratories)

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

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

Tabella 5

Assay Protocol per MTB EXTRA ELITE MGB Kit				
Campione	Strumento	Assay Protocol	Report	Characteristics
Espettorato	ELITE InGenius	MTB EXTRA ELITE_SP_200_100	Positivo / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITE BeGenius	MTB EXTRA ELITE_Be_SP_200_100		
Lavaggi broncoalveolari (BAL) e bronco aspirati (BA)	ELITE InGenius	MTB EXTRA ELITE_BAL_200_100	Positivo / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITE BeGenius	MTB EXTRA ELITE_Be_BAL_200_100		
Urine	ELITE InGenius	MTB EXTRA ELITE_U_200_100	Positivo / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITE BeGenius	MTB EXTRA ELITE_Be_U_200_100		
Liquidi cavitari	ELITE InGenius	MTB EXTRA ELITE_CF_200_100	Positivo / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITE BeGenius	MTB EXTRA ELITE_Be_CF_200_100		
Biopsie	ELITE InGenius	MTB EXTRA ELITE_B_200_100	Positivo / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITE BeGenius	MTB EXTRA ELITE_Be_B_200_100		
Aspirati gastrici	ELITE InGenius	MTB EXTRA ELITE_GA_200_100	Positivo / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITE BeGenius	MTB EXTRA ELITE_Be_GA_200_100		

Per tutti i protocolli, 200 µL di campione inattivato devono essere trasferiti in un Extraction tube (per ELITE InGenius) o in una provetta Sarstedt da 2 mL (per ELITE BeGenius).

NOTA

Il trasferimento con le pipette dei campioni nell'**Extraction Tube** o nella **provetta Sarstedt da 2 mL** potrebbe generare contaminazione. Utilizzare le pipette appropriate e seguire tutte le raccomandazioni riportate nella sezione "Avvertenze e precauzioni".

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

I dati relativi all'inibizione indotta da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo "Sostanze potenzialmente interferenti" al capitolo [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI](#) pagina 19.

Controlli di PCR

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

- Come Controllo Positivo di PCR utilizzare il prodotto **MDR/MTB – ELITE Positive Control** (non fornito in questo kit), in associazione agli Assay Protocols **MTB EXTRA ELITE_PC** o **MTB EXTRA ELITE_Be_PC**.
- Come Controllo Negativo di PCR utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita in questo kit) in associazione con gli Assay Protocols **MTB EXTRA ELITE_NC** o **MTB EXTRA ELITE_Be_NC**.

NOTA

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

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

Controlli di qualità

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

9 PROCEDURA ELITE InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **MTB EXTRA ELITE MGB Kit** con **ELITE InGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 6

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

FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- Accendere lo strumento **ELITE InGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**",
- Nella sezione "Controls" della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**Positive Control**, **Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili Controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito,

- Selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").

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

FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **MTB EXTRA ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con **ELITe InGenius** per eseguire:

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

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

NOTA

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

Prima di impostare una sessione:

Scongelerare le provette necessarie di **PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **12 test** in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

