



## NOTICE of CHANGE dated 19/01/2023

### IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

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

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

- *Update to be in compliance with the Regulation (EU) 2017/746 and the Standard ISO 15223-1:2021 requirements.*
- *Composition, use and performance of the product remain unchanged.*
- *The following lot numbers still on the market have been commercialized as IVDD. According to Article 110 of the IVDR they will not be recalled and they will still be commercialized as per their expiration dates:*

PRODUCT REF	Lot Number	Expiry date
RTS202ING-48	U1222-035	December 2024
CTR202ING	U0123-014	January 2025
CTR202ING	U0821-030	March 2023

## PLEASE NOTE



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



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



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



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



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



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



**COLISTIN-R ELITe MGB® Kit**  
reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS202ING-48



UDI 08033891486662

**ÍNDICE**

USO PREVISTO  
 PRINCIPIO DEL ENSAYO  
 DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO  
 MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO  
 MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO  
 OTROS PRODUCTOS NECESARIOS  
 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES  
 MUESTRAS Y CONTROLES  
 PROCEDIMIENTO  
 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO  
 BIBLIOGRAFÍA  
 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO  
 PROBLEMAS Y SOLUCIONES  
 SÍMBOLOS  
 NOTA PARA LOS USUARIOS  
 AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

página 1  
 página 2  
 página 3  
 página 3  
 página 3  
 página 3  
 página 4  
 página 5  
 página 6  
 página 11  
 página 15  
 página 15  
 página 16  
 página 18  
 página 19

**USO PREVISTO**

El producto **COLISTIN-R ELITe MGB® Kit** es un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* concebido para su uso por parte de profesionales sanitarios como ensayo cualitativo de amplificación de ácidos nucleicos para la detección y la amplificación de ADN de los genes *mcr-1* y *mcr-2* de resistencia transmisible a la colistina de enterobacterias de muestras clínicas.

El ensayo se ha validado con el instrumento **ELITe InGenius®**, un sistema integrado y automatizado para la extracción, la PCR en tiempo real y la interpretación de resultados a partir de hisopados rectales.

El producto se utiliza como ayuda en el diagnóstico de infecciones por enterobacterias positivas para los genes de resistencia transmisible a la colistina, junto con los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

**COLISTIN-R ELITe MGB® Kit**  
reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS202ING-48

**PRINCIPIO DEL ENSAYO**

El ensayo consiste en la realización de una reacción de amplificación múltiple en tiempo real con el **ELITe InGenius**, un sistema integrado y automatizado para la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos, así como para la interpretación de los resultados.

A partir del ADN extraído de cada muestra analizada, se realizan reacciones de amplificación específicas de los siguientes genes de resistencia a la colistina en el cartucho de PCR:

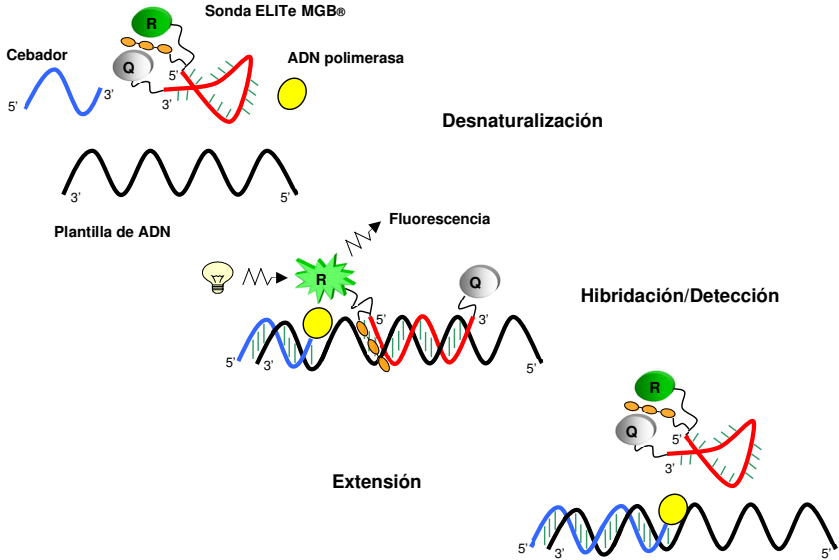
- gen *mcr-1*, detectado por una sonda específica leída en el canal **mcr1** (canal 5),
- gen *mcr-2*, detectado por una sonda específica leída en el canal **mcr2** (canal 1).

Además, la reacción de amplificación específica del control interno exógeno de extracción e inhibición, que está basada en una secuencia artificial (IC2), se realiza y detecta mediante una sonda específica que se lee en el canal **IC** (canal 2).

Las sondas que cuentan con la tecnología **ELITe MGB®** se activan cuando se hibridan con el producto específico de la reacción de amplificación. A medida que aumenta el producto específico de la reacción de amplificación, la emisión de fluorescencia también aumenta y el instrumento la mide y la registra. Al finalizar la sesión de amplificación, los gráficos de fluorescencia se analizan para identificar los ciclos umbral (Ct). La interpretación de los resultados permite detectar la presencia de los genes *mcr-1* y *mcr-2* de resistencia transmisible a la colistina en la muestra inicial.

El ensayo se ha validado con el instrumento **ELITe InGenius**.

En la siguiente ilustración se muestra de manera resumida el mecanismo de activación y la emisión de fluorescencia de la sonda de tecnología **ELITe MGB®**. Tener en cuenta que la sonda no se hidroliza durante el ciclo de amplificación, por lo que puede utilizarse para el análisis de la curva de disociación.



**DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO**

El producto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit** incluye la **COL PCR Mix**, una mezcla completa lista para usar para la amplificación en tiempo real dividida en alícuotas en cuatro probetas. Cada probeta contiene **280 µL** de solución, suficiente para **12 análisis** en condiciones óptimas de consumo de reactivos (con al menos 2 análisis por sesión) cuando se usa con el sistema **ELITE InGenius**.

La mezcla de PCR de COL incluye los siguientes componentes:

- Los cebadores y la sonda específicos del gen **mcr-1**. La sonda **mcr1** se marca con el fluoróforo AP639, se estabiliza con el grupo MGB® y se inactiva en una porción no fluorescente. La sonda se detecta en el canal **mcr-1** (canal 5) del sistema **ELITE InGenius**.
- Los cebadores y la sonda específicos del gen **mcr-2**. La sonda **mcr2** se marca con el fluoróforo FAM, se estabiliza con el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente. La sonda se detecta en el canal **mcr-2** (canal 1) del sistema **ELITE InGenius**.
- Los cebadores y la sonda específicos de la secuencia artificial **IC2** del control interno exógeno. La sonda **IC** se marca con el fluoróforo AP525, se estabiliza con el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente. La sonda se detecta en el canal **IC** (canal 2) del sistema **ELITE InGenius**.

La mezcla COL PCR Mix también contiene la solución tampón, el cloruro de magnesio, los nucleótidos-trifosfatos, los estabilizadores y la enzima Taq ADN polimerasa con activación térmica («hot start»).

