

Xpert® Carba-R

REF **GXCARBARP-CE-10**

GXCARBARP-CE-120

Trademark, Patents and Copyright Statements

Cepheid[®], the Cepheid logo, GeneXpert[®] and Xpert[®] are trademarks of Cepheid.

Remel[™] is a trademark of Remel.

BBL[™] and Sensi-Disc[™] are trademarks of Becton Dickinson.

Windows[®] is a trademark of Microsoft Corporation.

THE PURCHASE OF THIS PRODUCT CONVEYS TO THE BUYER THE NON-TRANSFERABLE RIGHT TO USE IT IN ACCORDANCE WITH THIS PACKAGE INSERT. NO OTHER RIGHTS ARE CONVEYED EXPRESSLY, BY IMPLICATION OR BY ESTOPPEL. FURTHERMORE, NO RIGHTS FOR RESALE ARE CONFERRED WITH THE PURCHASE OF THIS PRODUCT.

Copyright © Cepheid 2018-2023. All rights reserved.

Dichiarazioni relative a marchi di fabbrica, brevetti e copyright

Cepheid[®], il logo Cepheid, GeneXpert[®] ed Xpert[®] sono marchi di fabbrica di Cepheid.

Remel[™] è un marchio di fabbrica di Remel.

BBL[™] e Sensi-Disc[™] sono marchi di fabbrica di Becton Dickinson.

Windows[®] è un marchio di fabbrica di Microsoft Corporation.

L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO CONCEDE ALL'ACQUIRENTE IL DIRITTO NON TRASFERIBILE DI UTILIZZARLO IN CONFORMITÀ CON QUESTO FOGLIETTO ILLUSTRATIVO. NESSUN ALTRO DIRITTO VIENE CONCESSO ESPRESSAMENTE, IMPLICITAMENTE O PER PRECLUSIONE. INOLTRE, CON L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO NON VIENE CONCESSO NESSUN DIRITTO ALLA RIVENDITA.

Copyright © Cepheid 2018-2023. Tutti i diritti riservati.



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA
Phone: + 1 408 541 4191
Fax: + 1 408 541 4192



Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France
Phone: + 33 563 825 300
Fax: + 33 563 825 301

Xpert® Carba-R

Solo per uso diagnostico *in Vitro*

1 Nome registrato

Xpert® Carba-R

2 Nome comune o usuale

Saggio Xpert Carba-R

3 Uso previsto del dispositivo

Il saggio Xpert Carba-R, eseguito su Sistema di strumentazione GeneXpert®, è un test diagnostico qualitativo *in vitro* studiato per individuare e differenziare le sequenze geniche *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{IMP} associate alla non suscettibilità ai carbapenemi. Il test utilizza la reazione a catena della polimerasi (PCR), automatica e in tempo reale.

Il saggio Xpert Carba-R è indicato come ausilio per il controllo delle infezioni nell'identificazione dei batteri non suscettibili ai carbapenemi che colonizzano i pazienti negli ambienti sanitari. Un risultato negativo per il saggio Xpert Carba-R non preclude la presenza di altri meccanismi di resistenza.

Il saggio Xpert Carba-R è previsto per l'uso con i seguenti tipi di campioni:

Colonie pure

Il saggio viene eseguito su colonie pure non suscettibili ai carbapenemi di *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa*, quando coltivate su agar sangue o agar MacConkey. Per testare le colonie pure, il saggio Xpert Carba-R deve essere utilizzato insieme ad altri test di laboratorio compreso il test per la determinazione fenotipica della sensibilità antimicrobica.

L'identificazione di un gene metallo-beta-lattamasi *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM} o *bla*_{VIM} (ovvero, il gene che codifica rispettivamente le metallo-beta-lattamasi IMP, NDM e VIM) può essere utilizzata come ausilio per i medici nella determinazione appropriata delle strategie terapeutiche da adottare per pazienti con note o sospette infezioni da batteri non suscettibili ai carbapenemi.