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

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

Tabella 7

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

Tabella 7 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
4	Verificare che l'“Extraction Input Volume” (volume estrazione input) sia 200 µL e che l'“Extracted Elute Volume” (Volume di eluato estratto) sia 100 µL.	Verificare che l'“Extraction Input Volume” (volume estrazione input) sia 200 µL e che l'“Extracted Elute Volume” (Volume di eluato estratto) sia 100 µL.	Verificare che l'“Extraction Input Volume” (volume estrazione input) sia 200 µL e che l'“Extracted Elute Volume” (Volume di eluato estratto) sia 100 µL.
5	Per ogni campione, assegnare un “Track” d'interesse e compilare il “SampleID” (ID campione, SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un “Track” d'interesse e compilare il “SampleID” (ID campione, SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Non applicabile
6	Nella colonna “Assay” (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo “Campioni e Controlli”).	Nella colonna “Assay” (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo “Campioni e Controlli”).	Nella colonna “Assay” (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo “Campioni e Controlli”) e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del Positive Control e dell'acqua per biologia molecolare.
7	Verificare che nella colonna “Protocol” (Protocollo) il protocollo visualizzato sia: “Extract + PCR”.	Nella colonna “Protocol” (Protocollo) selezionare “PCR Only”.	Verificare che nella colonna “Protocol” (Protocollo) il protocollo visualizzato sia: “PCR Only”.
8	Nella colonna “Sample Position” (Posizione campione) selezionare “Extraction Tube” (Tubo di estrazione) come posizione in cui caricare il campione.	Verificare nella colonna “Sample Position” (Posizione campione) che la posizione sia “Elution Tube”.	Verificare nella colonna “Sample Position” (Posizione campione) che la posizione sia “Elution Tube”.
9	Fare clic su “Next” (Avanti) per proseguire.	Fare clic su “Next” (Avanti) per proseguire.	Fare clic su “Next” (Avanti) per proseguire.
10	Caricare il CPE e la PCR Mix nell' “Inventory Block” (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi	Caricare la PCR Mix nell' “Inventory Block” (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.	Caricare la PCR Mix nell' “Inventory Block” (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
11	Fare clic su “Next” per proseguire.	Fare clic su “Next” per proseguire.	Fare clic su “Next” per proseguire.
12	Nell'“Inventory Area” (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali)	Nell'“Inventory Area” (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali).	Nell'“Inventory Area” (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali).
13	Fare clic su “Next” per proseguire	Fare clic su “Next” per proseguire	Fare clic su “Next” per proseguire
14	Caricare le PCR cassette , le cartucce di estrazione “ELITE InGenius SP 200”, tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre.	Caricare le PCR cassette e gli Elution tube con i campioni da analizzare.	Caricare le PCR cassette e le provette per il Controllo Positivo ed il Controllo Negativo.
15	Fare clic su “Next” per proseguire.	Fare clic su “Next” per proseguire.	Fare clic su “Next” per proseguire.
16	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
17	Premere “Start” (Inizio).	Premere “Start” (Inizio).	Premere “Start” (Inizio).

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

NOTA

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

NOTA

Alla fine della corsa la **PCR Mix** può essere rimossa dallo strumento, tappata e conservata a -20 °C o temperatura inferiore, o può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 7 ore (2 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore circa ciascuna e il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro), mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

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

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

NOTA

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

ELiTe InGenius genera i risultati del prodotto **MTB EXTRA ELiTe MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

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

Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo

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

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

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

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

NOTA

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

NOTA

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

Validazione dei risultati dei campioni

Il **software ELITE InGenius** interpreta i risultati di amplificazione del target (Canale **MTB**) e del controllo Interno (Canale **IC**) con i parametri inclusi negli Assay Protocol **MTB EXTRA ELITE_SP_200_100**, **MTB EXTRA ELITE_BAL_200_100**, **MTB EXTRA ELITE_U_200_100**, **MTB EXTRA ELITE_CL_200_100**, **MTB EXTRA ELITE_B_200_100**, **MTB EXTRA ELITE_GA_200_100**.

I risultati vengono mostrati nella schermata "Results Display".

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

Tabella 8

1) Controllo Positivo	Status
MTB EXTRA Positive Control	APPROVATO
2) Controllo Negativo	Status
MTB EXTRA Negative Control	APPROVATO

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

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

Tabella 9

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
MTB: DNA rilevato.	Il DNA dell'MTB complex è stato rilevato nel campione.
MTB: DNA non rilevato o inferiore LoD.	Il DNA dell'MTB complex non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo valido oppure la concentrazione del target è inferiore al limite di rilevazione (LoD) del saggio.
Non valido—Ripeti test su campione	Risultato del saggio non valido per un errore del Controllo Interno (es. estrazione errata o presenza di un inibitore). Il test deve essere ripetuto.