El producto permite efectuar **48 análisis con el sistema ELITE InGenius**, incluidos los controles.

**MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO**

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de peligros
COL PCR Mix	Mezcla completa de reacción tapón blanco	4 x 280 µL	-

**MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO**

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Agitadora vorticial.
- Microcentrifugadora de mesa (12.000–14.000 rpm).
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosoles o puntas estériles de desplazamiento positivo (2–20 µL, 5–50 µL, 50–200 µL, 200–1000 µL).
- Agua de calidad para biología molecular.

**OTROS PRODUCTOS NECESARIOS**

Los reactivos para la extracción del ADN de las muestras que deben analizarse, el control interno de extracción, el control positivo de amplificación y los consumibles **no** están incluidos en el volumen de suministro de este producto.

Para el análisis automático de las muestras, es necesario utilizar el instrumento **ELITE InGenius** (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) y los siguientes protocolos de ensayo específicos (ELITechGroup S.p.A.):

- parámetros para la amplificación del control positivo «**COL-R ELITE\_PC**»,
- parámetros para la amplificación del control negativo «**COL-R ELITE\_NC**»,
- parámetros para las muestras de que van a analizarse «**COL-R ELITE\_RcS\_200\_100**».

Con el instrumento **ELITE InGenius**, es necesario utilizar los siguientes productos genéricos:

- cartuchos de extracción **ELITE InGenius® SP 200** (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),
- consumibles para extracción **ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set** (ELITechGroup S.p.A. ref. INT032CS),
- cartuchos de amplificación **ELITE InGenius® PCR Cassette** (ELITechGroup S.p.A., ref. INT035PCR),
- puntas «**00 µL Filter Tips Axygen** (Axygen BioScience Inc., CA, ref. TF-350-L-R-S),
- cajas **ELITE InGenius® Waste Box** (ELITechGroup S.p.A., ref. F2102-000).

Como plantilla de control interno de extracción e inhibición, es necesario utilizar el producto genérico **CPE - Internal Control** (EG SpA, ref. CTRCPE), que es una solución estabilizada que contiene ADN plasmídico y el ARN genómico del bacteriófago MS2.

Como plantilla de control positivo de amplificación, es necesario utilizar el producto específico «**COLISTIN-R - ELITE Positive Control** (EG SpA, ref. CTR202ING). Se trata de una solución estabilizada de ADN plasmídico.

Como dispositivo de recogida para las muestras de exudados, se necesitan los siguientes productos genéricos

- Kit **eSWAB®** (COPAN Italia S.p.A., ref. 480CE), exudado y vial con 1 mL de medio de transporte o un dispositivo equivalente.

Para la dilución de muestras de frotis rectal, se requiere el siguiente producto genérico:

- Kit **eNAT®** (COPAN Italia S.p.A., ref. 606CS01R), exudado y vial con 2 mL de medio desnaturalizador.

**ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

**Este producto está concebido para utilizarlo en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.**

**Advertencias y precauciones generales**

Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si fueran potencialmente infecciosas. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. No derramar ni rociar ningún producto. Los materiales que entran en contacto con las muestras biológicas deben tratarse durante al menos 30 minutos con hipoclorito de sodio al 3%, o tratarse en autoclave durante una hora a 121°C antes de su eliminación.

Manipular y eliminar todos los reactivos y materiales utilizados para realizar el ensayo como si fueran potencialmente infecciosos. Evitar el contacto directo con los reactivos. No derramar ni rociar ningún producto. Los residuos deben tratarse y eliminarse conforme a las normas de seguridad aplicables. El material desechable combustible debe incinerarse. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben neutralizarse antes de eliminarlos.

Usar ropa de protección y guantes adecuados y protegerse los ojos y la cara.

No pipetear ninguna solución con la boca.

No comer, beber, fumar ni aplicarse cosméticos en el área de trabajo.

Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.

Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos conforme a las normas vigentes.

Antes de realizar el ensayo, leer atentamente todas las instrucciones proporcionadas con el producto.

Para realizar el ensayo, seguir las instrucciones proporcionadas con el producto.

No utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada.

Utilizar únicamente los reactivos incluidos en el volumen de suministro del producto y los recomendados por el fabricante.

No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

**Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular**

Con el fin de evitar el riesgo de resultados incorrectos, sobre todo debido a la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o a la contaminación de estas con productos de amplificación, para los procedimientos de biología molecular se requiere personal cualificado.

Es necesario disponer de batas, guantes y herramientas expresamente destinados a la sesión de trabajo de que se trate.

Las muestras deben ser aptas y, en la medida de lo posible, estar destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben destinarse exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN.

Los cartuchos de PCR deben manipularse evitando la dispersión del producto de amplificación en el entorno, así como la contaminación de muestras y reactivos.

**Advertencias y precauciones específicas de los componentes**

La **COL PCR Mix** debe conservarse a -20°C en un lugar protegido de la luz.

**COLISTIN-R ELITE MGB® Kit**  
reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS202ING-48

La **COL PCR Mix** debe utilizarse en el plazo de un mes a partir de la primera apertura del tubo.  
La **COL PCR Mix** puede congelarse y descongelarse un máximo de **siete veces**: más ciclos de congelación y descongelación pueden reducir el rendimiento del producto.

**MUESTRAS Y CONTROLES**

**Muestras**

Este producto se ha validado para utilizarlo con las siguientes muestras clínicas:

**Exudados rectales recogidos en un medio eSwab®** (COPAN Italia S.p.A., ref. 480CE)

Los exudados rectales para la extracción de ADN deben recogerse en un medio eSwab® e identificarse de acuerdo con las directrices para laboratorios, así como transportarse y conservarse a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) durante un máximo de 24 horas, o transportarse y conservarse de +2°C a +8°C durante un máximo de 48 horas. Antes de realizar análisis con este producto, es necesario transferir 0,25 mL de medio eSwab® a una probeta nueva de eNAT® con 2,0 mL de medio que, a continuación, debe mezclarse en una agitadora vortical.

eNAT conserva los ácidos nucleicos durante cuatro semanas a temperatura ambiente y durante seis meses a -20 °C y -70 °C. Tras añadir 0,25 mL de muestra en el medio eSwab, la probeta de eNAT puede cargarse directamente en el sistema **ELITE InGenius** como probeta primaria.

**Nota:** para la extracción de ADN a partir de hisopados rectales utilizando el sistema **ELITE InGenius** y la versión 1.3 del **ELITE InGenius software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de ensayo «**COL-R ELITE\_Rcs\_200\_100**». Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el control interno **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

El ADN extraído puede conservarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C durante 16 horas, o a -20 °C durante un mes.

**Nota:** las muestras con un alto nivel de turbidez deben tratarse tal como se indica en el capítulo de resolución de problemas.