Campioni di tamponi rettali e perirettali

Il saggio viene eseguito su campioni ottenuti da campioni di analisi di tamponi rettali e perirettali in pazienti a rischio di colonizzazione intestinale da parte di batteri non suscettibili ai carbapenemi. Sono necessarie colture complementari per ottenere i microrganismi da utilizzare per la tipizzazione epidemiologica, l'analisi della suscettibilità antimicrobica e l'ulteriore identificazione batterica di conferma.

Il saggio Xpert Carba-R, se eseguito su campioni ottenuti mediante campioni di analisi di tamponi rettali e perirettali, non è destinato all'uso come guida o monitoraggio per il trattamento delle infezioni da batteri non suscettibili ai carbapenemi o per la determinazione di infezione da batteri non suscettibili ai carbapenemi.

4 Riepilogo e spiegazione

La diffusione mondiale dei batteri produttori di carbapenemasi, appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* e alle specie *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* (ovvero, i microrganismi non suscettibili ai carbapenemi (Carbapenem Non-Susceptible Organisms, CNSO)), rappresenta un problema di importanza fondamentale dal punto di vista medico e della sanità pubblica.^{1,2} Questi batteri sono spesso resistenti a tutti gli agenti beta-lattamici e mostrano frequentemente una co-resistenza a multiple classi di altri agenti antimicrobici, lasciando spazio a pochissime opzioni di trattamento.³ La diversità emergente degli enzimi che idrolizzano i carbapenemi, nonché la capacità di diffusione dei geni tra le varie specie batteriche rendono complicato il monitoraggio della diffusione dei CNSO. Alcuni geni di resistenza, come i determinanti della carbapenemasi di *Klebsiella pneumoniae* (KPC), sono associati a linee batteriche clonali (es. *K. pneumoniae* ST258),⁴ che si sono affermate mostrando un vantaggio selettivo negli ambienti ospedalieri dove l'uso degli agenti antimicrobici è alto. Le occasioni di trasmissione dei microrganismi sono spesso frequenti, con un'ulteriore disseminazione dei geni di resistenza attraverso plasmidi e integroni trasmissibili. Il ceppo ST258 di *K. pneumoniae* ha causato varie epidemie in tutto il mondo, soprattutto negli Stati Uniti¹ e in Israele.⁵ Analogamente, i microrganismi contenenti il gene che codifica la New Delhi metallo-beta-lattamasi (NDM) sono stati introdotti in Europa da individui che, in molti casi, hanno visitato l'India o il Pakistan.⁶ Un terzo meccanismo di resistenza ai carbapenemi, il percorso in cui è coinvolta la Verona metallo-beta-lattamasi mediata da integroni (VIM), rappresenta un

problema in Europa da diversi anni. Altre metallo-beta-lattamasi, come quelle appartenenti alla classe delle imipenemasi (IMP), sono riconosciute da molti anni in Giappone e in altri Paesi asiatici e si stanno ora diffondendo in tutto il mondo.³ Inoltre, la oxacillinas di classe D, OXA-48, che è spesso coinvolta nella mediazione della resistenza ai bassi livelli di carbapenemi, si sta ora diffondendo rapidamente in Europa.^{7,8} Al momento, il metodo standard per l'individuazione dei pazienti colonizzati da microrganismi non suscettibili ai carbapenemi è rappresentato dalla coltura di tamponi rettali o perirettali su piastre di agar selettivo Gram-negativo, come l'agar MacConkey, seguita dall'analisi della sensibilità antimicrobica delle colonie lattosio fermentanti, oppure dall'uso di terreni a base di agar per lo screening selettivo.⁹ Il primo metodo è laborioso e possono essere necessari diversi giorni per ottenere un risultato finale, mentre il secondo approccio varia considerevolmente in sensibilità e specificità a seconda del terreno selettivo utilizzato.

Un metodo rapido e accurato per determinare se un campione di analisi di tampone rettale o perirettale o un isolato di batteri non suscettibili ai carbapenemi ospita una di queste cinque classi comuni di geni di resistenza ai carbapenemi costituirebbe un ausilio considerevole per i programmi di controllo delle infezioni soprattutto durante le epidemie, in quanto potrebbe: 1) Identificare il gene specifico di resistenza presente nel microrganismo e 2) differenziare i microrganismi con i geni più comuni di resistenza trasmissibile ai carbapenemi che codificano gli enzimi carbapenemasi da organismi resistenti a causa di altre beta-lattamasi e/o modifiche della parete cellulare dell'organismo, il che può non richiedere necessariamente di sottoporre il paziente a misure precauzionali al fine di evitare il contatto.

