

AVVERTENZA del 19/01/2023

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

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

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Adeguamento al Regolamento (UE) 2017/746 e allo Standard ISO15223-01:2021.*
- *Utilizzo e prestazioni del prodotto restano del tutto invariate.*
- *I seguenti numeri di lotto sono stati commercializzati come IVDD.
In accordo con l'Articolo 110 del nuovo Regolamento IVDR non saranno richiamati e continueranno ad essere commercializzati secondo le date di scadenza:*

PRODUCT REF	Numero Lotto	Data di scadenza
RTS202ING-48	U1222-035	December 2024
CTR202ING	U0123-014	January 2025
CTR202ING	U0821-030	March 2023

NOTA BENE



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



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



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



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



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



DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



COLISTIN-R ELITE MGB® Kit

reagente per l'amplificazione real time del DNA

REF RTS202ING-48



UDI 08033891486662

0344

INDICE

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 3
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 4
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 5
PROCEDURA	pag. 6
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 12
BIBLIOGRAFIA	pag. 16
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 16
PROBLEMI E SOLUZIONI	pag. 17
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 18
NOTA PER L'UTILIZZATORE	pag. 19
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 19
ANNEX	pag. A

USO PREVISTO

Il prodotto **COLISTIN-R ELITE MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico *in vitro* destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come test di amplificazione qualitativa degli acidi nucleici per la rilevazione e l'identificazione del DNA dei geni *mcr-1* e *mcr-2* responsabili della resistenza trasferibile alla colistina nelle *Enterobacteriaceae* nei campioni clinici.

Il test è validato in associazione allo strumento **ELITE InGenius®**, un sistema integrato automatizzato per l'estrazione, la real time PCR e l'interpretazione dei risultati, a partire da tamponi rettali.

Il prodotto è destinato a essere utilizzato come ausilio nella diagnosi di infezioni da *Enterobacteriaceae* positive per i geni responsabili della resistenza trasferibile alla colistina, insieme ai dati clinici del paziente e ai risultati di altri esami di laboratorio.

COLISTIN-R ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione real time del DNA

REF RTS202ING-48

PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio consiste in una reazione di amplificazione real time multiplex eseguita in associazione allo strumento **ELITE InGenius**, un sistema automatico e integrato per l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione di acidi nucleici e per l'interpretazione dei risultati.

Partendo dal DNA estratto da ciascun campione da analizzare, si eseguono nella PCR Cassette le reazioni di amplificazione specifiche per i seguenti geni responsabili della resistenza alla colistina:

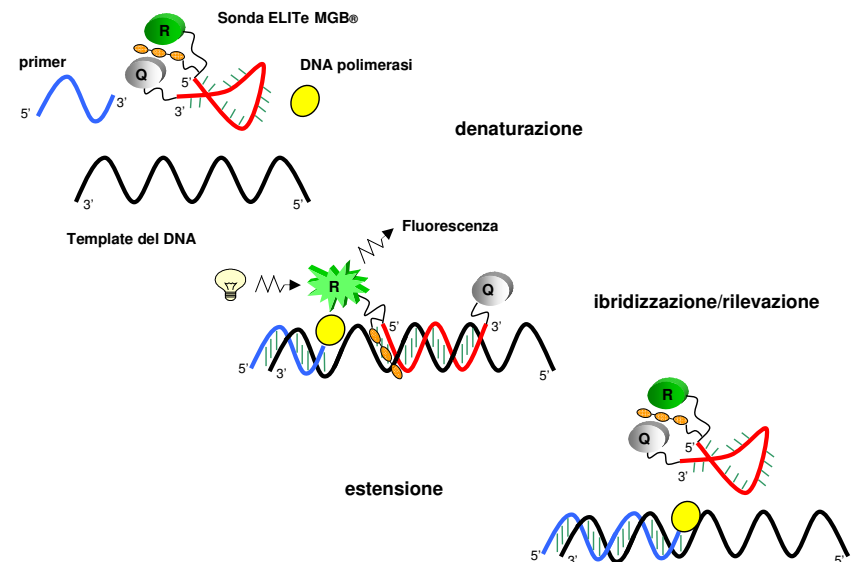
- gene *mcr-1*, rilevato da una sonda specifica letta nel canale **mcr1** (Canale 5),
- gene *mcr-2*, rilevato da una sonda specifica letta nel canale **mcr2** (Canale 1).

Inoltre, con la COL PCR Mix Mix è anche amplificato nella stessa reazione il controllo interno per l'estrazione e l'amplificazione. Il controllo interno, basato su una sequenza artificiale (IC2), è rivelato da una sonda specifica letta nel canale "**IC**" di ELITE InGenius (Canale 2).

Le sonde con tecnologia ELITE MGB® sono attivate quando ibridizzano con il prodotto specifico della reazione di amplificazione. L'emissione della fluorescenza viene misurata e registrata dall'apparecchio. Alla fine del ciclo di amplificazione, si analizzano gli spettri della fluorescenza e le curve di dissociazione allo scopo di identificare i cicli soglia (Ct). L'interpretazione del risultato consente di rilevare nel campione iniziale la presenza dei geni *mcr-1* e *mcr-2* responsabili della resistenza trasferibile alla colistina.

Il saggio è stato validato con il sistema **ELITE InGenius**.

Nella figura seguente è brevemente descritto il meccanismo di attivazione ed emissione della fluorescenza delle sonde con tecnologia ELITE MGB®. Da notare che le sonde non sono idrolizzate durante il ciclo di amplificazione, per cui possono essere utilizzate per l'analisi della curva di dissociazione.



DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit** fornisce la miscela di reazione completa per l'amplificazione real time **COL PCR Mix**, pronta per l'uso e pre-aliquotata in quattro provette. Ogni provetta contiene **280 µL** di soluzione, che consentono di effettuare **12 test** in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 test per sessione) in associazione al sistema **ELITE InGenius**.

La miscela COL PCR Mix contiene:

- i primer e le sonde specifici per la rilevazione del **gene mcr-1**. La sonda **mcr1** è marcata con il fluoroforo AP639, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente. La sonda è rilevata nel canale **mcr-1** (Canale 5) del sistema **ELITE InGenius**,
- i primer e le sonde specifici per la rilevazione del **gene mcr-2**. La sonda **mcr2** è marcata con il fluoroforo FAM, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente. La sonda è rilevata nel canale **mcr-2** (Canale 1) del sistema **ELITE InGenius**,
- i primer e la sonda specifici per la sequenza artificiale **IC2** del controllo interno esogeno. La sonda **IC** è marcata con il fluoroforo AP525, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente. La sonda è rilevata nel canale **IC** (Canale 2) del sistema **ELITE InGenius**.

La miscela COL PCR Mix fornisce anche il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfato, gli stabilizzanti e l'enzima Taq DNA polimerasi con attivazione termica ("hot start").

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

MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO

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

MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO

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

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

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

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione real time e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare sono richiesti lo strumento **ELITE InGenius** (ELITechGroup S.p.A., codice INT030) e i seguenti Assay Protocol specifici per il prodotto (ELITechGroup S.p.A.):

- parametri per l'amplificazione del controllo positivo **COL-R ELITE_PC**,
- parametri per l'amplificazione del controllo negativo **COL-R ELITE_NC**,
- parametri per i campioni da analizzare **COL-R ELITE_RcS_200_100**.

Con lo strumento **ELITE InGenius** sono inoltre richiesti i seguenti prodotti generici:

- cartucce di estrazione **ELITE InGenius® SP 200** (ELITechGroup S.p.A., codice INT032SP200),
- materiali di consumo per estrazione **ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set** (ELITechGroup S.p.A., codice INT032CS),
- cartucce di amplificazione **ELITE InGenius® PCR Cassette** (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR),
- puntali **300 µL Filter Tips Axygen** (Axygen BioScience Inc., CA, codice TF-350-L-R-S),

- raccogliitore **ELITE InGenius® Waste Box** (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000).
Come controllo interno di estrazione e inibizione, è richiesto l'impiego del prodotto generico **CPE - Internal Control** (ELITechGroup S.p.A., codice CTRCPE), una soluzione stabilizzata contenente due DNA plasmidici e l'RNA genomico di fago MS2.

Come controllo positivo di amplificazione, è richiesto l'impiego del prodotto specifico **COLISTIN-R - ELITE Positive Control** (ELITechGroup S.p.A., codice CTR202ING), una soluzione stabilizzata contenente DNA plasmidici.

Come dispositivo per la raccolta dei campioni rettali, è richiesto l'impiego del seguente prodotto generico:

- **eSWAB®** kit (COPAN Italia S.p.A., cod. 480CE), sistema composto da tampone e provetta contenente 1 mL di terreno di trasporto o un dispositivo equivalente.

Per la diluizione dei campioni di tampone rettale, è necessario il seguente prodotto generico:

- **eNAT®** kit (COPAN Italia S.p.A., codice 606CS01R), sistema composto da tampone e provetta contenente 2 mL di denaturante.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

Avvertenze e precauzioni generali

Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Il materiale che viene a contatto con i campioni biologici deve essere trattato con ipoclorito di sodio 3% per almeno 30 minuti o in autoclave a 121° C per un'ora prima di essere smaltito.

Manipolare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali usati per effettuare il saggio come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. I rifiuti devono essere trattati e smaltiti secondo le opportune regole di sicurezza. Il materiale monouso combustibile deve essere incenerito. I rifiuti liquidi contenenti acidi o basi devono essere neutralizzati prima dell'eliminazione.

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

Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.

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

Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.

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

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

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

Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.

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

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

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

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

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

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

La **COL PCR Mix** deve essere conservata al buio a -20 °C.
La **COL PCR Mix** deve essere usata entro un mese dalla prima apertura del tubino.
La **COL PCR Mix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **sette volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

Tamponi rettali prelevati con il sistema eSwab (COPAN Italia S.p.A., codice 480CE)

I tamponi rettali destinati all'estrazione del DNA devono essere raccolti con il sistema eSwab e identificati secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati e conservati a temperatura ambiente (~+25 °C) per un massimo di 48ore oppure trasportati e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di 48 ore. Prima di eseguire l'analisi con questo prodotto, trasferire 0,25 mL di campione risospeso nel terreno di trasporto eSwab in una provetta eNAT con 2,0 mL di terreno e mescolare con vortex.

Il terreno eNAT preserva gli acidi nucleici per quattro settimane a temperatura ambiente e sei mesi a -20 °C e -70 °C. Dopo aver trasferito 0,25 mL del campione raccolto nel terreno eSwab, è possibile caricare la provetta eNAT direttamente nel sistema **ELITE InGenius** come tubo primario.

Nota: per l'estrazione del DNA da tamponi rettali mediante il sistema **ELITE InGenius** ed il software ELITE InGenius versione 1.3 (o versioni successive equivalenti), utilizzare l'Assay Protocol COL-R ELITE_RcS_200_100. Questo protocollo elabora 200 µL di campione, aggiunge il controllo interno CPE a 10 µL / estrazione ed eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Il DNA estratto può essere conservato a +2 / +8 °C per 16 ore o a -20 °C per un mese.