**Sustancias interferentes**

Los datos disponibles relativos a la inhibición causada por medicamentos y otras sustancias se incluyen en la sección «Sustancias interferentes» del capítulo «Características de rendimiento».

Tenga en cuenta que un alto contenido de matriz fecal recogida con exudado rectal (muestra con una alta turbidez) puede inhibir el ensayo.

**Controles de amplificación**

Antes de analizar una muestra con el sistema **ELITE InGenius**, es indispensable generar y aprobar los controles de amplificación para el lote de reactivos de amplificación que se utilizará en el análisis:

Como control positivo de amplificación, utilizar el reactivo del producto **COLISTIN-R - ELITE Positive Control** (no incluido en el volumen de suministro de este kit) junto con el protocolo de ensayo **COL-R ELITE\_PC**.

Como control negativo de amplificación, utilizar agua de calidad para biología molecular (no incluida en el volumen de suministro de este kit) junto con el protocolo de ensayo **COL R ELITE\_NC**.

**Nota:** El sistema **ELITE InGenius** requiere resultados aprobados y válidos de los controles de amplificación para cada lote de reactivos de amplificación guardado en su base de datos. Los resultados de los controles de amplificación, aprobados y guardados en la base de datos, caducan **después de 15 días**. Al llegar a la fecha de caducidad, es necesario volver a procesar los controles positivo y negativo con el lote de reactivos de amplificación utilizado.

Además, los controles de amplificación también deben volver a procesarse en los siguientes casos:

- Se utiliza un nuevo lote de reactivos de amplificación.
- Los resultados de los análisis de control (consultar el apartado siguiente) se encuentran fuera de las especificaciones.
- Se realiza una operación importante de mantenimiento en el instrumento **ELITE InGenius**.

**Material de referencia certificado**

La rastreabilidad metrológica de los calibradores y del material de control para los valores de mcr-1 no puede aplicarse por completo al producto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit**, pues no se dispone de ningún material de referencia de la OMS.

**COLISTIN-R ELITE MGB® Kit**  
reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS202ING-48

La rastreabilidad metrológica de los calibradores y del material de control para los valores de mcr-2 no puede aplicarse por completo al producto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit**, pues no se dispone de ningún material de referencia de la OMS.

**controles de calidad**

Se recomienda validar periódicamente todo el procedimiento de extracción y amplificación. Se pueden utilizar muestras ya analizadas o material de referencia certificado.

**PROCEDIMIENTO**

El procedimiento para utilizar el producto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit** con el sistema **ELITE InGenius** comprende tres pasos:

- Verificación de la disponibilidad del sistema.
- Configuración de la sesión.
- Revisión y exportación de los resultados.

**Verificación de la disponibilidad del sistema**

Antes de iniciar la sesión, es necesario realizar las siguientes tareas siguiendo las indicaciones de la documentación del instrumento:

- Encender el **ELITE InGenius** y seleccionar el modo de inicio de sesión «**CLOSED**»,
- Comprobar que los controles de amplificación (controles, control positivo de COL y control negativo de COL) se han procesado con el lote de reactivos de amplificación pertinente y que los resultados se han aprobado y son válidos (estado). Si no se dispone de resultados aprobados o válidos de los controles de amplificación, es necesario generarlos tal como se indica en los siguientes apartados.
- Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario para configurar la sesión y utilizando los protocolos de ensayo proporcionados por ELITechGroup S.p.A. Estos protocolos de diagnóstico *in vitro* se validaron específicamente con el producto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit**, el instrumento **ELITE InGenius** y la matriz mencionada.

En la siguiente tabla, se describe el protocolo de ensayo disponible para el análisis de las muestras con el producto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit**.

Protocolo de ensayo para el producto COLISTIN-R ELITE MGB Kit			
Nombre	Matriz	Informe	Características
COL-R ELITE_Rcs_200_100	Exudado rectal	Positivo/Negativo	Volumen de entrada de extracción: 200 µL Volumen del eluido de extracción 100 µL Control interno: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de entrada de PCR de la muestra: 20 µL

Si el protocolo de ensayo deseado no está cargado en el sistema, contactar con el servicio de atención al cliente de ELITechGroup más cercano.

**Configuración de la sesión**

El producto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit** puede utilizarse con el sistema **ELITE InGenius** para realizar las siguientes tareas:

- A. Sesión integrada (modo de procesamiento «Extract + PCR»).
- B. Sesión de amplificación (modo de procesamiento «PCR Only»).
- C. Sesión de amplificación para el control positivo y el control negativo (modo de procesamiento «PCR Only»).

Todos los parámetros necesarios para la sesión están incluidos en el protocolo de ensayo disponible en el instrumento y se abren automáticamente al seleccionar el protocolo de ensayo.

**Nota:** El sistema **ELITE InGenius** puede conectarse al sistema de información de ubicaciones (LIS, «Location Information Server»), que permite cargar la información de la sesión de trabajo. Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del instrumento.

A continuación, se describen los pasos principales para configurar los tres tipos de sesión.

#### A. Sesión integrada

Para configurar una sesión integrada con la extracción y amplificación de la muestra, seguir las instrucciones de la interfaz de usuario que se indican a continuación:

1. Descongelar las probetas de COL PCR Mix para la sesión. Cada probeta es suficiente para 12 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos (con al menos 2 análisis por sesión). Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.

**Nota:** Descongelar la COL PCR Mix en un lugar oscuro, pues este reactivo es sensible a la luz.

2. Descongelar las probetas de CPE para la sesión. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Asegurarse de que el volumen de entrada de extracción («Extraction Input Volume») sea de 200 µL y el volumen de eluido extraído («Extraction Eluate Volume»), de 100 µL.
5. Para cada pista deseada, rellenar el ID de la muestra («Sample ID» o SID) escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
6. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p.ej., COL-R ELITE\_RcS\_200\_100).
7. Asegurarse de que el protocolo que se muestra sea «Extract + PCR».
8. En la columna «Sample Position», seleccionar la posición de carga de la muestra.
  - Si se utiliza una probeta primaria, seleccionar «Primary Tube».
  - Si se utiliza una probeta secundaria, seleccionar «Sonication Tube».Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar las mezclas de COL PCR Mix y de CPE en el bloque de inventario seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar los cartuchos de PCR, los cartuchos de extracción «ELITE InGenius SP 200», todos los consumibles y las muestras que deben extraerse en las posiciones indicadas en el paso 8, siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cerrar la puerta del instrumento.
13. Presionar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el sistema ELITE InGenius permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

**Nota:** Al finalizar la sesión, la muestra extraída que queda en la probeta de elución debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a -20°C durante un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

**Nota:** Al finalizar la sesión, los cartuchos de PCR que contienen los productos de reacción y los consumibles deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar los productos de reacción.

**Nota:** La mezcla de PCR puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 7 sesiones de trabajo de 3 horas cada una.