Le sfide terapeutiche associate alle enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi hanno contribuito all'acquisizione di una maggiore consapevolezza sulla necessità di un rapido rilevamento e implementazione di misure efficaci di contenimento e prevenzione della trasmissione. Gli agenti antimicrobici, come le nuove combinazioni di inibitori beta-lattamici/beta-lattamasi, hanno un'attività variabile nei confronti dei batteri che producono tipi differenti di beta-lattamasi. I risultati del saggio Xpert Carba-R che mostrano la presenza di geni metallo-beta-lattamasi *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{NDM} provenienti da colonie pure dei microrganismi dichiarati può essere utile nella determinazione di una strategia terapeutica che includa combinazioni di inibitori beta-lattamici/beta-lattamasi.^{10,11,12,13,14}

5 Principio della procedura

I sistemi di strumentazione GeneXpert consentono di automatizzare e integrare la preparazione dei campioni, l'estrazione e l'amplificazione degli acidi nucleici e il rilevamento della sequenza bersaglio in campioni semplici o complessi, utilizzando i saggi di PCR in tempo reale. I sistemi comprendono uno strumento, un personal computer e un software preinstallato per l'esecuzione dei test e la visualizzazione dei risultati. I sistemi richiedono l'uso di cartucce monouso che contengono i reagenti PCR e consentono il processo di PCR. Essendo le cartucce chiuse, il rischio di contaminazione crociata tra i campioni è ridotto al minimo. Per una descrizione completa del sistema, consultare il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx* o il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Infinity*.

Il saggio Xpert Carba-R contiene reagenti per il rilevamento delle sequenze geniche *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48}, e *bla*_{IMP}, nonché un controllo per il trattamento dei campioni (SPC) per verificare l'adeguatezza del trattamento dei batteri bersaglio e per indicare la presenza di inibitori nella reazione della PCR. Il controllo SPC garantisce inoltre che le condizioni della reazione di PCR (temperatura e tempo) siano adeguate alla reazione di amplificazione e che i reagenti PCR siano funzionali. Un ulteriore controllo interno, il controllo per la verifica della sonda (Probe Check Control, PCC) verifica la reidratazione dei reagenti, il riempimento della provetta PCR nella cartuccia, l'integrità della sonda e la stabilità del colorante.

I primer e le sonde del saggio Xpert Carba-R rilevano le sequenze proprietarie relative alle sequenze geniche *bla*_{KPC} (KPC), *bla*_{NDM} (NDM), *bla*_{VIM} (VIM), *bla*_{OXA-48} (OXA-48), e *bla*_{IMP} (IMP) associate alla non suscettibilità ai carbapenemi nei batteri Gram-negativi.

6 Reagenti e strumenti

6.1 Materiali in dotazione



Il kit (GXCARBARP-CE-10) per il saggio Xpert Carba-R contiene una quantità di reagenti sufficiente per il trattamento di 10 campioni e il kit (GXCARBARP-CE-120) per il saggio Xpert Carba-R contiene una quantità di reagenti sufficiente per il trattamento di 120 campioni. Il contenuto dei kit è il seguente.

Cartucce del saggio Xpert Carba-R con provette di reazione integrate

	10	120
• Microsfera 1, microsfera 2 e microsfera 3 (liofilizzate)	1 di ciascuna per cartuccia	1 di ciascuna per cartuccia
• Reagente 1	3 ml per cartuccia	3 ml per cartuccia
• Reagente 2 (cloruro di guanidina)	2,5 ml per cartuccia	2,5 ml per cartuccia

Flaconcini di reagente per il campione per il saggio Xpert

Carba-R	10	120
• Reagente per il campione	5,0 ml per flaconcino	5,0 ml per flaconcino

Pipette di trasferimento monouso (1,7 ml)

CD	1	1
-----------	----------	----------

- File di definizione del saggio (Assay Definition Files, ADF)
- Istruzioni per l'importazione dei file ADF all'interno del software
- Istruzioni per l'uso (foglietto illustrativo)

Nota

Le schede dati di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) sono disponibili nei siti www.cepheid.com o www.cepheidinternational.com nella scheda **ASSISTENZA (SUPPORT)**.

