

Istruzioni per l'uso

## **ESBL ELITe MGB® Kit**

---

reagenti per la Real-Time PCR del DNA



**REF** RTS201ING

**UDI** 08033891486228



**CRONOLOGIA DELLE REVISIONI**

Rev.	Revisioni	Data (gg/mm/aa)
03	Espansione dell'uso del prodotto in associazione con ELITe BeGenius® e le matrici tamponi rettali ed emocolture.	27/05/25
02	Correzioni formali in "Campioni e Controlli"	30/07/18
01	Estensione d'uso con la matrice emocolture in associazione allo strumento ELITe InGenius®.	05/02/18
00	Nuovo sviluppo di prodotto e modifiche successive	30/01/17

**NOTA**

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

# INDICE

---

<b>1 USO PREVISTO .....</b>	<b>4</b>
<b>2 PRINCIPIO DEL SAGGIO.....</b>	<b>4</b>
<b>3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO .....</b>	<b>4</b>
<b>4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO .....</b>	<b>5</b>
<b>5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO .....</b>	<b>5</b>
<b>6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI .....</b>	<b>5</b>
<b>7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI .....</b>	<b>6</b>
<b>8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius .....</b>	<b>7</b>
<b>9 PROCEDURA ELITe InGenius.....</b>	<b>9</b>
<b>10 PROCEDURA ELITe BeGenius .....</b>	<b>14</b>
<b>11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI.....</b>	<b>18</b>
<b>12 BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>26</b>
<b>13 LIMITI DELLA PROCEDURA .....</b>	<b>26</b>
<b>14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI.....</b>	<b>27</b>
<b>15 LEGENDA DEI SIMBOLI .....</b>	<b>29</b>
<b>16 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA.....</b>	<b>30</b>
<b>Appendix A QUICK START GUIDE.....</b>	<b>31</b>

## 1 USO PREVISTO

Il prodotto **ESBL 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 dei geni  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL) **CTX-M-1**, **CTX-M-9**, **CTX-M-14** e **CTX-M-15\*** delle *Enterobacteriaceae* in campioni di DNA estratto da campioni clinici.

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 tamponi rettali ed emocolture.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi e nello screening delle infezioni da enterobatteri portatori dei geni  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL), insieme ai dati clinici del paziente e agli esiti di altri esami di laboratorio.

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

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

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

## 2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è una Real-Time PCR qualitativa multiplex per la rilevazione del DNA dei geni  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL) **CTX-M-1**, **CTX-M-9**, **CTX-M-14** e **CTX-M-15** delle *Enterobacteriaceae*, isolato dai campioni e amplificato utilizzando il reagente **ESBL 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).

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.

## 3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

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

- I geni della famiglia **CTX-M-1** e **CTX-M-15**, rilevati nel canale **CTX-M1-9-14-15**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher® e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 593 (AP593),
- I geni della famiglia **CTX-M-9** e **CTX-M-14**, rilevati nel canale **CTX-M1-9-14-15**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher® e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 593 (AP593),
- 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® 525 (AP525).

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

### NOTA

I quattro geni  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL) sono rilevati da due diverse sonde (una per i geni della famiglia CTX-M-1 e CTX-M-15 e una per i geni della famiglia CTX-M-9 e CTX-M-14) marcate con lo stesso fluoroforo e quindi non possono essere distinti.

Il prodotto **ESBL ELITe MGB Kit** consente di effettuare **96 test** in associazione con **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius**, utilizzando 20  $\mu$ L per reazione.

Il prodotto **ESBL 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
<b>ESBL PCR Mix cod. RTS201ING</b>	Miscela di reagenti per la Real-Time PCR in provetta con Tappo NATURALE	<b>8 x 280 µL</b>	-

## 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 (range di volume: 0,5-1000 µL).
- Provette sterili con tappo a vite da 2,0 mL (Sarstedt, Germany, cod. 72.694.005).
- Acqua per biologia molecolare.
- Brodo tripticasi-soia

## 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
<b>ELITe InGenius</b> (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, cod. INT030). <b>ELITe InGenius Software</b> versione 1.3.0.19 (o successiva). <b>ESBL ELITe_PC</b> , Assay Protocol (Protocollo di Saggio) con i parametri per il test del Controllo Positivo. <b>ESBL ELITe_NC</b> , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo. <b>ESBL ELITe_RcS_200_100</b> , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di tamponi rettali <b>ESBL ELITe_BC_200_100</b> , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di emocolture.	<b>ELITe InGenius SP 200</b> (EG SpA, cod. INT032SP200). <b>ELITe InGenius SP 200 Consumable Set</b> (EG SpA, cod. INT032CS). <b>ELITe InGenius PCR Cassette</b> (EG SpA, cod. INT035PCR). <b>ELITe InGenius Waste Box</b> (EG SpA, cod. F2102-000). <b>300 µL Filter Tips Axygen</b> (Corning Life Sciences Inc., cod. TF-350-L-R-S) solo per ELITe InGenius. <b>1000 µL Filter Tips Tecan</b> (Tecan, Switzerland, cod. 30180118) solo per ELITe BeGenius. <b>CPE - Internal Control</b> (EG SpA, cod. CTRCPE) <b>ESBL — ELITe Positive Control</b> (EG SpA, cod. CTR201ING) <b>eNAT™ kit</b> (Copan, cod. 606CS01R), <b>FecalSwab™</b> (Copan, cod. 470CE)
<b>ELITe BeGenius</b> (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, cod. INT040). <b>ELITe InGenius Software</b> versione 2.2.1 (o successiva). <b>ESBL ELITe_Be_PC</b> , Assay Protocol con i parametri per il test del Controllo Positivo. <b>ESBL ELITe_Be_NC</b> , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo. <b>ESBL ELITe_Be_RcS_200_100</b> , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di tamponi rettali <b>ESBL ELITe_Be_BC_200_100</b> , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di emocolture.	