Nota: i campioni con torbidità elevata devono essere trattati come indicato nel capitolo sulla risoluzione dei problemi.

Sostanze interferenti

I dati disponibili riguardo fenomeni di inibizione da parte di farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo "Sostanze interferenti" del capitolo "Caratteristiche delle Prestazioni".

Un contenuto elevato di matrice fecale raccolta con il tampone rettale (campione con elevata torbidità) può inibire il saggio.

Controlli di amplificazione

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

come controllo positivo, utilizzare il prodotto **COLISTIN-R - ELITE Positive Control** (non incluso in questo kit) in associazione con il protocollo **COL-R ELITE_PC**,
come controllo negativo, utilizzare acqua per biologia molecolare (non inclusa in questo kit) in associazione con il protocollo **COL-R ELITE_NC**.

Nota bene: il sistema **ELITE InGenius** richiede la presenza di risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione che è memorizzato nel suo database.

I risultati dei controlli di amplificazione, approvati e memorizzati nel database, scadono **dopo 15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente l'analisi dei controlli positivi e negativi con il lotto in uso di reagente di amplificazione.

Inoltre, i controlli di amplificazione devono essere eseguiti nuovamente quando:

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

Materiale di riferimento certificato

La tracciabilità metrologica dei calibratori e dei materiali di controllo per i valori mcr-1 non è pienamente applicabile per il prodotto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit** in quanto non è disponibile un materiale WHO di riferimento.

La tracciabilità metrologica dei calibratori e dei materiali di controllo per i valori mcr-2 non è pienamente applicabile per il prodotto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit** in quanto non è disponibile un materiale WHO di riferimento.

Controlli di qualità

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

PROCEDURA

La procedura di utilizzo del prodotto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit** con il sistema **ELITE InGenius** comprende tre fasi:

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

Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
- accendere lo strumento **ELITE InGenius** e accedere al sistema con la modalità "CLOSED",
- verificare che i controlli di amplificazione (Controls, COL Positive Control, COL Negative Control) siano stati eseguiti con il lotto di reagente di amplificazione previsto e che i risultati siano approvati e validi (Status). In assenza di risultati dei controlli di amplificazione approvati e validi, generare gli stessi come descritto di seguito,
- scegliere il tipo di sessione, seguendo le istruzioni riportate dall'interfaccia grafica (GUI) per la preparazione della sessione e utilizzando gli Assay Protocol forniti da ELITechGroup S.p.A. Questi protocolli IVD sono stati specificamente validati con il prodotto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit**, lo strumento ELITE InGenius e la matrice indicata.

Gli Assay Protocol per l'analisi dei campioni clinici disponibili per il prodotto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit** sono descritti nella tabella seguente

Assay Protocol per il prodotto COLISTIN-R ELITE MGB Kit			
Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
COL-R ELITE_RcS_200_100	Tampone rettale	Positivo/ Negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione estratto: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume iniziale PCR del campione: 20 µL

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

Impostazione della sessione

Il prodotto **COLISTIN-R ELITE MGB Kit** in associazione al sistema **ELITE InGenius** può essere utilizzato per eseguire:

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

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

Nota bene: il sistema **ELITE InGenius** può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS), tramite il quale è possibile caricare le informazioni della sessione. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

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

A. Corsa integrata

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

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

Nota bene: Scongellare le provette contenenti la COL PCR Mix al riparo dalla luce perché i reagenti sono fotosensibili.

2. Scongellare le provette di CPE per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
3. Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".
4. Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
5. Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
6. Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (es., COL-R ELITE_RcS_200_100).
7. Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
8. Nella colonna "Sample Position", selezionare la posizione in cui caricare il campione:
 - se si usa un tubo primario, selezionare "Primary Tube",
 - se si usa un tubo secondario, selezionare "Extraction Tube".Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Nell'"Inventory Block" selezionato, caricare il CPE e la COL PCR Mix seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Nell'"Inventory Area" selezionata, caricare e controllare i Rack dei puntali seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare le "PCR Cassette", le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200", tutti i consumabili e i campioni da estrarre, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Chiudere lo sportello dello strumento.
13. Premere "Start" per avviare la corsa.

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

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

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

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

B. Corsa di amplificazione

Per impostare la corsa di amplificazione partendo dagli acidi nucleici estratti, eseguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare le provette di COL PCR Mix per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 12 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 reazioni per sessione di lavoro). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota bene: Scongellare le provette contenenti la COL PCR Mix al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
3. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
4. Per ogni Track di interesse compilare il SID digitando o scansionando il codice a barre del campione.
5. Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (es., COL-R ELITE_RcS_200_100).
6. Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
7. Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Nell'"Inventory Block" selezionato, caricare la COL PCR Mix seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Nell'"Inventory Area" selezionata, caricare e controllare i Rack dei puntali seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare le "PCR Cassette" e i campioni degli acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Chiudere la porta dello strumento.
12. Premere "Start" per iniziare la corsa.