Nota

L'albumina di siero bovino (BSA) presente nelle microsferiche di questo prodotto è stata prodotta esclusivamente da plasma bovino di origine statunitense. Gli animali non sono stati nutriti con proteine di ruminanti o altre proteine animali; gli animali hanno superato i test ante e post mortem. Durante la lavorazione, il materiale non è stato miscelato con altro materiale animale.

6.2 Conservazione e manipolazione

- Conservare le cartucce del saggio Xpert Carba-R tra 2 °C e 28 °C.



- Aprire il coperchio della cartuccia solo immediatamente prima di eseguire il test.
- Non utilizzare i reagenti o le cartucce oltre la data di scadenza.
- Il reagente per il campione è un liquido trasparente incolore. Non usare il reagente per il campione se appare torbido o scolorito.
- Usare la cartuccia entro 30 minuti dall'apertura del coperchio.
- Non utilizzare cartucce che presentano perdite.

6.3 Materiali necessari ma non forniti

- Sistemi di strumentazione GeneXpert Dx o GeneXpert Infinity (il numero di catalogo varia in base alla configurazione): strumento GeneXpert, computer, lettore di codici a barre e Manuale dell'operatore.
 - Per il sistema GeneXpert Dx: software GeneXpert Dx versione 4.3 o successiva
- Dispositivo di prelievo del campione di analisi: Numero di catalogo Cepheid 900-0370
- Agar sangue (ad es., Agar sangue Remel™: Numero di catalogo R01200 o equivalente)
- Agar MacConkey (ad es., Agar MacConkey Remel™: Numero di catalogo R01550 o equivalente)
- Dischetti di meropenem da 10 µg (ad es., dischetti per l'analisi della suscettibilità antimicrobica BD BBL™ Sensi-Disc™, meropenem, numero di catalogo 231704 o equivalente)
- Pinzette sterili
- Anse da inoculo da 10 µl sterili, monouso (ad es., Copan: Numero di catalogo COPS-10, o Hardy Diagnostics: Numero di catalogo L2002A o equivalente)
- Miscelatore vortex
- Stampante: se fosse necessaria una stampante, contattare l'Assistenza Tecnica di Cepheid per predisporre l'acquisto di una stampante consigliata.

7 Avvertenze e precauzioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per uso su prescrizione.
- Tutti i campioni biologici di analisi, comprese le cartucce usate, devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi. Poiché, nella maggior parte dei casi, è impossibile distinguere i potenziali veicoli di infezione, tutti i campioni biologici di analisi devono essere trattati attenendosi alle precauzioni standard. Le linee guida per la manipolazione dei campioni di analisi sono disponibili presso l'ente statunitense per la prevenzione e il controllo delle malattie (U.S. Centers

for Disease Control and Prevention)^{15,16} e l'istituto per gli standard clinici e di laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute).¹⁷