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

Quando il volume è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato, tal quale oppure diluito, mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only". In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota in modalità "Extract + PCR".

(vedi [14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 26](#)).

I campioni segnalati come "MTB: DNA non rilevato o inferiore LoD" sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA del target. In tal caso non si può escludere che il DNA del target di interesse sia presente ad una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedi [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 19](#)).

NOTA

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

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

Refertazione dei risultati dei campioni

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

- Il "Sample Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per campione selezionato (SID).
- Il "Track Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per track selezionato.
- Il "Sample Report" e il "Track Report" possono essere stampati e firmati da personale autorizzato.

10 PROCEDURA ELITe BeGenius

La procedura di utilizzo del prodotto **MTB EXTRA ELITe MGB Kit** con **ELITe BeGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 10

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

FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

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

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

FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **MTB EXTRA ELITE MGB Kit** può essere utilizzato con il sistema **ELITE BeGenius** per eseguire:

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

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

NOTA

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

Prima di impostare una sessione:

Scongelare le provette necessarie di **PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **12 test** in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

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

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

Tabella 11

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

Tabella 11 (segue)

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

Tabella 11 (segue)

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

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

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a $-20 \pm 10^\circ\text{C}$ al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

NOTA

Alla fine della corsa, la **PCR Mix** può essere rimossa dallo strumento, tappata e conservata a -20°C o temperatura inferiore, o può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 7 ore (2 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore circa ciascuna e il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro), mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

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

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

NOTA

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

ELITE BeGenius genera i risultati del prodotto **MTB EXTRA ELITE MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

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

NOTA

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

11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

NOTA

I test per determinare le caratteristiche delle prestazioni sono stati effettuati con **ELITE InGenius** utilizzando il componente **TB1 PCR Mix** del prodotto di EG SpA **MDR/MTB ELITE MGB Kit** (codice RTS120ING), avente la medesima formulazione del componente **MTB EXTRA PCR Mix** del prodotto di EG SpA **MTB EXTRA ELITE MGB Kit** (codice RTS121ING). **MTB EXTRA PCR Mix** è stato utilizzato per i test effettuati con **ELITE BeGenius**; con entrambi gli strumenti sono stati utilizzati gli stessi campioni e lo stesso profilo termico di PCR.

Limite di rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) del saggio è stato definito con lo strumento **ELITE InGenius** testando un pannello di campioni di Espettorato positivizzati con un materiale di riferimento di *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), ceppo H37Ra (ATCC, ref. 25177).

L'analisi dei dati con regressione Probit è stata eseguita sui risultati e il valore di LoD è stato stimato come la concentrazione del campione che ha una probabilità del 95% di risultare positivo.

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 12 Limite di rilevazione (CFU/mL) per campioni di sputum ed ELITE InGenius

Matrice	LoD (CFU/ml)	Intervallo di confidenza 95% (CFU/ml)	
		limite inferiore	limite superiore
Espettorato	6	4	15

Il valore di LoD calcolato è stato verificato testando con **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** campioni di espettorato e di BAL/BA, positivizzati con il materiale di riferimento di MTB alla concentrazione dichiarata (6 CFU/mL), in 20 replicati.

Il valore di LoD del saggio in associazione a Liquidi Cavitari, Urine e Biopsie è stato verificato mediante l'analisi con **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius**, testando 20 replicati di ciascuna matrice positivizzata con il materiale di riferimento di MTB alla concentrazione di 20 CFU/mL.