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

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

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

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

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

Per impostare la corsa di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo eseguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongelare le provette di COL PCR Mix per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 12 reazioni, in condizioni ottimali di utilizzo del reagente (almeno 2 reazioni per sessione di lavoro). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota bene: Scongelare le provette contenenti la COL PCR Mix al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Scongelare la provetta di COL- Positive Control per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare la provetta per 5 secondi.
3. Trasferire almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito nell'ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
5. Nelle Track di interesse, selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay".
6. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
7. Per il Controllo Positivo, selezionare nella colonna "Assay" l'Assay Protocol "COL- R ELITe_PC" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza del COL - Positive Control.
8. Per il Controllo Negativo, selezionare nella colonna "Assay" l'Assay Protocol "COL-R ELITe_NC" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua per biologia molecolare.
9. Fare clic su "Next" per continuare l'impostazione.
10. Nell'"Inventory Block" selezionato, caricare la COL PCR Mix seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Nell'"Inventory Area" selezionata, caricare e controllare i Rack dei puntali seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Caricare le "PCR Cassette", la provetta di COL Positive Control e la provetta di acqua per biologia molecolare (COL Negativo Control) seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Chiudere la porta dello strumento.
14. Premere "Start" per iniziare la corsa.

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

Nota bene: Alla fine della corsa il Controllo Positivo rimasto deve essere prelevato dallo strumento, chiuso con il tappo, identificato e può essere conservato a -20 °C. Evitare la fuoriuscita del Controllo Positivo. Il Controllo Negativo rimasto deve essere eliminato.

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

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

Esame e approvazione dei risultati

Al termine della corsa, è visualizzata automaticamente la schermata "Results Display", nella quale sono visualizzati i risultati relativi a campione / controllo e le informazioni relative alla sessione. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i rapporti ("Sample Report" o "Track Report"). Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Nota bene: il sistema **ELITe InGenius** può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile inviare automaticamente i risultati approvati della sessione di lavoro al centro elaborazione dati del laboratorio. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Il sistema **ELITe InGenius** genera i risultati con il prodotto **COLISTIN-R ELITe MGB Kit** attraverso questa procedura:

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

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

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde per i target (canali **mcr-1** e **mcr-2**) nella reazione di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo sono analizzati automaticamente e interpretati dall'ELITe InGenius software con i parametri inclusi negli Assay Protocol "COL-R ELITe_PC" e "COL-R ELITe_NC".

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere visualizzati e approvati da parte del personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni della GUI.

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

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

Nota Bene: Se il risultato della reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "Failed" nella schermata "Controls" e non è possibile approvarlo. In questo caso la reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo deve essere ripetuta.

Nota Bene: Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo è processato insieme con i campioni da analizzare ed il suo risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In questo caso anche l'amplificazione dei campioni deve essere ripetuta.

B. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde per i target (canali **mcr-1** e **mcr-2**) e dalla sonda del controllo Interno (canale **IC**) nelle reazioni di amplificazione dei campioni sono analizzati automaticamente e interpretati dall'ELITe InGenius software con i parametri inclusi nell'Assay Protocol COL-R ELITe_RcS_200_100.

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

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

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

Per ciascun campione, il risultato del saggio è interpretato automaticamente dal sistema come stabilito dall'algoritmo dell'**ELITe InGenius Software** e dai parametri dell'Assay Protocol.

I possibili messaggi relativi al risultato di un campione sono riportati nella tabella sottostante. Per ogni campione, il sistema riporta una combinazione dei seguenti messaggi specificando se i geni responsabili della resistenza alla colistina sono stati rilevati o non rilevati.

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
mcr1: DNA detected.	Il DNA del gene mcr-1 è stato rilevato nel campione. Il campione potrebbe essere resistente alla colistina .
mcr2: DNA detected.	Il DNA del gene mcr-2 è stato rilevato nel campione. Il campione potrebbe essere resistente alla colistina .
mcr1: DNA not detected or below the LoD.	Il DNA del gene mcr-1 non è stato rilevato nel campione o è inferiore al limite di rilevanza del saggio. Il campione è negativo per questo gene oppure la concentrazione è inferiore al limite di rilevanza (LoD) del saggio. Se anche il gene mcr-2 non è stato rilevato, il campione potrebbe essere sensibile alla colistina .
mcr2: DNA not detected or below the LoD.	Il DNA del gene mcr-2 non è stato rilevato nel campione o è inferiore al limite di rilevanza del saggio. Il campione è negativo per questo gene oppure la concentrazione è inferiore al limite di rilevanza (LoD) del saggio. Se anche il gene mcr-1 non è stato rilevato, il campione potrebbe essere sensibile alla colistina .
Invalid - Retest campione.	Risultato del saggio non valido a causa di un problema con il Controllo Interno (estrazione errata, presenza di un inibitore). Il Ct del controllo interno è risultato non determinato o superiore a 34 (cut-off IC = 34). La sessione dovrebbe essere ripetuta.

I campioni non idonei per l'interpretazione dei risultati sono segnalati come "Invalid - Retest Sample" dall'**ELITE InGenius Software**. In questo caso, non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA del Controllo Interno perché si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o nella fase di estrazione (degradazione del DNA, perdita del DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'estratto) che possono causare risultati errati.

Quando il volume dell'eluato è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato, così com'è oppure diluito, mediante amplificazione in modalità "PCR Only". Se si conferma il risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota utilizzando la modalità "Extract + PCR".

I campioni segnalati come "mcr1 DNA Not Detected or below LoD" o "mcr2 DNA Not Detected or below LoD" sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA dei geni responsabili della resistenza. In questo caso non si può escludere che il DNA dei geni di interesse sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni").

Nota bene: I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e degli altri risultati degli esami di laboratorio relativi al paziente.