#### Serie de amplificación

Para configurar la sesión de amplificación a partir del ADN extraído, seguir las instrucciones de la interfaz de usuario que se indican a continuación:

1. Descongelar las probetas de las mezclas de COL PCR Mix para la sesión. Cada probeta es suficiente para 12 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos (con al menos 2 análisis por sesión). Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.

**Nota:** Descongelar la mezcla de PCR de COL en un lugar oscuro, pues este reactivo es sensible a la luz.

2. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
3. Aunque no vaya a realizarse la extracción, asegurarse de que el volumen de entrada de extracción («Extraction Input Volume») sea de 200 µL, y el volumen de eluido extraído («Extracted Eluate

Volume»), de 100 µL.

4. Para cada pista deseada, rellenar el ID de la muestra escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
5. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p.ej., COL-R ELITE\_RcS\_200\_100).
6. En la columna «Protocol», seleccionar «PCR Only».
7. Asegurarse de que la posición de carga de la muestra de la columna «Sample Position» sea «Elution Tube (fila inferior)». Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar la mezcla de PCR de COL en el bloque de inventario seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar los cartuchos de PCR y las muestras del ácido nucleico extraído siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cerrar la puerta del instrumento.
12. Presionar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el sistema ELITE InGenius permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

**Nota:** Al finalizar la sesión, la muestra extraída que queda debe extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20°C durante un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

**Nota:** Al finalizar la sesión, los cartuchos de PCR que contienen los productos de reacción y los consumibles deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar los productos de reacción.

**Nota:** La mezcla de PCR puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 7 sesiones de trabajo de 3 horas cada una.

#### B. Sesión de amplificación para el control positivo y el control negativo

Para configurar la sesión de amplificación para el control positivo y el control negativo, seguir las instrucciones de la interfaz de usuario que se indican a continuación:

1. Descongelar las probetas de las mezclas de COL PCR Mix para la sesión. Una probeta es suficiente para preparar 12 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos (con al menos 2 análisis por sesión). Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.

**Nota:** Descongelar la mezcla de COL PCR Mix en un lugar oscuro, pues este reactivo es sensible a la luz.

2. Descongelar la probeta del control positivo de COL para la sesión. Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter al menos 50 µL de agua de calidad para biología molecular en una probeta de elución, incluida en el volumen de suministro del producto «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».
4. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
5. En la pista deseada, seleccionar en la columna «Assay» el protocolo de ensayo que va a utilizarse.
6. Aunque no vaya a realizarse la extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL, y «Extracted Eluate Volume», a 100 µL.
7. Para el control positivo, seleccionar el protocolo de ensayo «COL-R ELITE\_PC» en la columna «Assay» y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad del control positivo de COL.
8. Para el control negativo, seleccionar el protocolo de ensayo «COL-R ELITE\_NC» y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad del agua de calidad para biología molecular.
9. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar la mezcla de COL PCR Mix en el bloque de inventario seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar/revisar las gradillas de puntas en el área de inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cargar los cartuchos «PCR Cassette», la probeta del control positivo de COL y la probeta del control

negativo siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.

13. Cerrar la puerta del instrumento.

14. Presionar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el sistema ELITE InGenius permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

**Nota:** Al finalizar la sesión, el control positivo que queda debe extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20°C. Evitar derramar la muestra extraída. El control negativo que queda debe eliminarse.

**Nota:** Al finalizar la sesión, los cartuchos de PCR que contienen los productos de reacción y los consumibles deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar los productos de reacción.

**Nota:** La mezcla de PCR puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 7 sesiones de trabajo de 3 horas cada una.

### Revisión y exportación de los resultados

Al finalizar la sesión, aparece automáticamente la pantalla «Results Display», en la que se muestran los resultados de la muestra/de los controles y la información relativa a la sesión. En esta pantalla, es posible aprobar el resultado, así como imprimir o guardar los informes («Sample Report» o «Track Report»). Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del instrumento.

**Nota:** El sistema ELITE InGenius puede conectarse al sistema de información de ubicaciones (LIS, «Location Information System»), que permite enviar los resultados de la sesión de trabajo al centro de datos del laboratorio. Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del instrumento.

El sistema ELITE InGenius genera los resultados con el producto COLISTIN-R ELITE MGB Kit mediante el siguiente procedimiento:

- Validación de los resultados de los controles positivo y negativo de la amplificación
- Validación de los resultados de las muestras
- Elaboración de los informes de resultados de las muestras

#### A. Validación de los resultados de los controles positivo y negativo de la amplificación

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por las sondas de los genes de resistencia (canales **mcr1** y **mcr2**) en las reacciones de amplificación del control positivo y del control negativo utilizando los parámetros incluidos en los protocolos de ensayo «COL-R ELITE\_PC» y «COL-R ELITE\_NC».

Los resultados de la amplificación del control positivo y del control negativo, específicos del lote de reactivos de amplificación, se guardan en la base de datos («Controls»). El personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst») puede consultar dichos resultados y aprobarlos siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario.

Los resultados de la amplificación de los controles positivo y negativo, específicos del lote de reactivos de amplificación, caducan **después de 15 días**.

El software del instrumento utiliza los resultados de las sesiones de amplificación de los controles positivo y negativo para configurar los gráficos de control, lo que permite controlar el rendimiento del paso de amplificación. Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del instrumento.

**Nota:** Si el resultado de los controles positivo o negativo de la amplificación no cumple los criterios de aceptación, el instrumento muestra el mensaje «Failed» en la pantalla «Controls» y no es posible aprobarlo. En este caso, es preciso repetir las reacciones de amplificación de los controles positivo o negativo.

**Nota:** Cuando el control positivo o el control negativo se procesan junto con las muestras que van a analizarse y el resultado no es válido, se invalida la sesión entera. En este caso, también es necesario repetir la amplificación de todas las muestras.

#### B. Validación de los resultados de las muestras

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por las sondas de los genes de resistencia (canales **mcr1** y **mcr2**) y por la sonda del control interno (canal **IC**) en las reacciones de amplificación de la muestra utilizando los parámetros incluidos en el protocolo de ensayo COL-R ELITE\_RcS\_200\_100.

Los resultados se muestran en los informes generados por el instrumento («Result Display»).

La sesión de la muestra puede aprobarse cuando se cumplen las dos condiciones que se indican en la siguiente tabla.

1) Control positivo	Estado
COL Positive Control	APROBADO
2) Control negativo	Estado
COL Negative Control	APROBADO

Para cada muestra, el sistema interpreta automáticamente el resultado del ensayo según el algoritmo del **software ELITE InGenius** y los parámetros del protocolo del ensayo.

En la siguiente tabla se incluyen los posibles mensajes de los resultados. Para cada muestra, el sistema muestra una combinación de mensajes y especifica si se han detectado o no los genes de resistencia a la colistina.