I risultati, per ciascuna matrice, sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 13 Limite di rilevazione (CFU/mL) con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius

Matrice	Risultato
Espettorato	6 CFU / mL
BAL/BA	6 CFU / mL
Urine	20 CFU / mL
Liquidi Cavitari	20 CFU / mL
Biopsie	20 CFU / mL
Aspirati Gastrici	20 CFU / mL

Efficienza di rilevazione (inclusività)

L'inclusività del saggio, intesa come efficienza di rilevazione delle specie di micobatteri incluse nel *Mycobacterium tuberculosis* complex del prodotto, è stata valutata mediante analisi *in silico* di sequenze disponibili nel database EBI ENA.

L'analisi ha evidenziato la conservazione delle sequenze e l'assenza di mutazioni significative. È attesa quindi un'efficace rilevazione dei diversi ceppi e/o isolati.

L'inclusività è stata verificata anche mediante analisi di un pannello di DNA genomici certificati (forniti da un laboratorio esterno) e di DNA plasmidico.

Tutti gli isolati testati sono stati rilevati come positivi per MTB dal prodotto con ELITE InGenius.

Marcatori potenzialmente interferenti

La potenziale cross-reattività con altri target del prodotto 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*.

Tutti gli isolati sono risultati negativi per MTB quando analizzati con il prodotto **MTB EXTRA ELITE MGB Kit**.

Sostanze interferenti

Un pannello di sostanze potenzialmente interferenti, che potrebbero trovarsi nel campione, alla massima concentrazione rilevante è stato testato con il prodotto. Le sostanze testate erano antibiotici (Rifampicina e Isoniazide) e componenti dell'espettorato (mucina, sangue intero umano).

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 14

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

Il test ha dimostrato che le sostanze testate non inibiscono la rilevazione del target utilizzando il **MTB EXTRA ELITE MGB Kit**.

Ripetibilità

La ripetibilità del saggio è stata valutata su ELITE InGenius ed ELITE BeGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di espettorato negativi o positivizzati con un materiale di riferimento di Mycobacterium tuberculosis (MTB), ceppo H37Ra (ATCC, ref. 25177).

Un esempio dei risultati di Ripetibilità Intra-Sessione (su un giorno) è riportato nelle tabelle seguenti.

Tabella 15 Ripetibilità Intra - Sessione con ELITE InGenius

Campione	Pos. / Rep.	MTB			%Concordanza
		Media Ct	SD	% CV	
Negativo	0 / 8	-	-	-	100%
3x LoD	8 / 8	36,55	0,62	1,71	100%
10x LoD	8 / 8	35,86	0,65	1,81	100%

Tabella 16 Ripetibilità Intra - Sessione con ELITE BeGenius

Campione	Pos. / Rep.	MTB			%Concordanza
		Media Ct	SD	% CV	
Negativo	0 / 8	-	-	-	100%
3x LoD	8 / 8	37,53	0,65	1,74	100%
10x LoD	8 / 8	36,54	0,60	1,65	100%

Un esempio dei risultati di ripetibilità Inter-Sessione (su due giorni) è riportato nelle tabelle seguenti.

Tabella 17 Ripetibilità Inter - Sessione con ELITE InGenius

Campione	Pos. / Rep.	MTB			%Concordanza
		Media Ct	SD	% CV	
Negativo	0 / 16	-	-	-	100%
3x LoD	16 / 16	36,55	0,69	1,89	100%
10x LoD	16 / 16	35,79	0,59	1,64	100%

Tabella 18 Ripetibilità Inter - Sessione con ELITE BeGenius

Campione	Pos. / Rep.	MTB			%Concordanza
		Media Ct	SD	% CV	
Negativo	0 / 16	-	-	-	100%
3x LoD	16 / 16	37,49	0,60	1,59	100%
10x LoD	16 / 16	36,61	0,69	1,87	100%

Nel test di Ripetibilità, MTB ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct del target come %CV inferiore al 5 %.

Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata valutata su ELITE InGenius e ELITE BeGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di espettorato negativi o positivizzati con un materiale di riferimento di Mycobacterium tuberculosis, ceppo H37Ra (ATCC, ref. 25177).