- Attenersi alle procedure di sicurezza del proprio istituto per l'utilizzo e la manipolazione di sostanze chimiche e campioni biologici/piastre di agar con colonie pure.
- I campioni biologici di analisi, i dispositivi di trasferimento e le cartucce usate devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi adottando le precauzioni standard. Attenersi alle procedure di smaltimento dei rifiuti ambientali della propria struttura sanitaria per il corretto smaltimento delle cartucce usate e dei reagenti non utilizzati. Questi materiali potrebbero essere considerati rifiuti chimici pericolosi per il cui smaltimento sarà necessario attenersi a specifiche procedure nazionali o regionali. Se i regolamenti nazionali o regionali non forniscono istruzioni chiare sul corretto smaltimento, i campioni biologici di analisi e le cartucce usate devono essere smaltiti in base alle linee guida dell'OMS (Organizzazione mondiale della sanità) sulla manipolazione e lo smaltimento dei rifiuti medici.
- Si consiglia di adottare le buone pratiche di laboratorio che includono il cambio dei guanti tra la manipolazione di un campione di analisi e quello successivo al fine di evitare la contaminazione dei campioni o dei reagenti.
- Non sostituire il reagente per il campione del saggio Xpert Carba-R con altri reagenti.
- Non aprire il coperchio della cartuccia del saggio Xpert Carba-R fino a quando non si è pronti ad aggiungere il campione.
- Non utilizzare una cartuccia che sia caduta dopo essere stata estratta dalla confezione.
- Non agitare la cartuccia. Se la cartuccia cade o viene agitata dopo l'apertura del coperchio, si potrebbero ottenere risultati non validi.
- Non applicare l'etichetta con l'ID campione sul coperchio della cartuccia o sull'etichetta del codice a barre.
- ② • Ciascuna cartuccia monouso del saggio Xpert Carba-R viene utilizzata per l'esecuzione di un solo test. Non riutilizzare le cartucce usate.
- Non utilizzare una cartuccia la cui provetta di reazione è danneggiata.
- Indossare camice da laboratorio pulito e guanti. Cambiare i guanti quando si passa da un campione all'altro durante il trattamento dei campioni.
- Nel caso in cui l'area di lavoro o le apparecchiature vengano contaminate dai campioni o dai controlli, pulire a fondo le superfici interessate con una soluzione diluita 1:10 di candeggina per uso domestico; ripetere quindi la pulizia con una soluzione di etanolo al 70%. Asciugare completamente le superfici di lavoro prima di continuare.

8 Pericoli chimici^{18, 19}

- Pittogramma di pericolo UN GHS: 
- Avvertenza: ATTENZIONE
- **Fraasi di prudenza UN GHS**
 - **Prevenzione**
 - Lavare accuratamente dopo l'uso.
 - Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
 - **Risposta**
 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.
 - Trattamento specifico (vedere le informazioni supplementari di pronto soccorso).
 - Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.
 - In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.
 - IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
 - Se l'irritazione degli occhi persiste: consultare un medico.
 - In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

9 Preparazione e conservazione del campione

Tamponi rettali o perirettali:

Per i tamponi da utilizzare, vedere Sezione 6.3, Materiali necessari ma non forniti.



- Prelievo di una coppia di tamponi rettali: Inserire con attenzione le punte di entrambi i tamponi approssimativamente 1 cm oltre lo sfintere anale e farli ruotare delicatamente. Consultare la sezione “Materiali necessari ma non forniti” per i tamponi da utilizzare e Figura 1 e Figura 2 per esempio di tamponi accettabili e non accettabili per l’uso con il saggio Xpert Carba-R.
- Prelievo di una coppia di tamponi perirettali: Inserire con cautela le punte di entrambi i tamponi non più di 1 cm nell’orifizio anale prima dello sfintere anale e farli ruotare delicatamente.
- I tamponi possono essere conservati nella provetta di trasporto tra 15 °C e 28 °C per massimo cinque giorni.
- Figura 1 di seguito fornisce esempi di campioni di analisi di tamponi accettabili per l’uso con il saggio Xpert Carba-R e la Figura 2 esempi di campioni di analisi di tamponi molto sporchi che non devono essere utilizzati con il saggio Xpert Carba-R.



Figura 1. Esempi di campioni di analisi di tamponi accettabili per il test del saggio Xpert Carba-R