I risultati della corsa del campione sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Result Display) da parte di personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst" seguendo le istruzioni della GUI. Dalla finestra "Result Display" è possibile stampare e salvare i risultati della sessione come "Sample Report" e "Track Report".

C. Refertazione dei risultati del campione

I risultati del campione sono memorizzati nel database e possono essere esportati come "Sample Report" e "Track Report".

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

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

I "Sample Report" e "Track Report" possono essere stampati e firmati dal personale autorizzato.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Limite di rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) del prodotto COLISTIN-R ELITE MGB Kit è stato definito in associazione a campioni di tamponi rettali e al sistema ELITE InGenius.

Sei livelli di diluizioni di materiale di riferimento *E. coli* positivo per mcr-1 (ceppo DSM 105182, corrispondente a NCTC 13846, DSMZ, Germania) sono stati preparati in tamponi rettali negativi a partire da una concentrazione superiore al LoD atteso. Dodici replicati per ciascun livello di diluizione sono stati elaborati su sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR". Il LoD per il target per mcr-1 è stato calcolato attraverso un'analisi di regressione Probit come la concentrazione corrispondente al 95% di probabilità di ottenere un risultato positivo. Il LoD calcolato è stato confermato mediante analisi di 30 replicati alla concentrazione corrispondente del target mcr-1.

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Limite di rilevazione del gene mcr-1 con tampone rettale e sistema ELITE InGenius (CFU / mL)		
LoD	Intervallo di confidenza 95%	
	Limite inferiore	Limite superiore
32	19	472

Non essendo disponibile alcun ceppo o isolato positivo per mcr-2, il LoD per il target mcr-2 è stato stimato a 50 copie/mL (pari a 50 CFU/mL), comparabile al valore del LoD per il target mcr-1. Il LoD stimato è stato confermato mediante analisi di 30 replicati di tamponi rettali negativi alla concentrazione corrispondente del target mcr-2 (DNA plasmidico).

Efficienza di rilevazione (inclusività)

L'efficienza di rilevazione del saggio per i geni mcr-1 e mcr-2 (inclusività) per confronto con le sequenze disponibili nella banca dati nucleotidica.

Le regioni scelte per l'ibridazione dei primer e delle sonde fluorescenti sono state verificate rispetto all'allineamento delle sequenze disponibili nella banca dati per i geni mcr-1 e mcr-2. L'analisi ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative.

L'efficienza di rilevazione del saggio per il gene mcr-1 è stata verificata anche analizzando un pannello di 27 isolati culturali resistenti alla colistina caratterizzati come *Enterobacteriaceae* mcr-1 positive.

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Efficienza di rilevazione (inclusività) del COLISTIN-R ELITE MGB® Kit					
Campioni	N	mcr-1 positivo	mcr-2 positivo	Negativo	Non valido
Isolati culturali mcr-1 positivi	27	27	0	0	0

Questo prodotto è in grado di rilevare la resistenza trasmissibile alla colistina (mediata da plasmidi) attraverso il rilevamento dei geni mcr-1 e mcr-2, mentre non è in grado di rilevare i tipi di mcr da 3 a 5 e da 7 a 10. Il tipo mcr-6 può essere rilevato all'interno del rilevatore mcr-2.

Marcatori potenzialmente interferenti

La potenziale cross-reattività del saggio con target diversi da quelli di interesse è stata valutata mediante analisi *in silico* per confronto con le sequenze disponibili nella banca dati nucleotidica.

Le regioni scelte per l'ibridazione dei primer e delle sonde fluorescenti sono state verificate rispetto all'allineamento delle sequenze di organismi che si può ragionevolmente prevedere siano presenti nei campioni di tampone rettale. L'analisi ha dimostrato l'assenza di omologie significative e non ha indicato potenziali interferenze.

L'assenza di cross-reattività con altri organismi potenzialmente presenti nei campioni di tampone rettale è stata verificata anche analizzando un pannello di ceppi certificati alla concentrazione di circa 10⁴ CFU/mL o più in associazione con il sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Potenziale cross-reattività		
Microrganismo	Ceppo	Esito
<i>K. pneumoniae</i>	NCTC 13439 (VIM)	Nessuna cross-reattività
<i>E. coli</i>	NCTC 13476 (IMP)	Nessuna cross-reattività
<i>S. marcescens</i>	UCLA 14-13-A11	Nessuna cross-reattività
<i>A. baumannii</i>	NCTC 13301	Nessuna cross-reattività
<i>A. lwoffii</i>	ATCC 15309	Nessuna cross-reattività
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703	Nessuna cross-reattività
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	Nessuna cross-reattività
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33292	Nessuna cross-reattività
<i>C. albicans</i>	Zeptomatrix Z006	Nessuna cross-reattività
<i>C. freundii</i>	UCLA-14-13-A2 (KPC)	Nessuna cross-reattività
<i>C. difficile</i>	ATCC 43593	Nessuna cross-reattività
<i>C. perfringens</i>	ATCC 13124	Nessuna cross-reattività
<i>P. mirabilis</i>	ATCC 12453	Nessuna cross-reattività
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	Nessuna cross-reattività
<i>S. enterica</i>	ATCC 700720	Nessuna cross-reattività
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-126	Nessuna cross-reattività
<i>E. coli</i>	DICON-055	Nessuna cross-reattività
<i>E. coli</i>	DICON-045	Nessuna cross-reattività
<i>E. coli</i>	NCTC13400	Nessuna cross-reattività

Tutti i ceppi sono risultati negativi quando analizzati con il saggio.