I risultati di Riproducibilità Inter-Lotto (due lotti) sono riportati nelle tabelle seguenti.

Tabella 19 Riproducibilità Inter - Lotto con ELITE InGenius

Campione	Pos. / Rep.	MTB			%Concordanza
		Media Ct	SD	%CV	
Negativo	0 / 8	-	-	-	100%
3x LoD	8 / 8	36,68	0,71	1,94	100%
10x LoD	8 / 8	35,70	0,79	2,21	100%

Tabella 20 Riproducibilità Inter - Lotto con ELITE BeGenius

Campione	Pos. / Rep.	MTB			%Concordanza
		Media Ct	SD	%CV	
Negativo	0 / 8	-	-	-	100%
3x LoD	8 / 8	37,93	0,71	1,88	100%
10x LoD	8 / 8	36,56	0,55	1,50	100%

I risultati di Riproducibilità Inter-Strumento (su due giorni, due lotti e due strumenti) sono mostrati nelle tabelle seguenti.

Tabella 21 Riproducibilità Inter - Strumento con ELITE InGenius

Campione	Pos. / Rep.	MTB			%Concordanza
		Media Ct	SD	%CV	
Negativo	0 / 8	-	-	-	100%
3x LoD	8 / 8	36,50	0,63	1,71	100%
10x LoD	8 / 8	35,91	0,57	1,58	100%

Tabella 22 Riproducibilità Inter - Strumento con ELITE BeGenius

Campione	Pos. / Rep.	MTB			%Concordanza
		Media Ct	SD	%CV	
Negativo	0 / 8	-	-	-	100%
3x LoD	8 / 8	37,52	0,39	1,05	100%
10x LoD	8 / 8	36,71	0,43	1,17	100%

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

Specificità Diagnostica

La Specificità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata in associazione con ELITE InGenius analizzando campioni clinici MTB-negativi testati mediante coltura.

Poiché ELITE BeGenius possiede performance analitiche equivalenti a ELITE InGenius, le performance diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono anch'esse considerate equivalenti. Quindi la Specificità Diagnostica del saggio ottenuta in associazione a ELITE InGenius è anche riferibile ad ELITE BeGenius.

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Tabella 23 Specificità Diagnostica

Campione	N	Positivi	Negativi	Specificità Diagnostica %
Espettorato	52	1	51	98.1%
BAL/BA	40	1	39	97,5%
Urine	20	0	20	100%
Liquidi Cavitari	40	0	40	100%
Biopsie	40	0	40	100%
Aspirati Gastrici	20	0	20	100%

Inoltre, i campioni di espettorato sono stati testati MTB-negativi anche mediante un altro saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD e mediante AFB Smear Microscopy. I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Tabella 24 Specificità Diagnostica dei campioni di espettorato testati mediante altri saggi

Campione	N	Positivi	Negativi	Specificità Diagnostica %
Espettorato testato mediante saggio molecolare marcato CE-IVD	52	1	51	98.1%
Espettorato testato mediante AFB Smear Microscopy	58	7	51	89.47%

Per il Controllo Interno è stato definito un cut-off del valore di Ct per ogni matrice in associazione a ELITE InGenius e ELITE BeGenius. I valori sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 25 Cut-off del valore di Ct per il Controllo Interno

Campione	Cut-off del valore di Ct per il Controllo Interno	
	ELITE InGenius	ELITE BeGenius
Espettorato	34	35
BAL/BA	35	35
Urine	35	35
Liquidi Cavitari	34	34
Biopsie	34	35
Aspirati Gastrici	34	34

Sensibilità Diagnostica

La sensibilità diagnostica del test, come conferma dei campioni clinici positivi, è stata valutata in associazione con ELITE InGenius analizzando campioni clinici certificati positivi testati mediante coltura o addizionati con materiale di riferimento MTB.