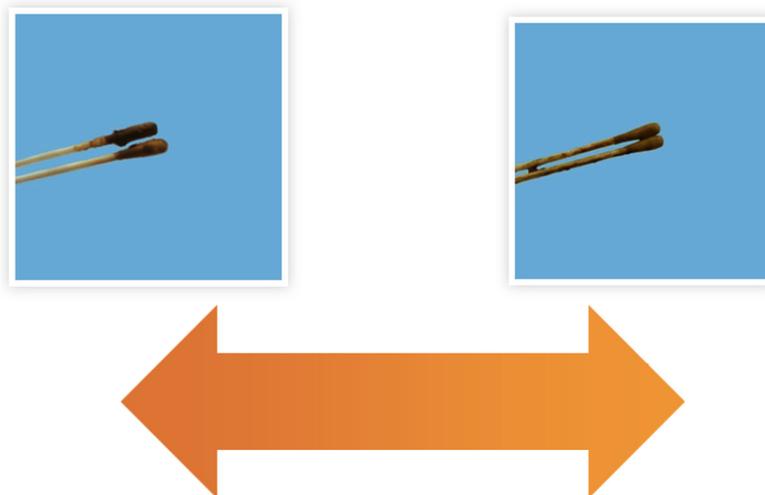


Figura 2. Esempi di tamponi inaccettabili per il test del saggio Xpert Carba-R

Isolati batterici:

1. Prima del test sul saggio Xpert Carba-R, devono essere identificati gli organismi e deve essere determinato lo stato di non suscettibilità ai carbapenemi secondo il foglietto illustrativo del farmaco approvato dall’FDA corrente e la versione più recente delle linee guida CLSI M100²⁰.

2. Inoculare il microrganismo in una piastra di agar sangue o MacConkey, eseguire lo striscio per l'isolamento e collocare un dischetto di meropenem da 10 µg nel primo quadrante di striscio in modo da garantire che l'isolato mantenga la sua non suscettibilità ai carbapenemi.
3. Incubare la piastra a 35 °C per 18-24 ore nell'aria ambiente.
4. Utilizzare il metodo della sospensione diretta delle colonie toccando le colonie isolate con un tampone o un'ansa per preparare una sospensione di isolato batterico allo 0,5 dello standard McFarland come indicato nelle linee guida approvate CLSI M07.²¹ I passaggi sono descritti anche di seguito.
 - A. Effettuare una sospensione di colonie isolate selezionate da una piastra di agar (ad es., un terreno non selettivo come agar sangue incubato da 18 a 24 ore) direttamente in brodo o soluzione fisiologica.
 - B. Regolare la sospensione per ottenere una torbidità equivalente allo 0,5 dello standard McFarland. In tal modo si ottiene una sospensione contenente circa da 1 a 2×10^8 CFU/ml di *E. coli* dall'ATCC (American Type Culture Collection, Raccolta americana di culture tipo) 25922.
 - C. Utilizzare un fotometro o, se si esegue visivamente, usare una luce adeguata per poter confrontare la provetta contenente l'inoculo e lo standard 0,5 McFarland con una scheda a sfondo bianco e linee nere di contrasto.

10 Procedura

10.1 Preparazione della cartuccia

Importante Collocare la cartuccia all'interno dello strumento GeneXpert entro 30 minuti dall'aggiunta del campione alla cartuccia.

1. Dal kit di test, estrarre una cartuccia di saggio Xpert Carba-R, un flaconcino di reagente per il campione e una pipetta di trasferimento. Aprire il flaconcino di reagente per il campione.
2. Per inserire il campione nella cartuccia:
 - Per i tamponi rettali o perirettali, procedere come segue per aggiungere il tampone alla cartuccia:
 - Dai tamponi accoppiati, collocare un tampone nel flaconcino del reagente per il campione. Rimettere il tampone non utilizzato nella provetta di trasporto e conservarlo.

Nota Per le condizioni di conservazione dei tamponi rettali o perirettali, fare riferimento a Sezione 9. Per ripetere il test, è possibile utilizzare il secondo tampone rimanente.

Nota Per ripetere il test di tamponi rettali o perirettali, fare riferimento a Sezione 14, Procedura di ripetizione del test.