## 7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

### Avvertenze e precauzioni generali

Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero 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 smaltilo.

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 smaltili. 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

### **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)
<b>ESBL PCR Mix</b>	-20°C o inferiore (protetta dalla luce)	entro un mese	fino a sette	fino a 7 sessioni separate* da 3 ore ciascuna

\* con congelamento intermedio

## **8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius**

### **Campioni e Protocolli di Saggio**

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
emocoltura	-	≤ 24 hours	-	-	-
tampone rettale	raccolto con <b>eNAT™</b> kit	-	≤ 1 mese	≤ 6 mesi	> 6 mesi
tampone rettale	raccolto con <b>FecalSwab™</b> kit	-	≤ 3 giorni	-	-

Prima dell'analisi con questo prodotto diluire il campione di emocultura 1:1000 in acqua ultrapura per biologia molecolare (almeno 10 µL di campione in 10 mL di acqua ultrapura), vortexare e trasferire 0,2 mL di campione diluito nell'Extraction tube (per ELITe InGenius) o in una provetta Sarstedt da 2 mL (per ELITe BeGenius).

Prima dell'analisi con questo prodotto trasferire 0,5 mL di campione in FecalSwab™ in un tubo eNAT™ nuovo contenente 2 mL di medium e vortexare. Dopo l'aggiunta di 0,5 mL di campione in medium FecalSwab™, il tubo eNAT™ può essere caricato direttamente sullo strumento come tubo primario. I campioni diluiti in eNAT possono essere conservati nelle stesse condizioni riportate nella tabella sopra.

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.

Questo prodotto è compatibile anche con isolati colturali in associazione a ELITe InGenius: prima dell'analisi con questo prodotto diluire il campione in un tubo eNAT™ nuovo contenente 2 mL di medium, prelevando con un'ansetta un'aliquota di colonia isolata, vortexare e trasferire 0,2 mL di campione diluito nell'Extraction tube. Quando si esegue l'estrazione del DNA da isolato culturale con ELITe InGenius utilizzare il protocollo di estrazione **ESBL ELITe\_BC\_200\_100**.

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 Protocols per ESBL ELITe MGB Kit**

Campione	Strumento	Assay Protocol	Report	Caratteristiche
tampone rettale	ELITe InGenius	<b>ESBL ELITe_RcS_200_100</b>	Positivo / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITe BeGenius	<b>ESBL ELITe_Be_RcS_200_100</b>		
emocoltura	ELITe InGenius	<b>ESBL ELITe_BC_200_100</b>	Positivo / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITe BeGenius	<b>ESBL ELITe_Be_BC_200_100</b>		

**NOTA**

Verificare se il tubo primario e il volume del campione sono compatibili con ELITe InGenius o ELITe BeGenius, seguendo le Istruzioni per l'uso del kit di estrazione ELITe InGenius SP200 (EG SpA, cod. INT032SP200).

Quando si usa il tubo primario, il volume del campione varia in base al tipo di tubo caricato, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione per ulteriori informazioni.

Quando richiesto, trasferire 200 µL di campione in un Extraction tube (per ELITe InGenius) o in una provetta Sarstedt da 2 mL (per ELITe BeGenius).

**NOTA**

Il trasferimento con le pipette dei campioni nell' **Extraction Tube** o nella **provetta Sarstedt da 2 mL** potrebbe generare contaminazione. Utilizzare le pipette appropriate e seguire tutte le raccomandazioni riportate nella sezione "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 18.

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

**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 **ESBL – ELITe Positive Control** (non fornito in questo kit), in associazione agli Assay Protocols **ESBL ELITe\_PC** o **ESBL ELITe\_Be\_PC**
- Come Controllo Negativo di PCR utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita in questo kit) in associazione con gli Assay Protocols **ESBL ELITe\_NC** o **ESBL 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** è stato 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 testati 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 **ESBL ELITe MGB Kit** con **ELITe InGenius** si articola in tre fasi:

**Tabella 6**

<b>FASE 1</b>	Verifica che il sistema sia pronto	
<b>FASE 2</b>	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).
<b>FASE 3</b>	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 **ESBL ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con **ELITe InGenius** per eseguire:

- Corsa dei campioni (Extract + PCR),
- Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
- 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:

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 7**

	<b>A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)</b>	<b>B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)</b>	<b>C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)</b>
<b>1</b>	<b>Identificare i campioni</b> e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Quando richiesto, trariferire <b>200 µL di campione</b> in un Extraction tube (tubo di estrazione) precedentemente etichettato.	Scongelare a temperatura ambiente gli <b>Elution tube</b> (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. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 4 reazioni.	Scongelare 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.
<b>2</b>	<b>Scongelare</b> le provette necessarie di controllo interno <b>CPE</b> 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	<b>Preparare il Controllo Negativo</b> 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.
<b>3</b>	Nella schermata Home, selezionare " <b>Perform Run</b> " (Esegui sessione)	Nella schermata Home, selezionare " <b>Perform Run</b> " (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare " <b>Perform Run</b> " (Esegui sessione).
<b>4</b>	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.
<b>5</b>	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
<b>6</b>	Nella colonna "Assay" (Saggio) <b>selezionare gli Assay Protocol</b> da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" (Saggio) <b>selezionare gli Assay Protocol</b> da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" (Saggio) <b>selezionare gli Assay Protocol</b> 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.
<b>7</b>	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".
<b>8</b>	Selezionare "Primary tube" o "Extraction tube" nella colonna "Sample Position".	Nella colonna "Sample Position" selezionare "Elution Tube" come posizione in cui caricare il campione.	Verificare nella colonna "Sample Position" (Posizione campione) che la posizione sia "Elution Tube".
<b>9</b>	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.
<b>10</b>	<b>Caricare il CPE e la PCR Mix</b> nell' "Inventory Block" (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi	<b>Caricare la PCR Mix</b> nell' "Inventory Block" (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.	<b>Caricare la PCR Mix</b> nell' "Inventory Block" (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
<b>11</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.

**Tabella 7 (segue)**

	<b>A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)</b>	<b>B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)</b>	<b>C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)</b>
<b>12</b>	Nell'"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i <b>Tip Rack</b> (Rack puntali).	Nell'"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i <b>Tip Rack</b> (Rack puntali).	Nell'"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i <b>Tip Rack</b> (Rack puntali).
<b>13</b>	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
<b>14</b>	Caricare le <b>PCR cassette</b> , le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200", tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre.	Caricare le <b>PCR cassette</b> e gli Elution tube con i campioni da analizzare.	Caricare le <b>PCR cassette</b> e le provette per il Controllo Positivo ed il Controllo Negativo.
<b>15</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
<b>16</b>	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
<b>17</b>	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  $-20 \pm 10$  °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 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore circa ciascuna; mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva

#### NOTA

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

#### NOTA

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

#### NOTA

Alla fine della corsa, rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo e smaltrirli 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 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 **ESBL 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 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 **CTX-M1-9-14-15**) e del controllo Interno (Canale **IC**) con i parametri inclusi negli Assay Protocol **ESBL ELITe\_RcS\_200\_100** e **ESBL ELITe\_BC\_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
ESBL Positive Control	APPROVATO
2) Controllo Negativo	Status
ESBL 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
CTX-M-1-9-14-15:DNA rilevato	Il DNA dei geni CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-9 o CTX-M-14 è stato rilevato nel campione.
CTX-M-1-9-14-15:DNA non rilevato o inferiore	Il DNA dei geni CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-9 e CTX-M-14 non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per questi geni oppure la loro presenza è al di sotto del limite di rilevazione del prodotto.
Non valido—Ripeti test su campione	<b>Risultato del saggio non valido</b> 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 27](#)).

I campioni idonei in cui non è stato possibile rilevare il DNA dei geni β-lattamasi a spettro esteso CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-9 e CTX-M-14 sono segnalati come "CTX-M-1-9-14-15: DNA non rilevato o inferiore LoD". In questo caso non si può escludere che il DNA dei geni β-lattamasi a spettro esteso CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-9 e CTX-M-14 sia presente ad un titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedi paragrafo [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 18](#)).

### 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 **ESBL ELITe MGB Kit** con **ELITe BeGenius** si articola in tre fasi:

**Tabella 10**

<b>FASE 1</b>	Verifica che il sistema sia pronto	
<b>FASE 2</b>	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).
<b>FASE 3</b>	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 **ESBL ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con il sistema **ELITe BeGenius** per eseguire:

- Corsa dei campioni (Extract + PCR),
- Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
- 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**

	<b>A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)</b>	<b>B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)</b>	<b>C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)</b>
<b>1</b>	<b>Identificare i campioni</b> e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Quando richiesto, traferire 200 µL di campione in un Tubo Sarstedt da 2 mL precedentemente etichettato.	<b>Scongelare</b> 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. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 4 reazioni.	<b>Scongelare</b> le provette di <b>Controllo Positivo</b> 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.
<b>2</b>	<b>Scongelare</b> 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	<b>Preparare il Controllo Negativo</b> trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un <b>Elution tube</b> (Provetta con eluato), fornito con il prodotto ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
<b>3</b>	Nella schermata Home, selezionare " <b>Perform Run</b> " (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare " <b>Perform Run</b> " (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare " <b>Perform Run</b> " (Esegui sessione).
<b>4</b>	Rimuovere tutti i Racks dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i Racks dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i Racks dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
<b>5</b>	Selezionare il "Run mode": " <b>Extract + PCR</b> ".	Selezionare il "Run mode: " <b>PCR Only</b> ".	Selezionare il "Run mode": " <b>PCR Only</b> ".
<b>6</b>	<b>Caricare i campioni</b> nel " <b>Sample Rack</b> " (Rack campioni). Quando si utilizzano tubi secondari "2 mL Tube" utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack	<b>Caricare gli eluati</b> dei campioni estratti nell' " <b>Elution Rack</b> " (Rack di eluizione).	<b>Caricare le provette</b> di <b>Controllo Positivo</b> e di <b>Controllo Negativo</b> nell' " <b>Elution Rack</b> " (Rack di eluizione).
<b>7</b>	Inserire il " <b>Sample Rack</b> " 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" <b>Elution Rack</b> " 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" <b>Elution Rack</b> " 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.".
<b>8</b>	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.
<b>9</b>	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.	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.	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.
<b>10</b>	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.
<b>11</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.