Resultado de la sesión de la muestra	Interpretación
mcr1: DNA detected.	<b>Se ha detectado ADN del gen mcr1</b> en la muestra. La muestra podría ser <b>resistente a la colistina</b> .
mcr2: DNA detected.	<b>Se ha detectado ADN del gen mcr2</b> en la muestra. La muestra podría ser <b>resistente a la colistina</b> .
mcr1: DNA not detected or below the LoD.	<b>No se ha detectado ADN del gen mcr1</b> en la muestra <b>o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo</b> . La muestra es negativa para este gen o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo. Si tampoco se detecta el gen mcr-2, puede que la muestra sea <b>sensible a la colistina</b> .
mcr2: DNA not detected or below the LoD.	<b>No se ha detectado ADN del gen mcr2</b> en la muestra <b>o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo</b> . La muestra es negativa para estos genes o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo. Si tampoco se detecta el gen mcr-1, puede que la muestra sea <b>sensible a la colistina</b> .
Invalid - Retest sample.	<b>Resultado no válido del ensayo</b> debido a un error en el control interno (extracción incorrecta, arrastre de inhibidores). El Ct del control interno era indeterminado o superior a 34 (cut-off IC = 34). Es necesario repetir el análisis.

Las muestras que el **software ELITE InGenius** notifica como «Invalid - Retest Sample» no son aptas para la interpretación de resultados. En este caso, el ADN del control interno no ha podido detectarse correctamente debido a problemas ocurridos durante los pasos de amplificación o extracción (degradación del ADN, reducción del título de ADN durante la extracción o arrastre de inhibidores en el eluido), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos.

Si el volumen del eluido es suficiente, la muestra extraída puede volver a analizarse, tal cual o diluida, con una sesión de amplificación en el modo de procesamiento «PCR Only». Si se produce un segundo resultado no válido, la muestra debe volver a analizarse a partir del paso de la extracción de una nueva alícuota en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Las muestras que se muestran como «mcr1 DNA Not Detected or below LoD» o «mcr2 DNA Not Detected or below LoD» son aptas para el análisis, pero no ha sido posible detectar el ADN de los genes de resistencia. En este caso, no puede descartarse que el ADN de los genes de resistencia esté presente en una concentración inferior al límite de detección del ensayo (consultar el apartado «Características de rendimiento»).

**Nota:** Los resultados obtenidos con este ensayo deben interpretarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Los resultados de la sesión de la muestra se guardan en la base de datos y, si son válidos, pueden ser aprobados («Result Display») por personal que tenga la cualificación de administrador o analista y siga las instrucciones de la interfaz de usuario. La ventana «Result Display» permite imprimir y guardar los resultados de la sesión de la muestra como «Sample Report» y como «Track Report».

### C. Exportación de los resultados de la muestra

Los resultados de las muestras se guardan en la base de datos y pueden exportarse como «Sample Report» y como «Track Report».

En «Sample Report», se muestran los detalles de una sesión de trabajo ordenados por la muestra seleccionada (SID).

En «Track Report», se muestran los detalles de una sesión de trabajo ordenados por la pista seleccionada.

El personal autorizado puede imprimir y firmar los informes «Sample Report» y «Track Report».

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### Límite de detección (LoD)

El límite de detección del ensayo (LoD) se ha definido utilizando muestras de exudados rectales y el sistema ELITE InGenius.

Se prepararon seis niveles de diluciones de un material de referencia de *E. coli* positivo para *mcr-1* (cepa DSM 105182, equivalente a NCTC 13846, de DSMZ, Alemania) en exudados rectales negativos, comenzando por la concentración que era superior al LoD. Se procesaron doce duplicados de cada nivel de dilución utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR». El LoD para la diana de *mcr-1* se calculó mediante el análisis de regresión Probit de los datos como la concentración correspondiente al 95% de probabilidad de un resultado positivo. El LoD calculado se confirmó analizando 30 duplicados de una dilución diana de *mcr-1* a la concentración correspondiente.

El resultado final se muestra en la siguiente tabla.

Límite de detección del gen <i>mcr-1</i> con exudados rectales y el sistema ELITE InGenius (ufc/mL)		
Límite de detección	Intervalo de confianza del 95%	
	Límite inferior	Límite superior
32	19	472

Como no se disponía de ninguna cepa positiva ni de ningún aislado de *mcr-2*, el LoD para la diana de *mcr-2* se calculó en 50 copias/mL (lo que corresponde a 50 ufc/mL), un valor similar al LoD de la diana de *mcr-1*. El LoD estimado se confirmó analizando 30 duplicados de una dilución diana de *mcr-2* (ADN plasmídico) en una matriz rectal negativa a la concentración correspondiente.

### Eficacia de detección (inclusividad)

La eficacia de detección del ensayo para los genes *mcr-1* y *mcr-2* (inclusividad) se evaluó comparando las secuencias con las bases de datos de nucleótidos.

Las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores y de las sondas fluorescentes se comprobaron en la alineación de las secuencias disponibles en la base de datos de los genes *mcr-1* y *mcr-2*. El análisis demostró su conservación y la ausencia de mutaciones significativas.

La eficacia de detección del ensayo para el gen *mcr-1* se verificó también para un conjunto de 27 aislados cultivados resistentes a la colistina, caracterizados como enterobacterias positivas para *mcr-1*.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Eficacia de detección (inclusividad) del producto COLISTIN-R ELITE MGB® Kit					
Muestras	N	Positivas para <i>mcr-1</i>	Positivas para <i>mcr-2</i>	Negativo	No válidas
Aislados cultivados positivos para <i>mcr-1</i>	27	27	0	0	0

El producto puede detectar la resistencia transmisible a la colistina (mediada por plásmidos) a través de la detección de los genes *mcr-1* y *mcr-2*, pero no es capaz de detectar los tipos 3 a 5 ni los tipos 7 a 10 del gen *mcr*. El tipo *mcr-6* puede detectarse dentro del detector de *mcr-2*.

### Marcadores interferentes potenciales

La reactividad cruzada potencial del ensayo con otras dianas no intencionadas se evaluó mediante un análisis informático de las secuencias incluidas en la base de datos de nucleótidos.

Las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores y de las sondas fluorescentes se revisaron en la alineación de las secuencias de microorganismos cuya presencia cabe esperar razonablemente en las muestras de exudados. Los análisis demostraron ausencia de homología significativa y no indicaron

ninguna interferencia potencial.