- Tenere il tampone vicino al bordo del flaconcino reggendolo dall'asta, sollevare il tampone di qualche millimetro dal fondo del flaconcino e piegare l'asta sul bordo del flaconcino per spezzarla all'altezza della tacca, affinché il tampone risulti sufficientemente corto da entrare all'interno del flaconcino; in questo modo sarà possibile chiudere bene il tappo.
- Per gli isolati batterici, aggiungere la sospensione 0,5 McFarland dell'isolato alla cartuccia nel seguente modo:
 - Miscelare in vortex la sospensione 0,5 McFarland. Usando un'ansa da 10 µl, trasferire 10 µl della sospensione di 0,5 McFarland in un flaconcino da 5 ml di reagente per il campione. Roteare l'ansa minimo tre volte nel reagente per il campione. Dopo il test iniziale, il campione rimasto nel flaconcino del reagente per il campione può essere conservato a 2-28 °C per un massimo di cinque giorni se è necessario ripetere il test.

Nota Per istruzioni su come ripetere il test per campioni di isolati batterici, fare riferimento a Sezione 14, Procedura di ripetizione del test.

Nota Accertarsi che l'ansa da 10 µl sia piena di campione e che la sospensione del campione nell'ansa non esploda durante il trasferimento della sospensione 0,5 McFarland nel reagente per il campione.

3. Chiudere saldamente il tappo del flaconcino di reagente per il campione e miscelare in vortex ad alta velocità per 10 secondi.
4. Aprire il coperchio della cartuccia. Aprire il tappo del reagente per il campione. Utilizzando la pipetta di trasferimento in dotazione, aspirare il campione preparato (reagente contenente il campione da Passaggio 2) fino alla tacca sulla pipetta (che corrisponde a circa 1,7 ml; vedere Figura 3). Trasferire quindi il materiale nell'apertura grande della camera del campione (vedere la Figura 4) della cartuccia del saggio Xpert Carba-R.

5. Collocare il coperchio della cartuccia all'interno dello strumento GeneXpert entro 30 minuti dall'aggiunta del campione alla cartuccia.

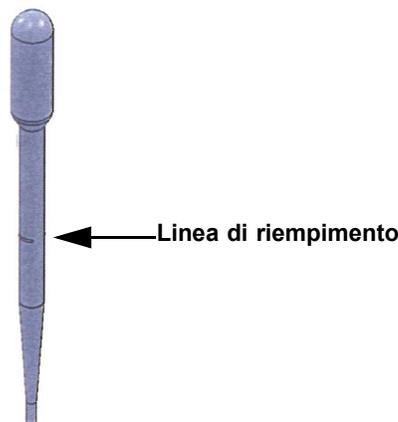


Figura 3. Pipetta di trasferimento per trasferire il campione alla cartuccia

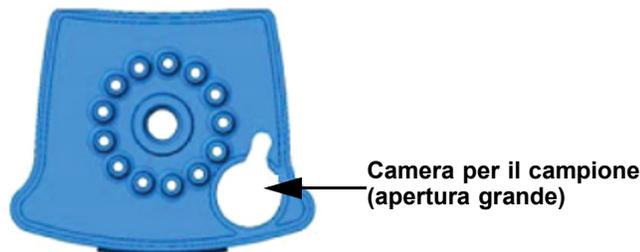


Figura 4. Cartuccia del saggio Xpert Carba-R (vista dall'alto)

10.2 Avvio del test

Importante

Prima di iniziare il test, verificare che il file di definizione del saggio Xpert Carba-R sia stato importato all'interno del software. Questa sezione elenca le fasi principali di esecuzione del test. Per istruzioni dettagliate, consultare il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx* o il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Infinity*.

Nota

I passaggi da seguire possono variare se l'amministratore del sistema modifica il flusso di lavoro predefinito del sistema. Di seguito è riportato il flusso di lavoro predefinito.

1. Accendere il sistema di strumentazione GeneXpert.
 - Se si utilizza lo strumento GeneXpert Dx, accendere prima lo strumento e poi il computer. Il software GeneXpert si avvia automaticamente; in caso contrario, fare doppio clic sull'icona del software GeneXpert Dx sul desktop di Windows®.
 - oppure
 - Se si utilizza lo strumento GeneXpert Infinity, accenderlo. Il software Xpertise si avvierà automaticamente, oppure potrebbe essere necessario fare doppio clic sull'icona del software Xpertise sul desktop di Windows.
2. Connettersi al software del sistema di strumentazione GeneXpert usando il proprio nome utente e la password.
3. Nella finestra del sistema GeneXpert, fare clic su **Crea analisi (Create Test)** (GeneXpert Dx) oppure fare clic su **Ordini (Orders)** e **Ordina analisi (Order Test)** (Infinity).
4. Eseguire la scansione dell'ID paziente (Patient ID) (opzionale). Se l'ID paziente (Patient ID) viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente. L'ID paziente (Patient ID) è associato ai risultati del test e viene visualizzato nella finestra Visualizza risultati (View Results).