**Tabella 11 (segue)**

	<b>A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)</b>	<b>B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)</b>	<b>C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)</b>
	<b>Nota:</b> Quando devono essere analizzati più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.		Non applicabile
<b>12</b>	Caricare gli " <b>Elution tube</b> " (Provetta eluato) nell" <b>Elution Rack</b> " (Rack di eluizione).	Non applicabile	Non applicabile
<b>13</b>	Inserire l" <b>Elution Rack</b> " 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
<b>14</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile	Non applicabile
<b>15</b>	<b>Caricare il CPE e la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".</b>	<b>Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".</b>	<b>Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".</b>
<b>16</b>	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).
<b>17</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
<b>18</b>	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i " <b>Tip Rack</b> " (Rack Puntali).	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i " <b>Tip Rack</b> " (Rack Puntali).	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i " <b>Tip Rack</b> ". (Rack Puntali).
<b>19</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
<b>20</b>	Caricare il " <b>PCR Rack</b> " con le " <b>PCR Cassette</b> " nell' Inventory Area.	Caricare il " <b>PCR Rack</b> " con le " <b>PCR Cassette</b> " nell' Inventory Area.	Caricare il " <b>PCR Rack</b> " con le " <b>PCR Cassette</b> " nell' Inventory Area.
<b>21</b>	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
<b>22</b>	Caricare l" <b>Extraction Rack</b> " (rack di estrazione) con le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200" e i consumabili richiesti.	Non applicabile	Non applicabile
<b>23</b>	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
<b>24</b>	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  $-20 \pm 10$  °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 sessioni da 3 ore circa ciascuna; mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva

**NOTA**

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

**NOTA**

Il **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 smaltrirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

**FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati**

L'**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 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**

L'**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.

L'**ELITe BeGenius** genera i risultati del prodotto **ESBL 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

### Sensibilità analitica: Limite di rilevazione

La sensibilità analitica, come limite di rilevazione (LoD) del saggio, è stata determinata su ELITe InGenius testando un pannello di 4 isolati ESBL, uno per ciascuno dei seguenti geni: CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14 e CTX-M-15 in associazione a campioni di tamponi rettali.

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

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

**Tabella 12 Limite di Rilevazione (CFU / mL) per tamponi rettali e ELITe InGenius**

Gene	Isolato Batterico	LoD (CFU / mL)	95% intervallo di confidenza (CFU / mL)	
			Limite inferiore	Limite superiore
CTX-M-1	<i>E. coli</i> , DICON-091	55	43	79
CTX-M-9	<i>E. coli</i> , DICON-055	29	21	46
CTX-M-14	<i>E. coli</i> , DICON-045	273	220	384
CTX-M-15	<i>E. coli</i> , NCTC13400	36	28	55

Il valore di LoD calcolato è stato verificato sugli strumenti ELITe InGenius ed ELITe BeGenius, testando campioni di tamponi rettali ed emoculture positivizzati con materiale di riferimento di ciascun target alla concentrazione dichiarata.

I risultati ottenuti hanno confermato i valori di LoD dichiarati per tutti i target di ESBL ELITe MGB Kit con tamponi rettali ed emoculture, sia su ELITe BeGenius che su ELITe InGenius.

#### **Efficienza di rilevazione (inclusività)**

L'efficienza di rilevazione su diverse varianti dei geni β-lattamasi a spettro esteso è stata valutata *in silico* per confronto di sequenze con banche dati nucleotidiche.

L'esame delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco e delle sonde fluorescenti sull'allineamento delle sequenze disponibili in banca dati dei geni β-lattamasi a spettro esteso, ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative per le varianti riportate nella tabella seguente.

**Tabella 13**

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

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

I risultati finali sono riportati nella seguente tabella.