La ausencia de reactividad cruzada con otros microorganismos que pueden encontrarse potencialmente en las muestras de exudados rectales también se verificó analizando un panel de cepas certificadas a una concentración de aproximadamente 10<sup>4</sup> ufc/mL utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Reactividad cruzada potencial		
Microorganismo	Cepa	Resultado
<i>K. pneumoniae</i>	NCTC 13439 (VIM)	Sin reactividad cruzada
<i>E. coli</i>	NCTC 13476 (IMP)	Sin reactividad cruzada
<i>S. marcescens</i>	UCLA 14-13-A11	Sin reactividad cruzada
<i>A. baumannii</i>	NCTC 13301	Sin reactividad cruzada
<i>A. lwoffii</i>	ATCC 15309	Sin reactividad cruzada
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703	Sin reactividad cruzada
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	Sin reactividad cruzada
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33292	Sin reactividad cruzada
<i>C. albicans</i>	Zeptomatrix Z006	Sin reactividad cruzada
<i>C. freundii</i>	UCLA-14-13-A2 (KPC)	Sin reactividad cruzada
<i>C. difficile</i>	ATCC 43593	Sin reactividad cruzada
<i>C. perfringens</i>	ATCC 13124	Sin reactividad cruzada
<i>P. mirabilis</i>	ATCC 12453	Sin reactividad cruzada
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	Sin reactividad cruzada
<i>S. enterica</i>	ATCC 700720	Sin reactividad cruzada
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-126	Sin reactividad cruzada
<i>E. coli</i>	DICON-055	Sin reactividad cruzada
<i>E. coli</i>	DICON-045	Sin reactividad cruzada
<i>E. coli</i>	NCTC:13400	Sin reactividad cruzada

Todas las cepas dieron un resultado negativo cuando se analizaron con el ensayo.

La ausencia de interferencia causada por otros microorganismos que puede observarse en las muestras de exudados rectales se verificó también analizando un panel de cepas certificadas a una concentración de aproximadamente 10<sup>4</sup> ufc/mL o superior y enriquecidas con material certificado positivo para *mcr-1* a una concentración final de aproximadamente 3 veces el LoD utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Interferencia potencial		
Microorganismo	Cepa	Resultado
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603	Sin interferencia
<i>E. coli</i>	ATCC BAA-201	Sin interferencia
<i>S. marcescens</i>	UCLA 14-13-A11	Sin interferencia
<i>A. baumannii</i>	NCTC 13301	Sin interferencia
<i>A. lwoffii</i>	ATCC 15309	Sin interferencia
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703	Sin interferencia
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	Sin interferencia
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33292	Sin interferencia
<i>C. albicans</i>	Zeptomatrix Z006	Sin interferencia
<i>C. freundii</i>	ATCC 8090	Sin interferencia
<i>C. difficile</i>	ATCC 43593	Sin interferencia
<i>C. perfringens</i>	ATCC 13124	Sin interferencia
<i>P. mirabilis</i>	ATCC 12453	Sin interferencia

Interferencia potencial		
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	Sin interferencia
<i>S. enterica</i>	ATCC 700720	Sin interferencia
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-126	Sin interferencia
<i>E. coli</i>	DICON-055	Sin interferencia
<i>E. coli</i>	DICON-045	Sin interferencia
Microorganismo	Cepa	Resultado
<i>E. coli</i>	NCTC13400	Sin interferencia

Ninguna de las cepas interfirió en la amplificación de las dianas cuando se analizaron con el ensayo.

#### Sustancias interferentes

En el ensayo, se analizó un panel de sustancias potencialmente interferentes a concentraciones pertinentes. Las sustancias analizadas fueron sangre humana, mucina, enemas (aceite de vaselina), antibióticos (vancomicina), antiácidos (ácido algínico/bicarbonato sódico), antidiarreicos (hidrocloruro de loperamida) y laxantes (senósidos).

Las sustancias se añadieron de forma individual a una matriz rectal negativa enriquecida con materiales de referencia positivos para *mcr-1* a una concentración de 3 veces el límite de detección. Las muestras se procesaron en tres duplicados en el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Se calculó el coeficiente de variación porcentual (%CV) del valor Ct utilizando muestras de referencia.

Los resultados se muestran en las siguientes tablas.

Sustancias interferentes			
Sustancia	Concentraciones probadas	Pos./Rep.	Resultado
Sangre total	5% v/v	3 / 3	Mcr-1 ADN detectado
Mucina	10 mg/mL	3 / 3	Mcr-1 ADN detectado
Aceite de vaselina	20 mg/mL	3 / 3	Mcr-1 ADN detectado
Vancomicina	12.5 mg/mL	3 / 3	Mcr-1 ADN detectado
Ácido algínico/Bicarbonato sódico	0.1 mg/mL	3 / 3	Mcr-1 ADN detectado
Clorhidrato de loperamida	7 µg/mL	3 / 3	Mcr-1 ADN detectado
Sennósidos	0,1mg/mL	3 / 3	Mcr-1 ADN detectado
Ampicilina	18 µg / mL	3 / 3	Mcr-1 ADN detectado
Cephodoxima	4.5 µg / mL	3 / 3	Mcr-1 ADN detectado
Ciprofloxacina	5 µg / mL	3 / 3	Mcr-1 ADN detectado
Azitromicina	10 µg / mL	3 / 3	Mcr-1 ADN detectado

Todas las muestras dieron un resultado positivo para la diana. El coeficiente de variación porcentual de los valores Ct fue inferior al 5 %. Ninguna de las sustancias analizadas a las concentraciones analizadas interfirieron en la detección de la diana.

#### Repetibilidad

La repetibilidad de los resultados obtenidos con el ensayo utilizando el sistema ELITE InGenius se evaluó analizando un panel de matrices rectales con una muestra negativa y tres muestras enriquecidas con el material de referencia positivo para *mcr-1* (DSMZ) a concentraciones de aproximadamente 0,5 veces, 1,5 veces y 3 veces el límite de detección.

La repetibilidad se calculó analizando las muestras del panel en tres duplicados, en dos sesiones al día y con el mismo lote de producto. Se analizaron tres lotes diferentes de producto en tres días distintos con el mismo instrumento y con el mismo operador. Las muestras se procesaron utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Los valores Ct de cada nivel de dilución se utilizaron para calcular el %CV, con el fin de evaluar la repetibilidad como imprecisión.

En las siguientes tablas se incluye un resumen de los resultados.

Repetibilidad				
Muestra	Pos./Rep.	Ct medio de mcr-1	Desv. est. de mcr-1	%CV de mcr-1
3x LoD (96 ufc/mL)	18/18	36,23	0,44	1,23
1.5x LoD (48 ufc/mL)	18/18	36,82	0,59	1,61
0.5x LoD (16 ufc/mL)	10/18	37,97	0,47	1,25
Matriz rectal negativa	0/18	N. A.	N. A.	N. A.

En el análisis de repetibilidad, el ensayo detectó la diana de *mcr-1* tal como se esperaba y mostró un %CV bajo de valor Ct diana que no superó el 5 %.

#### Reproducibilidad

La reproducibilidad de los resultados obtenidos con el ensayo utilizando el sistema ELITE InGenius se evaluó analizando un panel de matrices rectales con una muestra negativa y tres muestras enriquecidas con el material de referencia positivo para *mcr-1* (DSMZ) a concentraciones de aproximadamente 0,5 veces, 1,5 veces y 3 veces el límite de detección.

La reproducibilidad se calculó analizando las muestras del panel en tres duplicados, en dos sesiones al día. Se analizaron tres lotes diferentes de producto en tres días distintos, en tres instrumentos distintos y con tres operadores distintos. Las muestras se procesaron utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Los valores Ct de cada nivel de dilución se utilizaron para calcular el %CV, con el fin de evaluar la reproducibilidad como imprecisión.