L'assenza di interferenza da parte di altri organismi potenzialmente presenti nei campioni di tampone rettale è stata verificata anche analizzando un pannello di ceppi certificati alla concentrazione di circa 10⁴ CFU/mL addizionati con materiale certificato mcr-1 positivo a una concentrazione finale di circa 3x LoD in associazione con il sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Potenziale interferenza		
Microrganismo	Ceppo	Risultato
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603	Nessuna interferenza
<i>E. coli</i>	ATCC BAA-201	Nessuna interferenza
<i>S. marcescens</i>	UCLA 14-13-A11	Nessuna interferenza
<i>A. baumannii</i>	NCTC 13301	Nessuna interferenza
<i>A. lwoffii</i>	ATCC 15309	Nessuna interferenza
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703	Nessuna interferenza
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	Nessuna interferenza
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33292	Nessuna interferenza
<i>C. albicans</i>	Zeptomatrix Z006	Nessuna interferenza
<i>C. freundii</i>	ATCC 8090	Nessuna interferenza
<i>C. difficile</i>	ATCC 43593	Nessuna interferenza
<i>C. perfringens</i>	ATCC 13124	Nessuna interferenza
<i>P. mirabilis</i>	ATCC 12453	Nessuna interferenza
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	Nessuna interferenza
<i>S. enterica</i>	ATCC 700720	Nessuna interferenza

Continua alla pagina successiva.

Potenziale interferenza		
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-126	Nessuna interferenza
<i>E. coli</i>	DICON-055	Nessuna interferenza
<i>E. coli</i>	DICON-045	Nessuna interferenza
<i>E. coli</i>	NCTC13400	Nessuna interferenza

Nessuno dei ceppi ha interferito con l'amplificazione dei target quando analizzato con il saggio.

Sostanze interferenti

Il saggio è stato utilizzato per analizzare un pannello di sostanze potenzialmente interferenti a concentrazioni rilevanti. Le sostanze testate sono: sangue intero umano, mucina, supposte (olio di vaselina), antibiotico (vancomicina), antiacidi (acido alginico/bicarbonato di sodio), antidiarroico (loperamide cloridrato) e lassativi (sennosidi).

Le sostanze sono state aggiunte singolarmente alla matrice rettale negativa positivamente con materiale di riferimento positivo per mcr-1 (DSMZ) ad una concentrazione finale di 3x LoD. I campioni sono stati analizzati in tre replicati sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Sostanze interferenti			
Sostanza	Concentrazioni Testate	Pos./Rep.	Risultato
Sangue Intero	5% v/v	3 / 3	Mcr-1 DNA rilevato
Mucina	10 mg/mL	3 / 3	Mcr-1 DNA rilevato
Olio di Vaselina	20 mg/mL	3 / 3	Mcr-1 DNA rilevato
Vancomicina	12.5 mg/mL	3 / 3	Mcr-1 DNA rilevato
Acido Alginico/Sodio Bicarbonato	0.1 mg/mL	3 / 3	Mcr-1 DNA rilevato
Loperamide cloridrato	7 µg/mL	3 / 3	Mcr-1 DNA rilevato
Sennosides	0,1mg/mL	3 / 3	Mcr-1 DNA rilevato
Ampicillina	18 µg / mL	3 / 3	Mcr-1 DNA rilevato
Cefpodoxima	4.5 µg / mL	3 / 3	Mcr-1 DNA rilevato
Ciprofloxacina	5 µg / mL	3 / 3	Mcr-1 DNA rilevato
Azytromicina	10 µg / mL	3 / 3	Mcr-1 DNA rilevato

Tutti i campioni sono risultati positivi per il target mcr-1.. Nessuna delle sostanze testate alle concentrazioni oggetto di studio ha mostrato di interferire con la rilevazione del target.

Ripetibilità

La ripetibilità dei risultati ottenuti con il prodotto COLISTIN-R ELITE MGB® Kit in associazione al sistema ELITE InGenius è stata testata eseguendo l'analisi di un pannello di matrice rettale con un campione negativo e tre campioni positivamente con materiale di riferimento positivo per mcr-1 (DSMZ) a concentrazioni di circa 0,5x LoD, 1,5x LoD e 3x LoD.

La ripetibilità è stata ottenuta attraverso l'analisi in triplicato dei campioni del pannello in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto. Sono stati utilizzati tre diversi lotti di prodotto, in tre giorni diversi, con lo stesso strumento e l'analisi è stata eseguita dallo stesso operatore. I campioni sono stati testati con ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati in termini di valori di Ct per ogni target e per il Controllo Interno (IC2) sono stati analizzati come percentuale di Coefficiente di Variabilità (CV%), ottenendo la Ripetibilità come imprecisione.

Il riassunto dei risultati è riportato nella seguente tabella.

Ripetibilità				
Campione	Pos./Rep.	Ct medio mcr-1	Dev. Standard mcr-1	CV% mcr-1
3x LoD (96 CFU/ml)	18/18	36,23	0,44	1,23
1,5x LoD (48 CFU/ml)	18/18	36,82	0,59	1,61
0,5x LoD (16 CFU/ml)	10/18	37,97	0,47	1,25
Matrice rettale negativa	0/18	N.A.	N.A.	N.A.

Nel test di ripetibilità, il saggio ha rilevato il target mcr-1 secondo le previsioni e ha dimostrato un CV% dei valori di Ct minore del 5 %.