**Tabella 14 Efficienza di rilevazione (inclusività) del prodotto ESBL ELITe MGB Kit**

Organismo	Isolato	Gene	Concentrazione (CFU/mL)	Risultato
<i>E. coli</i>	DICON-091	CTX-M-1	165	Incluso
<i>E. coli</i>	DICON-211	CTX-M-1	165	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-126	CTX-M-1	165	Incluso
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-001	CTX-M-1	165	Incluso

**Tabella 14 Efficienza di rilevazione (inclusività) del prodotto ESBL ELITe MGB Kit (segue)**

Organismo	Isolato	Gene	Concentrazione (CFU/mL)	Risultato
E. coli	DICON-003	CTX-M-1	165	Incluso
E. coli	DICON-055	CTX-M-9	87	Incluso
E. coli	DICON-098	CTX-M-9	87	Incluso
E. coli	DICON-085	CTX-M-9	87	Incluso
E. coli	DICON-045	CTX-M-14	819	Incluso
K. pneumoniae	DICON-060	CTX-M-14	819	Incluso
E. coli	DICON-054	CTX-M-14	819	Incluso
E. coli	NCTC13400	CTX-M-15	108	Incluso
E. coli	NCTC13451	CTX-M-15	108	Incluso
E. coli	NCTC13450	CTX-M-15	108	Incluso

Tutti gli isolati di ESBL sono stati rilevati dal prodotto ESBL ELITe MGB® Kit a concentrazioni di 87 - 819 CFU / mL.

L'efficienza di rilevazione delle diverse varianti dei geni per la resistenza agli antibiotici carbapenemici è stata inoltre verificata con un set di 24 isolati ESBL caratterizzati. Ogni campione è stato diluito in eNAT™ kit e poi testato con ESBL ELITe MGB® Kit e ELITe InGenius® system in modalità Extraction + PCR. Gli isolati culturali sono rappresentativi dei differenti generi di *Enterobacteriaceae* (e.g. *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*).

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

**Tabella 15**

Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
Isolati culturali CTX-M-1 positivi	1	1	0	0
Isolati culturali CTX-M-3 positivi	2	2	0	0
Isolati culturali CTX-M-14 positivi	3	3	0	0
Isolati culturali CTX-M-15 positivi	18	18	0	0

Tutti gli isolati di ESBL sono stati rilevati dal prodotto ESBL ELITe MGB Kit.

#### Marcatori potenzialmente interferenti

Per valutare la potenziale cross-reattività del saggio con target diversi da quelli specifici, è stata effettuata un'analisi *in silico* delle sequenze disponibili in banche dati nucleotidiche.

L'analisi dell'allineamento di sequenze degli oligonucleotidi di innesco e delle sonde con quelle disponibili nelle banche dati nucleotidiche, comprendenti organismi normalmente presenti in campioni clinici come i comuni organismi opportunistici della flora batterica rettale, virus, cellule, parassiti intestinali e organismi correlati produttori di beta-lattamasi, ha dimostrato l'assenza di omologie significative e quindi di marcatori potenzialmente interferenti.

L'assenza di cross-reattività con altri organismi potenzialmente presenti in tamponi rettali è stata verificata testando in triplicato gli isolati indicati nella tabella sottostante alla concentrazione di  $10^6$  CFU / mL.

**Tabella 16 Marcatori potenzialmente Interferenti del prodotto ESBL ELITe MGB Kit**

Organismi	Isolati	Concentrazione (CFU/mL)	Risultato
K. pneumoniae	ATCC 700603	$10^6$	No cross-reactivity
E. coli	ATCC BAA-201	$10^6$	No cross-reactivity
S. marcescens	UCLA 14-13-A11	$10^6$	No cross-reactivity
A. baumannii	NCTC 13301	$10^6$	No cross-reactivity
A. Iwoffii	ATCC 15309	$10^6$	No cross-reactivity
B. adolescentis	ATCC 15703	$10^6$	Nessuna cross-reattività
B. longum	ATCC 15707	$10^6$	Nessuna cross-reattività
C. jejuni	ATCC 33292	$10^6$	Nessuna cross-reattività
C. albicans	Zeptometrix Z006	$10^6$	Nessuna cross-reattività
C. freundii	ATCC 8090	$10^6$	Nessuna cross-reattività
C. difficile	ATCC 43593	$10^6$	Nessuna cross-reattività
C. perfringens	ATCC 13124	$10^6$	Nessuna cross-reattività
P. mirabilis	ATCC 12453	$10^6$	Nessuna cross-reattività
P. aeruginosa	ATCC 27853	$10^6$	Nessuna cross-reattività
S. enterica	ATCC 700720	$10^6$	Nessuna cross-reattività

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

### Sostanze interferenti

Sostanze potenzialmente interferenti alla più alta concentrazione clinicamente rilevante sono state aggiunte singolarmente a campioni di matrici rettali negative contenenti isolati ESBL alla concentrazione di circa 3x LoD. Le sostanze testate sono: clisteri (olio di vaselina), lubrificante spermicida (Nonoxynol-9), Medicinali Anti-diarrea (Loperamide Cloridrato, Bismuto sub-salicilato), lassativi (Sennosidi), antibiotici (Vancomicina), anti acidi (acido alginico / alluminio idrossido / magnesio tri-silicato, Calcio Carbonato), componenti fecali (Acido Palmitico, Acido stearico, Mucine, sangue intero umano). Un isolato per i seguenti tipi di gene target, CTX-M-1, CTX-M-9 e CTX-M-15, è stato testato in triplicato con ESBL ELITe MGB Kit e il sistema ELITe InGenius.

Il test ha mostrato che la presenza di sostanze potenzialmente interferenti alla più alta concentrazione clinicamente rilevante non causa risultati falsi negativi.