Poiché ELITE BeGenius possiede performance analitiche equivalenti a ELITE InGenius, le performance diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono anch'esse considerate equivalenti. Quindi la Sensibilità Diagnostica del saggio ottenuta in associazione a ELITE InGenius è anche riferibile ad ELITE BeGenius.

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Tabella 26 Sensibilità Diagnostica

Campione	N	Positivi	Negativi	Sensibilità Diagnostica %
Espettorato	50	50	0	100%
BAL/BA	46	42	4	91,3%
Urine	20	16	4	80%
Liquidi Cavitari	40	39	1	97,5%
Biopsie	42	38	4	90,5%
Aspirati Gastrici	22	18	4	81,8%

Inoltre, i campioni di espettorato sono stati testati MTB-positivi anche mediante un altro saggio di diagnostica molecolare marcato CE-IVD e mediante AFB Smear Microscopy. I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Tabella 27 Sensibilità Diagnostica dei campioni di espettorato testati mediante altri saggi

Campione	N	Positivi	Negativi	Sensibilità Diagnostica %
Espettorato testato mediante saggio molecolare marcato CE-IVD	50	50	0	100%
Espettorato testato mediante AFB Smear Microscopy	44	44	0	100%

NOTA

I dati ed i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto di MTB EXTRA ELITE MGB Kit, FTP 121ING.

12 BIBLIOGRAFIA

Thierry D. et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 188

E. A. Lukhtanov et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35: e30

Mycobacteriology laboratory manual (Global Laboratory Initiative, Prima edizione, aprile 2014).

K. Linnet et al. (2004) Clin. Chem. 50: 732 - 740.

13 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti 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: liquido 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 necessario, pertanto, procedere con cautela durante queste fasi e seguire attentamente le istruzioni per l'uso riportate nel manuale fornito con il prodotto.

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

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

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

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

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

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.

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi per via di un difetto del controllo interno. In questo caso il campione dovrà essere analizzato di nuovo, a cominciare dall'estrazione, con conseguente possibile ritardo nel conseguimento dei risultati finali.

Possibili polimorfismi, inserzioni o delezioni nella regione del DNA target coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione e la quantificazione del DNA target.

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

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

14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Tabella 28

Reazione del Controllo Positivo non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix e del Controllo Positivo. Controllare i volumi della PCR Mix e del Controllo Positivo.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la PCR Mix per più di 7 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non utilizzare la PCR Mix per più di tre sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione del Controllo Positivo.	Non utilizzare il Controllo Positivo per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione o nel blocco refrigerato). Utilizzare nuove aliquote di Controllo Positivo.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A.

Tabella 29

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

Tabella 30

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix, del Controllo Interno e del campione. Controllare i volumi della PCR Mix, del Controllo Interno e del campione.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la PCR Mix per più di 7 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non utilizzare la PCR Mix per più di tre sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione del Controllo Interno.	Utilizzare una nuova aliquota di Controllo Interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR). Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione in una sessione in modalità "Extract + PCR".
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

Tabella 31

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

Tabella 32

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

Tabella 33

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

15 LEGENDA DEI SIMBOLI



Numero di catalogo



Limite superiore di temperatura



Codice del lotto.



Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).



Dispositivo medico diagnostico *in vitro*.



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



Numero Unico Identificativo del dispositivo



Contenuto sufficiente per "N" test.



Consultare le istruzioni per l'uso



Contenuto.



Tenere lontano dalla luce solare.



Fabbricante.

16 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.

17 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

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

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

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

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

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

Appendix A MTB EXTRA ELITE MGB Kit used in association with Genius series® platforms



CAUTION

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

Intended use

The product **MTB EXTRA ELITE MGB® Kit** is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as a qualitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*) DNA.

The assay is validated in association with the **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®** instruments, automated and integrated systems for extraction, Real-Time PCR and results interpretation, using human specimens of sputum, bronchial aspirates (BA), bronchoalveolar lavages (BAL), urine, cavity fluids, biopsies and gastric aspirates previously liquefied, decontaminated and inactivated.