Riproducibilità

La riproducibilità dei risultati ottenuti con il prodotto COLISTIN-R ELITE MGB® Kit in associazione al sistema ELITE InGenius è stata testata eseguendo l'analisi di un pannello di matrice rettale con un campione negativo e tre campioni positivamente con materiale di riferimento positivo per mcr-1 (DSMZ) a concentrazioni di circa 0,5x LoD, 1,5x LoD e 3x LoD.

La Riproducibilità è stata ottenuta attraverso l'analisi in triplicato dei campioni del pannello in due sessioni al giorno. Sono stati utilizzati tre diversi lotti di prodotto, in tre giorni diversi, con tre strumenti diversi e l'analisi è stata eseguita da tre operatori diversi. I campioni sono stati testati con ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati in termini di valori di Ct per ogni target e per il Controllo Interno (IC2) sono stati analizzati come percentuale di Coefficiente di Variabilità (CV%), ottenendo la Riproducibilità come imprecisione. Il riassunto dei risultati è riportato nella seguente tabella.

Riproducibilità				
Campione	Pos./Rep.	Ct medio mcr-1	Dev. Standard mcr-1	CV% mcr-1
3x LoD (96 CFU/ml)	18/18	36,07	0,60	1,66
1,5x LoD (48 CFU/ml)	18/18	36,86	0,53	1,44
0,5x LoD (16 CFU/ml)	9/18	37,91	0,71	1,88
Matrice rettale negativa	0/18	N.A.	N.A.	N.A.

Nel test di riproducibilità, il saggio ha rilevato il target mcr-1 secondo le previsioni e ha dimostrato un CV% dei valori di Ct minore del 5 %.

Sensibilità diagnostica (Positive Percent Agreement): conferma di campioni positivi

Data la difficoltà di trovare campioni clinici positivi ai geni mcr-1 e mcr-2, a causa della bassa incidenza di campioni con resistenza trasmissibile alla colistina, sono stati analizzati campioni positivamente per valutare la sensibilità diagnostica del prodotto.

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata tramite l'analisi di 77 campioni di tampone rettale positivamente con isolati di *E. coli* positivi per mcr-1 o mcr-2. 56 campioni di tampone rettale sono stati identificati come negativi mediante metodo culturale e positivamente con diversi ceppi di *E. coli* positivi per mcr-1.

21 campioni di tampone rettale, presumibilmente negativi per le *Enterobacteriaceae* con resistenza trasferibile alla colistina, sono stati positivamente con il ceppo di *E. Coli* NCTC 14378 positivo per mcr-2.

Tutti i campioni sono stati analizzati con il prodotto COLISTIN-R ELITE MGB Kit e il sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Campioni	N	mcr-1 positivi	mcr-2 positivi	negativi	non validi
Tamponi rettali positivamente con mcr-1	56	55	0	0	1
Tamponi rettali positivamente con mcr-2	21	0	21	0	0

Nel test, 55 su 56 campioni positivamente con mcr-1 si sono confermati positivi per mcr-1 e un campione ha dato un risultato non valido, per cui è stato escluso dall'analisi.

Tutti i campioni positivamente con mcr-2 (21 su 21) sono stati confermati positivi per mcr-2.

In questo test, la sensibilità diagnostica per campioni di tampone rettale è risultata uguale al 100% per entrambi i target mcr-1 e mcr-2.

Specificità diagnostica (Negative Percent Agreement): conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata tramite l'analisi di 58 campioni di tampone rettale negativi per mcr-1 e mcr-2.

I 58 campioni di tampone rettale sono stati identificati come negativi mediante metodo culturale e analizzati con il prodotto COLISTIN-R ELITE MGB Kit e il sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Campioni	N	mcr-1 positivi	mcr-2 positivi	negativi	non validi
Tamponi rettali negativi per mcr-1 e mcr-2	58	1	0	54	3

Nel test, 54 su 58 campioni si sono confermati validi e negativi, e un campione è risultato basso positivo per mcr-1. Tre campioni hanno dato un risultato non valido, per cui sono stati esclusi dall'analisi. In questo test, la specificità diagnostica del saggio per campioni di tampone rettale è risultata uguale al 98% per il target mcr-1 e al 100% per il target mcr-2.

Nota bene: 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 del Prodotto "COLISTIN-R ELITE MGB Kit", FTP 202ING.

BIBLIOGRAFIA

- M. G. Wise et al. (2018) PLoS ONE 13(4): e0195281
 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

LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con il seguente campione clinico: tamponi rettali.

Non utilizzare questo prodotto con campioni di origine animale e alimentare.

Non utilizzare questo prodotto con campioni contenenti una quantità eccessiva di matrice fecale: i campioni troppo torbidi inibiscono la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e possono invalidare i risultati.

Al momento, non sono disponibili dati riguardo le prestazioni di questo prodotto con i seguenti campioni clinici: emocoltura, surnatante fecale, urina.

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

La metodica di amplificazione real time degli acidi nucleici utilizzata in questo prodotto, a causa della sua elevata sensibilità analitica, è soggetta a contaminazione da parte di campioni clinici positivi, dei controlli positivi e degli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le contaminazioni portano a risultati falsi positivi. Le modalità di realizzazione del prodotto sono in grado di limitare le contaminazioni, tuttavia questi fenomeni possono essere evitati solo con una buona pratica delle tecniche di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni fornite in questo manuale.

Questo prodotto richiede personale competente e addestrato alla manipolazione di campioni biologici in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati pericolosi per evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e aree di lavoro adeguate alla manipolazione di campioni biologici in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati pericolosi per evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e strumenti dedicati all'allestimento delle sessioni di lavoro per evitare risultati falsi positivi.