En las siguientes tablas se incluye un resumen de los resultados.

Reproducibilidad				
Muestra	Pos./Rep.	Ct medio de mcr-1	Desv. est. de mcr-1	%CV de mcr-1
3x LoD (96 ufc/mL)	18/18	36,07	0,60	1,66
1.5x LoD (48 ufc/mL)	18/18	36,86	0,53	1,44
0.5x LoD (16 ufc/mL)	9/18	37,91	0,71	1,88
Matriz rectal negativa	0/18	N. A.	N. A.	N. A.

En el análisis de reproducibilidad, el ensayo detectó la diana de *mcr-1* tal como se esperaba y mostró un %CV bajo de valor Ct diana que no superó el 5%.

#### Sensibilidad diagnóstica (Positive Percent Agreement): confirmación de las muestras positivas

Dada la dificultad de encontrar muestras clínicas positivas para los genes *mcr-1* y *mcr-2*, debido a la baja incidencia de muestras con resistencia transmisible a la colistina, se analizaron muestras positivas para evaluar la sensibilidad diagnóstica del producto.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando 77 muestras de hisopados rectales enriquecidas con cepas aisladas de *E. coli* positivas para *mcr-1* o *mcr-2*.

Un total de 56 muestras de hisopados rectales se certificaron como negativas con un método de cultivo y, después, se enriquecieron con diferentes cepas aisladas de *E. coli* positivas para *mcr-1*.

Un total de 21 muestras de hisopados rectales supuestamente negativas para enterobacterias que presentaban resistencia transmisible a la colistina se enriquecieron con la cepa NCTC 14378 de *E. coli* positiva para *mcr-2*.

Todas las muestras se analizaron con el kit COLISTIN-R ELITE MGB y el sistema ELITE InGenius en modo "Extract + PCR".

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	mcr-1 positivas	mcr-2 positivas	negativas	no válidas
Exudados rectales positivos con mcr-1	56	55	0	0	1
Exudados rectales positivos con mcr-2	21	0	21	0	0

Un total de 55 de 56 muestras enriquecidas con *mcr-1* se confirmaron como positivas para *mcr-1*, mientras que una muestra presentó un resultado no válido y se excluyó del análisis.

Todas las muestras enriquecidas con *mcr-2* (21 de 21) se confirmaron como positivas para *mcr-2*.



En este análisis, la sensibilidad diagnóstica para las muestras de hisopados rectales fue del 100 %, tanto para las dianas de mcr-1 como para las de mcr-2.

**Especificidad diagnóstica (Negative Percent Agreement): confirmación de las muestras negativas**

La especificidad diagnóstica del ensayo, como confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando 58 muestras de exudados rectales negativos para mcr-1 y mcr-2.

Las 58 muestras de exudados rectales se identificaron como negativas utilizando un método de cultivo y, a continuación, se analizaron con el producto «COLISTIN-R ELITE MGB Kit» utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	mcr-1 positivas	mcr-2 positivas	negativas	no validas
Exudados rectales negativos con mcr-1	58	1	0	54	3

En el análisis, 54 de 58 muestras se confirmaron como válidas y negativas y una muestra presentó un resultado positivo bajo para mcr-1 diferente del resto. Tres muestras presentaron un resultado no válido y se excluyeron del análisis. En este análisis, la especificidad del ensayo fue del 98 %.

**Nota:** Los datos y resultados completos de los análisis realizados para la evaluación de las características de rendimiento del producto con las matrices y el instrumento se incluyen en la documentación técnica del producto «COLISTIN-R ELITE MGB Kit», FTP 202ING.

**BIBLIOGRAFÍA**

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

**LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

Utilizar este producto únicamente con la siguiente muestra clínica: exudados rectales.

No utilice este producto con muestras de animales y alimentos.

No utilizar este producto con muestras que contengan una cantidad excesiva de matriz fecal, pues las muestras con una alta turbidez inhiben la reacción de amplificación de ácidos nucleicos y pueden dar lugar a resultados no válidos.

No se dispone de datos sobre el rendimiento del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: cultivo de sangre, sobrenadantes de heces y orina.

Los resultados obtenidos con este producto dependen de que las muestras se identifiquen, recojan, transporten, conserven y procesen de forma apropiada. Por lo tanto, con el fin de evitar resultados incorrectos, realizar estos pasos con el debido cuidado y seguir estrictamente las instrucciones proporcionadas con los productos para la extracción de ácidos nucleicos.

Debido a su alta sensibilidad analítica, el método de amplificación en tiempo real utilizado en este producto puede desarrollar contaminación cruzada con las muestras positivas, los controles positivos y los propios productos de amplificación. Una contaminación cruzada puede dar lugar a resultados falsos positivos. El formato del producto puede limitar la contaminación cruzada. No obstante, esta solo puede evitarse procediendo conforme a las prácticas correctas de laboratorio y siguiendo estas instrucciones de uso.

Con el fin de evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario y otras personas, para utilizar este producto, se requiere personal cualificado y con la formación necesaria para procesar muestras biológicas potencialmente infecciosas o productos químicos clasificados como peligrosos.

Con el fin de evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario y otras personas, este producto requiere el uso de ropa de trabajo y áreas que sean adecuadas para procesar muestras biológicas potencialmente infecciosas o productos químicos clasificados como peligrosos.

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, este producto requiere el uso de ropa de trabajo e instrumentos especiales expresamente destinados a la configuración de la sesión de trabajo de que se trate.

Debido a las diferencias inherentes que existen entre las distintas tecnologías, se recomienda a los usuarios realizar estudios de relación entre los diversos métodos para evaluar dichas diferencias antes de pasar a una nueva tecnología.

Un resultado negativo obtenido con este producto significa que el ADN de la diana no se ha detectado en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de la diana presente un título inferior al límite de detección del producto (consultar el apartado «Características de rendimiento»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

En caso de coinfección, la sensibilidad de una diana puede verse afectada por la amplificación de una segunda diana.

En ocasiones, los resultados obtenidos con este producto pueden no ser válidos debido a un fallo del control interno. En este caso, la muestra debe volver a analizarse a partir del paso de extracción, lo que puede provocar retrasos a la hora de obtener los resultados finales.

Asimismo, los posibles polimorfismos existentes en la región del ADN de la diana cubierto por los cebadores y las sondas del producto pueden afectar negativamente a la detección del ADN de la diana.

Este producto no puede detectar los tipos 3 a 5 ni los tipos 7 a 10 del gen mcr. Este producto puede detectar el tipo mcr-6 dentro del detector de mcr-2.

El producto puede detectar la resistencia transmisible a la colistina (mediada por plásmidos) a través de los genes mcr-1 y mcr-2, pero no es capaz de detectar la resistencia cromosómica.