The product is intended for use as an aid in the diagnosis of infections from *Mycobacterium tuberculosis* complex, in combination with all relevant clinical observations and laboratory outcomes, in particular the culture methods for *Mycobacterium*.



Amplified sequence

Target for Qualitative Application	Gene	Fluorophore	Channel
› Target	› IS6110	› FAM	MTB
› Internal Control	› IC2 Artificial sequence	› AP680	IC

Validated matrix

<ul style="list-style-type: none"> • sputum • bronchial aspirates (BA) / bronchoalveolar lavages (BAL) • urine • cavity fluids • biopsies • gastric aspirates 	previously liquefied, decontaminated and inactivated
---	--

Kit content and related products

MTB EXTRA ELITE MGB Kit (RTS121ING)		MDR/MTB - ELITE Positive Control (CTR120ING)	
 X 8		 X 3	
MTB EXTRA PCR Mix 8 tubes of 280 µL 12 reactions per tube 96 reactions per kit 7 freeze-thaw cycles per tube		TB Positive Control 3 tubes of 160 µL 2 reactions per tube 6 reactions per kit 2 freeze-thaw cycles	
Maximum shelf-life:	24 months	Maximum shelf-life	24 months
Storage temperature	≤ -20°C	Storage temperature	≤ -20°C

Other products required not provided in the kit

<ul style="list-style-type: none"> ELITE InGenius instrument: INT030. ELITE BeGenius instrument: INT040. ELITE InGenius SP 200: INT032SP200. ELITE InGenius and ELITE BeGenius Consumables (see ELITE InGenius and ELITE BeGenius Instruction for Use) 	<ul style="list-style-type: none"> CPE - Internal Control: CTRCPE
--	--

ELITE InGenius and ELITE BeGenius protocol

› Sample volume	200 µL	› Eluate PCR input volume	20 µL
› CPE volume	10 µL	› Q—PCR Mix volume	20 µL
› Total elution volume	100 µL	› Frequency of controls	15 days
		› Frequency of calibration	30 days

ELITE InGenius and ELITE BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Sputum	6 CFU / mL	100% 50/50*	98% 47/48*
BAL/BA	6 CFU / mL	91.3% 42/46*	97.5% 39/40*
Urine	20 CFU / mL	80% 16/20*	100% 20/20*
Cavitary fluid	20 CFU / mL	97.5% 39/40*	100% 40/40*
Biopsy	20 CFU / mL	90.5% 38/42	100% 40/40*
Gastric aspirate	20 CFU / mL	81.8% 18/22*	100% 20/20*

*confirmed samples / tested samples

Sample preparation

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

Table 34

Specimen	Collection requirements	Transport/Storage conditions			
		+16 / +26 °C (room temperature)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Sputum	liquefied with a solution of N- Acetil L-Cysteine and decontaminated with sodium hydroxide solution ⁽²⁾ then inactivated at 95°C for 30 minutes	≤ 1 hour ⁽¹⁾	≤ 2 days ⁽²⁾	≤ 1 month ⁽⁵⁾	≥ 1 month
Bronchoalveolar lavage (BAL) and bronchial aspirates (BA)	liquefied with a solution of N- Acetil L-Cysteine and decontaminated with sodium hydroxide solution ⁽²⁾ then inactivated at 95°C for 30 minutes	≤ 1 hour ⁽¹⁾	≤ 2 days ⁽²⁾	≤ 1 month ⁽⁵⁾	≥ 1 month
Urine	concentrated and decontaminated with sodium hydroxide solution ⁽²⁾ , then inactivated at 95°C for 30 minutes	≤ 1 hour ⁽¹⁾	≤ 2 days ⁽²⁾	≤ 1 month ⁽⁵⁾	≥ 1 month
Cavitary fluid	concentrated and decontaminated with sodium hydroxide solution ⁽²⁾ , then inactivated at 95°C for 30 minutes	≤ 1 hour ⁽³⁾	≤ 2 days ⁽²⁾	≤ 1 month ⁽⁵⁾	≥ 1 month
Biopsy	break down and decontaminated with sodium hydroxide solution ⁽²⁾ , then inactivated at 95°C for 30 minutes	≤ 1 hour ⁽³⁾	≤ 7 days ⁽⁴⁾	≤ 1 month ⁽³⁾	≥ 1 month
Gastric aspirate	liquefied with a solution of N- Acetil L-Cysteine and decontaminated with sodium hydroxide solution ⁽²⁾ , then inactivated at 95°C for 30 minutes	≤ 1 hour ⁽¹⁾	≤ 2 days ⁽²⁾	≤ 7 days ⁽⁴⁾	≥ 1 month