La possibile interferenza del 2-propanolo, utilizzato durante l'estrazione, con la reazione di amplificazione è stata valutata testando DNA estratto da matrici rettali negative contenenti isolati ESBL alla concentrazione di circa 3x LoD. Un isolato per ogni tipo di gene target (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14 e CTX-M-15) è stato testato in triplicato con ESBL ELITe MGB Kit e il sistema ELITe InGenius.

Il test ha mostrato che la presenza del 2-propanolo sotto il 10% non causa risultati falsi negativi.

### Assenza di cross-contaminazione

L'assenza di cross-contaminazione tra campioni positivi e campioni negativi nella sessione e tra sessioni, è stata verificata eseguendo tre sessioni integrate (estrazione del DNA dal tubo primario e amplificazione) con sei campioni fortemente positivi per un isolato CTX-M-1 ad un titolo di 106 CFU / mL in matrice rettale negativa in medium eNAT™ alternati a 6 campioni di matrice rettale negativa in medium eNAT™.

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

## Errore totale di sistema

L'errore totale di sistema che porta a risultati falsi negativi è stato verificato analizzando 50 campioni di matrice rettale negativa positivizzata con un isolato CTX-M-9 ed è risultato uguale a 0%.

I 50 campioni di matrice rettale negativa sono stati positivizzati con un isolato CTX-M9 ad una concentrazione finale di circa tre volte l'LoD (87 CFU / mL). Ogni campione del pannello è stato testato per l'intera procedura di analisi, estrazione ed amplificazione, partendo dal tubo primario con il sistema ELITe InGenius.

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

## Ripetibilità

La ripetibilità del saggio è stata valutata su ELITe InGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di tamponi rettali, inclusi un campione negativo e tre campioni positivizzati con materiale di riferimento (ceppi ESBL CTX-M-1, CTX-M-9 e CTX-M-15) a 3x LoD.

Un riassunto dei risultati del test di Ripetibilità su ELITe InGenius è mostrato nelle tabelle seguenti.

**Tabella 17 Ripetibilità Intra - Sessione con ELITe InGenius**

Target	Sessione	Ct medio	SD	%CV
CTX-M-1	Giorno 1	33,99	0,60	1,77
	Giorno 2	34,40	0,56	1,62
CTX-M-9	Giorno 1	34,95	0,85	2,43
	Giorno 2	35,34	0,43	1,21
CTX-M-15	Giorno 1	32,46	0,46	1,43
	Giorno 2	32,58	0,18	0,56
IC	Giorno 1	27,29	0,43	1,56
	Giorno 2	27,22	0,22	0,80

**Tabella 18 Ripetibilità Inter - Sessione con ELITe InGenius**

Target	Sessione	Ct medio	SD	%CV
CTX-M-1	Giorno 1 + 2	34,19	0,60	1,76
CTX-M-9	Giorno 1 + 2	35,14	0,68	1,94
CTX-M-15	Giorno 1 + 2	32,52	0,35	1,07
IC	Giorno 1 + 2	27,25	0,33	1,21

La ripetibilità del saggio è stata valutata su ELITe BeGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di tamponi rettali, inclusi un campione negativo e quattro campioni positivizzati con materiale di riferimento per ciascun ceppo a 3xLoD.

Un esempio dei risultati del test di Ripetibilità su ELITe BeGenius è mostrato nelle tabelle seguenti.

**Tabella 19 Ripetibilità Intra - Sessione con ELITe BeGenius**

Campione	N	CTX-M1-9-14-15			% Concordanza
		Ct medio	SD	% CV	
3x LoD CTX-M-1	6	33,72	0,47	1,39	100%
3x LoD CTX-M-9	6	32,38	0,31	0,97	100%
3x LoD CTX-M-14	6	34,43	0,34	0,98	100%
3x LoD CTX-M-15	6	33,16	0,31	0,94	100%
Negativo	6	-	-	-	100%

**Tabella 20 Ripetibilità Inter- Sessione con ELITe BeGenius**

Campione	N	CTX-M1-9-14-15			% Concordanza
		Ct medio	SD	% CV	
3x LoD CTX-M-1	12	33,43	0,49	1,46	100%
3x LoD CTX-M-9	12	32,20	0,44	1,36	100%
3x LoD CTX-M-14	12	34,45	0,36	1,04	100%
3x LoD CTX-M-15	12	33,20	0,26	0,79	100%
Negativo	12	-	-	-	100%

Nel test di Ripetibilità, ESBL 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%.

### Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata valutata su ELITe InGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di tamponi rettali, inclusi un campione negativo e tre campioni positivizzati con materiale di riferimento (ceppi ESBL CTX-M-1, CTX-M-9 e CTX-M-15) a 3x LoD.

Un riassunto dei risultati del test di Riproducibilità su ELITe InGenius è mostrato nelle tabelle seguenti.