Como en cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, los resultados obtenidos con este producto deben interpretarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y otras pruebas analíticas del paciente.

Como en cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, existe un riesgo residual de que obtener con él resultados no válidos, falsos positivos y falsos negativos. Este riesgo residual no puede eliminarse ni reducirse aún más. En determinadas situaciones, el riesgo residual puede hacer que se tomen decisiones incorrectas, con consecuencias potencialmente graves para el paciente.

**PROBLEMAS Y SOLUCIONES**

Reacción no válida del control positivo	
Posibles causas	Soluciones
Error de la configuración de la sesión.	Comprobar la posición de la mezcla de PCR y la del control positivo. Comprobar el volumen de la mezcla de PCR y el del control positivo.
Degradación del control positivo.	Usar una nueva alícuota de control positivo.
Degradación de la mezcla de PCR.	Usar una nueva alícuota de la mezcla de PCR.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Reacción no válida del control negativo	
Posibles causas	Soluciones
Error de la configuración de la sesión.	Comprobar la posición de la mezcla de PCR y la del control negativo. Comprobar el volumen de la mezcla de PCR y el del control negativo.
Contaminación del control negativo.	Usar una nueva alícuota de agua de calidad para biología molecular.
Contaminación de la mezcla de PCR.	Usar una nueva alícuota de la mezcla de PCR.
Contaminación del área de extracción, de las gradillas o del bloque de inventario.	Limpiar las superficies con detergentes acuosos, lavar las batas y sustituir las probetas y las puntas utilizados.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.













Reacción de la muestra no válida	
Posibles causas	Soluciones
Error de la configuración de la sesión.	Comprobar la posición de la mezcla de PCR y la de la muestra. Comprobar el volumen de la mezcla de PCR y el de la muestra.
Degradación de la plantilla del control interno.	Usar nuevas alícuotas del control interno.

Inhibición debido a sustancias interferentes con las muestras. <i>(por ejemplo, turbidez)</i>	Repetir la amplificación con una dilución de 1:2 o 1:5 en agua de calidad para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only». Repetir la extracción con una dilución 1:2 adicional en un medio eNAT™ de la muestra analizada en una sesión en el modo de procesamiento «Extract + PCR».
Degradación de la mezcla de PCR.	Usar una nueva alícuota de la mezcla de PCR.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Error 30103	
Posibles causas	Soluciones
Concentración demasiado alta de la diana en la muestra.	Si se observa una amplificación significativa en el gráfico de PCR, proceder de la manera siguiente: - Seleccionar la pista relativa a la muestra y aprobar manualmente el resultado. Si se necesita un valor Ct: - Repetir la amplificación con una dilución de 1:10 en agua de calidad para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only» o - Repetir la extracción con una dilución de 1:10 adicional en un medio eNAT™ de la muestra analizada en una sesión en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Tasa anormalmente alta de resultados positivos en la misma sesión (reacciones con valores de Ct tardío similares)	
Posibles causas	Soluciones
Contaminación entre muestras durante las etapas preanalíticas	Evite cualquier contacto entre la micropipeta y la pared del tubo. Limpie la micropipeta con una solución fresca de hipoclorito de sodio al 3% o un limpiador de ADN/ARN después de pipetear cada muestra. No utilice las pipetas Pasteur. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizadas con puntas de filtro de aerosol. Introduzca las muestras en las últimas posiciones de los instrumentos, como se indica en el GUI ELITE InGenius. Siga la secuencia de carga indicada por el software
Contaminación ambiental del laboratorio	Limpie todas las superficies en contacto con el operador y las muestras (incluidas las pipetas) con una solución fresca de hipoclorito de sodio al 3% o un limpiador de ADN/ARN. Realice un ciclo de descontaminación U.V. Utilice un nuevo tubo de PCR Mix y/o CPE.

**SÍMBOLOS**

-  Número de catálogo
-  Límite superior de temperatura
-  Código de lote
-  Fecha de caducidad (último día del mes)
-  Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*.
-  Cumple los requisitos del Reglamento (UE) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*. Certificación expedida por DEKRA Certification B.V., Países Bajos.
-  Identificación exclusiva del dispositivo
-  Contenido suficiente para «N» análisis.
-  Atención: Consúltense las instrucciones de uso.
-  Contenido
-  Proteger de la luz solar.
-  Fabricante

**NOTA PARA LOS USUARIOS**

Cualquier incidente grave que se produzca en relación con el producto deberá comunicarse al fabricante y a las autoridades competentes del Estado miembro en el que resida el usuario o el paciente. En el momento de la revisión actual de las instrucciones de uso, no se había producido ningún incidente grave ni ninguna retirada del producto.

No obstante, cuando este sistema informático se encuentre en funcionamiento, se proporcionará un «Resumen de seguridad y rendimiento» a través de la base de datos europea sobre productos sanitarios (Eudamed).


**AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA  
LIMITADA**

Los reactivos de detección ELITE MGB® están cubiertos por una o varias patentes de EE. UU. 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800, 9,169,256, así como por las patentes europeas 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 y por solicitudes de patentes pendientes en la actualidad.

Esta licencia limitada permite a la persona, o a la entidad legal a la que se ha suministrado el producto, utilizar este y los datos generados con el uso del producto exclusivamente para el diagnóstico humano. Ni ELITechGroup S.p.A. ni sus licenciatarios conceden ninguna otra licencia, expresa o implícita, para cualquier otro propósito.

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

Ref: RTS202ING-48

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

## A. Intended use

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

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

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

## B. Amplified sequence

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

## C. Validated Matrixes

› Rectal Swabs

## D. Tube type collection

Copan Ref.	Description
480CE	eSwab

## E. Kit content

### COL PCR Mix (Neutral)



X 4 (RTS202ING-48)

Maximum Shelf-life: 24 Months

Storage temp.: - 20 °C

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

## F. Material required not provided in the kit

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

## G. ELITE InGenius® Protocol

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

## H. Performance

Target	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
mcr-1	Rectal swab	32 CFU/mL	100% 55/55*	98% 54/55*
mcr-2	Rectal swab	50 CFU/mL	100% 21/21*	100% 55/55*

\*confirmed samples / tested samples

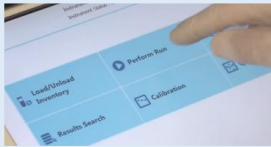
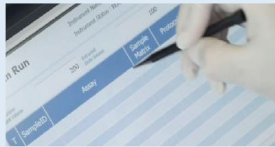



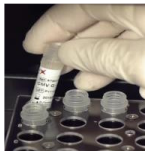

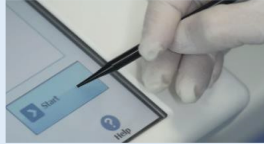
## I. Procedures

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

### Before analysis

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

### Procedure - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen  

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

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

4. Select the "Assay protocol" of  
interest  

5. Select the sample position:  
"Extraction tube"  

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

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

8. Close the door Start the run  

9. View, approve and store the results  