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che gli acidi nucleici target del saggio non sono stati rilevati negli acidi nucleici estratti dal campione, ma non si può escludere che il DNA target sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi Caratteristiche delle prestazioni). In questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

In caso di co-infezione, la sensibilità per un target può essere influenzata dall'amplificazione di un secondo target.

Un risultato non valido ottenuto con questo prodotto indica che non è stato possibile rilevare in modo efficiente il Controllo Interno. In questo caso l'analisi del campione dovrà essere ripetuta con possibili ritardi nell'ottenimento del risultato.

Eventuali polimorfismi nelle regioni degli acidi nucleici target in cui ibridano gli oligonucleotidi di innesco e le sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione degli stessi acidi nucleici target.

Questo prodotto non è in grado di rilevare i tipi mcr da 3 a 5 e da 7 a 10. Questo prodotto può rilevare il tipo mcr-6 all'interno del canale mcr-2.

Questo prodotto è in grado di rilevare la resistenza trasmissibile alla colistina (mediata da plasmidi) attraverso i geni mcr-1 e mcr-2, mentre non è in grado di rilevare la resistenza cromosomica.

Come per qualunque altro dispositivo medico diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli altri esami di laboratorio relativi al paziente.

Come per qualunque altro dispositivo medico diagnostico, esiste un rischio residuo di ottenere con questo prodotto risultati non validi, falsi positivi e falsi negativi. Questo rischio residuo non può essere eliminato o ridotto ulteriormente. Questo rischio residuo in situazioni particolari può contribuire a decisioni errate con conseguenze potenzialmente gravi per il paziente.

PROBLEMI E SOLUZIONI













Reazione del Positive Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore durante l'impostazione della sessione.	Controllare la posizione di PCR Mix e Positive Control. Controllare i volumi di PCR Mix e Positive Control.
Degradazione del Positive Control.	Usare una nuova aliquota di Positive Control.
Degradazione della PCR Mix.	Usare una nuova aliquota di PCR Mix.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica ELITechGroup S.p.A.

Reazione del Negative Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore durante l'impostazione della sessione.	Controllare la posizione di PCR Mix e Negative Control. Controllare i volumi di PCR Mix e Negative Control.
Contaminazione del Negative Control.	Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Contaminazione dell'Extraction Area, dei Rack o del Blocco dell'Inventory Area.	Pulire superfici con detergenti acquosi, lavare camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica ELITechGroup S.p.A.

Reazione dei campioni non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore durante l'impostazione della sessione.	Controllare la posizione di PCR Mix e campione. Controllare i volumi di PCR Mix e campione.
Degradazione dell'Internal Control.	Utilizzare una nuova aliquota di Internal Control.
Inibizione causata da sostanze interferenti con il campione. (es. torbidità)	Ripetere l'amplificazione diluendo il campione eluito 1:2 o 1:5 in acqua per biologia molecolare, impostando la sessione "PCR only". Ripetere l'estrazione diluendo il campione clinico con un'ulteriore diluizione 1:2 in eNAT®, impostando la sessione "Extract + PCR".
Degradazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica ELITechGroup S.p.A.

Errore 30103	
Possibili cause	Soluzioni
Elevata concentrazione del target nel campione.	Se si osserva nel PCR plot un'amplificazione significativa: - selezionare il track del campione ed approvare manualmente il risultato. Se è richiesto un valore di Ct: - ripetere l'amplificazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito, impostando una sessione in modalità "PCR only" oppure - ripetere l'estrazione con un'ulteriore diluizione 1:10 in eNAT® del campione clinico, impostando una sessione in modalità "Extract + PCR".

LEGENDA DEI SIMBOLI

	Numero di catalogo.
	Limite superiore di temperatura.
	Codice del lotto.
	Da utilizzarsi entro (ultimo giorno del mese).
	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i> .
	Conforme ai requisiti del Regolamento (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medici diagnostici <i>in vitro</i> . Certificazione rilasciata da DEKRA Certification B.V., Olanda.
	Identificazione univoca del dispositivo
	Contenuto sufficiente per "N" test.
	Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.
	Contenuto.
	Tenere lontano dalla luce solare.
	Fabbricante.

NOTA PER L'UTILIZZATORE

Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiede l'utilizzatore e/o il paziente. Al momento dell'attuale revisione dell'IFU, non si sono verificati incidenti gravi o richiami del dispositivo.

Una "Sintesi della sicurezza e delle prestazioni" (Summary of Safety and Performances) sarà resa disponibile al pubblico attraverso la banca dati europea sui dispositivi medici (Eudamed) quando questo sistema informatico sarà operativo.

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

I reagenti di rilevazione ELITE MGB® sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. numero 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 e da brevetti EP n. 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939. Sono state poi presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.


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

ELITE MGB®, il logo ELITE MGB® ed ELITE InGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup all'interno dell'Unione Europea.

eNAT® e eSWAB® sono marchi registrati di COPAN Italia S.p.A.

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
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

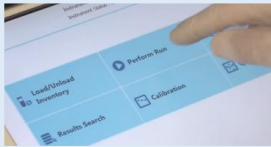
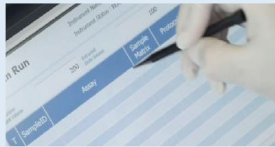



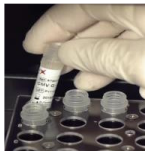

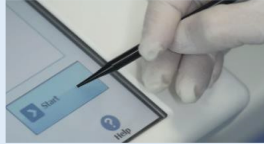
I. Procedures

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