**Tabella 21 Riproducibilità Inter - Lotto con ELITe InGenius**

Target	Ct medio	SD	%CV
CTX-M-1	33,99	0,58	1,70
CTX-M-9	35,30	0,60	1,70
CTX-M-15	33,30	0,33	1,00
IC	27,58	0,78	2,82

**Tabella 22 Riproducibilità inter-Strumento con ELITe InGenius**

Target	Ct medio	SD	%CV
CTX-M-1	33,86	0,49	1,46
CTX-M-9	35,26	0,69	1,96

**Tabella 22 Riproducibilità inter-Strumento con ELITe InGenius (segue)**

Target	Ct medio	SD	%CV
CTX-M-15	33,32	0,46	1,37
IC	27,97	0,75	2,67

La riproducibilità del saggio è stata valutata su ELITe BeGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di tamponi rettali, inclusi un campione negativo e quattro campioni positivizzati con materiale di riferimento per ciascun ceppo a 3xLoD.

Un esempio dei risultati del test di Riproducibilità su ELITe BeGenius è mostrato nelle tabelle seguenti.

**Tabella 23 Riproducibilità Inter - Lotto con ELITe BeGenius**

Campione	N	CTX-M1-9-14-15			% Concordanza
		Ct medio	SD	% CV	
3x LoD CTX-M-1	12	33,15	0,32	0,97	100%
3x LoD CTX-M-9	12	32,09	0,37	1,14	100%
3x LoD CTX-M-14	12	34,61	0,41	1,19	100%
3x LoD CTX-M-15	12	32,86	0,44	1,35	100%
Negative	12	-	-	-	100%

**Tabella 24 Riproducibilità Inter - Strumento con ELITe BeGenius**

Campione	N	CTX-M1-9-14-15			% Concordanza
		Ct medio	SD	% CV	
3x LoD CTX-M-1	12	33,44	0,42	1,26	100%
3x LoD CTX-M-9	12	32,18	0,39	1,23	100%
3x LoD CTX-M-14	12	34,59	0,50	1,46	100%
3x LoD CTX-M-15	12	32,70	0,45	1,39	100%
Negative	12	-	-	-	100%

Nel test di Riproducibilità, ESBL 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%.

#### Specificità Diagnostica: conferma dei campioni negativi

La Specificità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata in associazione ad ELITe InGenius analizzando campioni clinici di tamponi rettali e di emocoltura negativi per ESBL. 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 25 Specificità Diagnostica**

Campione	N	Positivi	Negativi	Invalidi	Specificità Diagnostica %
Tamponi rettali ESBL-negativi	54	0	54	0	100%
Emoculture ESBL-negative	37	2	35	0	95%

Per il Controllo Interno è stato definito un cut-off del valore di 31 per tamponi rettali ed emoculture in associazione a ELITe InGenius e ELITe BeGenius.

**Sensibilità Diagnostica: conferma dei campioni positivi**

La Sensibilità Diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata in associazione ad ELITe InGenius analizzando campioni clinici di tamponi rettali positivi per ESBL o positivizzati con isolati ESBL e campioni di emocoltura positivi per ESBL.

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	Invalidi	Sensibilità Diagnostica %
Tamponi rettali CTX-M-1 o CTX-M-15 positivi	38	38	0	0	99,3%
Tamponi rettali CTX-M-9 o CTX-M-14 positivi	9	9	0	0	
Tamponi rettali CTX-M-1-15 e CTX-M-9-14 positivi	4	3	1	0	
Tamponi rettali positivizzati per CTX-M-1 (isolato DICON-091)	24	24	0	0	
Tamponi rettali positivizzati per CTX-M-9 (isolato DICON-055)	24	24	0	0	
Tamponi rettali positivizzati per CTX-M-14 (isolato DICON-045)	24	24	0	0	
Tamponi rettali positivizzati per CTX-M-15 (isolato NCTC134)	24	23	0	1	
Emoculture positive	51	51	0	0	100 %

## NOTA

I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e lo strumento sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "ESBL ELITe MGB Kit", FTP RTS201ING.

## 12 BIBLIOGRAFIA

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

## 13 LIMITI DELLA PROCEDURA

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

Al momento, non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con altri campioni clinici.

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

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.

E' necessario disporre di arre separate per l'estrazione/preparazione delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione/rilevazione dei prodotti di amplificazione al fine di prevenire 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 del target non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione, ma non si può escludere che il DNA del target abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (si veda [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 18](#)). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

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.

Sebbene rari, possibili polimorfismi, nella regione del genoma batterico coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione del DNA target.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati 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 27**

<b>Reazione del Controllo Positivo non valida</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
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 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 28**

<b>Reazione del Controllo Negativo non valida</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
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 29**

<b>Reazione del campione non valida</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
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 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 30**

<b>Errore nel calcolo del Ct</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
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 31**

<b>Alto tasso anormale di risultati positivi nella stessa sessione (reazioni con valori Ct tardivi simili)</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
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 (compresa 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'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](mailto: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 brevetti EP numero 1781675, 1789587, 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.

## Appendix A      ESBL 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](http://www.elitechgroup.com)

### INTENDED USE

The product **ESBL ELITe MGB® Kit** product 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 the DNA of Extended Spectrum Beta-Lactamase **CTX-M-1**, **CTX-M-9**, **CTX-M-14** and **CTX-M-15\*** genes of *Enterobacteriaceae* in DNA samples extracted from rectal swabs and blood culture.