1) (CLSI MP48 2nd Edition, "Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria")

2) (Mycobacteriology Laboratory Manual, Global Laboratory Initiative).

3) (KPNW Specimen Requirements)

4) (Mayo Clinic Laboratories)

5) (ARUP Laboratories)

ELITe InGenius Procedures

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

Before analysis

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

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

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL"	3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay Protocol" of interest: MTB EXTRA ELITe_SP_200_100 MTB EXTRA ELITe_BAL_200_100 MTB EXTRA ELITe_U_200_100 MTB EXTRA ELITe_CL_200_100 MTB EXTRA ELITe_B_200_100 MTB EXTRA ELITe_GA_200_100	5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Extraction Tube	6. Load the PCR Mix and the Internal Control in the Inventory Block
7. Load: PCR Cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

NOTE

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

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

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL"	3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay Protocol" of interest: MTB EXTRA ELiTe_PC or MTB EXTRA ELiTe_NC or MTB EXTRA ELiTe_SP_200_100 MTB EXTRA ELiTe_BAL_200_100 MTB EXTRA ELiTe_U_200_100 MTB EXTRA ELiTe_CL_200_100 MTB EXTRA ELiTe_B_200_100 MTB EXTRA ELiTe_GA_200_100	5. Select the method "PCR Only" and the sample position "Elution Tube"	6. Load the PCR Mix in the Inventory Block
7. Load: PCR Cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

ELiTe BeGenius Procedures

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

Before analysis

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

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

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extract + PCR»	2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the Cooler Unit. The barcode scan is already active	3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"
4. Select the "Assay Protocol" of interest: MTB EXTRA ELiTe_Be_SP_200_100 MTB EXTRA ELiTe_Be_BAL_200_100 MTB EXTRA ELiTe_Be_U_200_100 MTB EXTRA ELiTe_Be_CL_200_100 MTB EXTRA ELiTe_Be_B_200_100 MTB EXTRA ELiTe_Be_GA_200_100 Note: If a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4	5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load the PCR Mix and the Internal Control in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
7. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette" and the "Extraction Basket" with the "ELiTe InGenius SP 200" extraction cartridges and the required extraction consumables	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

NOTE

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

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

1. Select “Perform Run” on the touch screen and then click on the run mode «PCR Only»	2. Load the extracted nucleic acid or controls barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	3. Verify the extraction volumes: Input: “200 µL”, Eluate: “100 µL”
4. Select the “Assay Protocol” of interest: MTB EXTRA ELITe_Be_PC or MTB EXTRA ELITe_Be_NC or: MTB EXTRA ELITe_Be_SP_200_100 MTB EXTRA ELITe_Be_BAL_200_100 MTB EXTRA ELITe_Be_U_200_100 MTB EXTRA ELITe_Be_CL_200_100 MTB EXTRA ELITe_Be_B_200_100 MTB EXTRA ELITe_Be_GA_200_100	5. Load the PCR-Mix in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load “PCR Rack” with “PCR Cassette”
7. Close the door. Start the run	8. View, approve and store the results	



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