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 rectal swabs and blood culture.

The product is intended for use in the diagnosis and screening of infections of Enterobacteria positive for Extended Spectrum Beta-Lactamase genes, together with the patient's clinical data and other laboratory test results.

The product is also compatible for the characterization of Enterobacteriaceae positive for Extended Spectrum Beta-Lactamase genes in DNA samples extracted from cultural isolates.

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

\*For the complete list of gene variants detected by this product, please, refer to the "Performance Characteristics" chapter.

### Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
CTX-M-1 and CTX-M-15	Extended Spectrum Beta-Lactamase CTX-M-1 and CTX-M-15	AP593	CTX-M1-9-14-15
CTX-M-9 and CTX-M-14	Extended Spectrum Beta-Lactamase CTX-M-9 and CTX-M-14	AP593	CTX-M1-9-14-15
Internal Control	artificial sequence IC2	AP525	IC

### Validated matrices

› Rectal swab collected in eNAT™ kit
› Rectal swab collected in FecalSwab™ kit
› Blood Culture

## Kit content and related products

ESBL ELITe MGB Kit (RTS201ING)	ESBL- ELITe Positive Control (CTR201ING)
 X 8	 X 3
ESBL PCR Mix 8 tubes of 280 µL 12 reactions per tube 96 reactions per kit 7 freeze-thaw cycles per tube	ESBL Positive Control 3 tubes of 160 µL 4 reactions per tube 12 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles
Maximum shelf-life:	<b>24 months</b>
Storage temperature	<b>≤ -20°C</b>

## Other products required not provided in the kit

› ELITe InGenius instrument: INT030.	› CPE - Internal Control: CTRCPE
› ELITe BeGenius instrument: INT040.	› eNAT™ kit (Copan, ref.606CS01R),
› ELITe InGenius SP 200: INT032SP200.	› FecalSwab™ (COPAN, ref. 470CE)
› ELITe InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS.	
› ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR.	
› ELITe InGenius Waste Box: F2102-000.	
› 300 µL Filter Tips Axigen: TF-350-L-R-S.	
› 1000 µL Filter Tips TECAN: 30180118.	

## ELITe InGenius and ELITe BeGenius Protocol

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

## ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performances

Matrix	Target	Limit of Detection	Sensitivity	Specificity
Rectal swab	CTX-M-1	55	99.3%	100%
	CTX-M-9	29		
	CTX-M-14	273		
	CTX-M-15	36		
Blood Culture	CTX-M-1	55	100%	95%
	CTX-M-9	29		
	CTX-M-14	273		
	CTX-M-15	36		

## 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.

Specimen	Collection requirements	Transport/Storage conditions			
		+16 / +26 °C (room temperature)	+2 / +8 °C	- 20 ± 10 °C	- 70 ± 15 °C
blood culture	-	≤ 24 hours	-	-	-
rectal swab	collected in <b>eNAT™ kit</b>		≤ 1 month	≤ 6 months	>6 months
rectal swab	collected in <b>FecalSwab™ kit*</b>		≤ 3 days	-	-

Before the analysis dilute the blood culture sample 1:1000 in ultrapure water (at least 10 µL of samples into 10 mL of ultrapure water), mix by vortexing and transfer 0.2 mL of the diluted samples into an Extraction tube (for ELITe InGenius instrument) or into a 2 mL Sarstedt tube (for ELITe BeGenius instrument).

Before the analysis of rectal swab 0.5 mL of sample in FecalSwab™ medium has to be transferred in a fresh eNAT™ tube with 2.0 mL of medium, mixed by vortexing. The samples diluted in eNAT™ medium can be stored as reported in table above. After addition of 0.5 mL of sample in FecalSwab™ medium, the eNAT™ tube can be directly loaded in the system as a primary tube.

## ELITe InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface 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 " <b>CLOSED</b> ".	2. Verify controls: <b>Positive Control</b> and <b>Negative Control</b> in the "Controls" menu.  Note: Both must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the <b>PCR Mix</b> and the <b>CTRCPE</b> 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: ESBL ELITe_RcS_200_100 or ESBL ELITe_BC_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 Cassettes, ELITe InGenius SP 200 extraction cartridges, and all required consumables and samples to be extracted	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: ESBL ELITe_Rcs_200_100 or ESBL ELITe_BC_200_100 or ESBL ELITe_PC or ESBL ELITe_NC	5. Select the method "PCR Only" and the sample position "Elution Tube"	6. Load the PCR Mix in the Inventory Block
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks	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 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 " <b>CLOSED</b> ".	2. Verify controls: <b>Positive Control</b> and <b>Negative Control</b> in the "Controls" menu.  Note: Both must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the <b>PCR Mix</b> and the <b>CTRCPE</b> 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: ESBL ELITe_Be_Rcs_200_100 or ESBL ELITe_Be_BC_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 Rack" 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: ESBL ELITe_Be_RcS_200_100 or ESBL ELITe_Be_BC_200_100 or ESBL ELITe_Be_PC or ESBL ELITe_Be_NC	5. Load the PCR-Mix in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette"
7. Close the door. Start the run	8. View, approve and store the results	

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