5. Inserire l'ID campione (Sample ID) tramite scansione o manualmente. Se l'ID campione (Sample ID) viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente. L'ID campione (Sample ID) è associato ai risultati del test e viene visualizzato nella finestra Visualizza risultati (View Results).
6. Eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia del saggio Xpert Carba-R. Usando le informazioni contenute nel codice a barre, il software riempie automaticamente le caselle corrispondenti ai seguenti campi: Seleziona saggio (Select Assay), ID lotto reagente (Reagent Lot ID), N/S cartuccia (Cartridge SN) e Data di scadenza (Expiration Date).

Nota Se il codice a barre sulla cartuccia di Xpert Carba-R non viene acquisito, impostare un nuovo test seguendo la procedura di ripetizione del test descritta nella Sezione 14.

7. Fare clic su **Avvia analisi (Start Test)** (GeneXpert Dx) o **Inoltra (Submit)** (Infinity). Immettere la password, se richiesto.
8. Per il sistema GeneXpert Infinity, posizionare la cartuccia sul nastro trasportatore. La cartuccia viene caricata automaticamente, il test viene eseguito e la cartuccia usata viene quindi collocata nel contenitore dei rifiuti.
oppure
Per lo strumento GeneXpert Dx
 - A. Aprire lo sportello del modulo dello strumento con la spia verde lampeggiante e caricare la cartuccia.
 - B. Chiudere lo sportello. Il test viene avviato e la spia verde smette di lampeggiare. Al termine del test, la spia si spegne.
 - C. Attendere che il sistema abbia sbloccato lo sportello del modulo prima di aprirlo. Quindi rimuovere la cartuccia.
 - D. Smaltire le cartucce usate negli appositi contenitori dei rifiuti per campioni di analisi, attenendosi alla prassi standard del proprio presidio.

10.3 Visualizzazione e stampa dei risultati

In questa sezione sono elencati i passaggi principali per la visualizzazione e la stampa dei risultati. Per istruzioni più dettagliate su come visualizzare e stampare i risultati, consultare il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx* o il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Infinity*.

1. Per visualizzare i risultati, fare clic sull'icona **Visualizza risultati (View Results)**.
2. Una volta completato il test, fare clic sul pulsante Rapporto (Report) nella finestra Visualizza risultati (View Results) per visualizzare e/o generare un file di rapporto in formato PDF.

11 Controllo qualità

CONTROL Controlli di qualità incorporati

Ciascun test comprende un controllo per il trattamento dei campioni (SPC) e un controllo per la verifica della sonda.

- **Controllo elaborazione del campione (Sample Processing Control, SPC)** – Assicura che il campione sia stato trattato correttamente. Il controllo SPC contiene spore di *Bacillus globigii* sotto forma di microsferi essiccate, presenti in ogni cartuccia per verificare il corretto trattamento del campione. L'SPC verifica che sia avvenuta la lisi dei batteri se gli organismi sono presenti e verifica l'adeguatezza del trattamento del campione. Questo controllo rileva inoltre l'inibizione del saggio di PCR in tempo reale associata al campione, garantisce che le condizioni di reazione della PCR (temperatura e tempo) siano adeguate alla reazione di amplificazione e che i reagenti PCR siano funzionali.
L'SPC deve essere positivo in un campione negativo e può essere negativo o positivo in un campione positivo. L'SPC si considera superato se soddisfa i criteri di accettazione convalidati.
- **Controllo per la verifica della sonda (Probe Check Control, PCC)** – Prima che inizi la reazione PCR, il sistema GeneXpert misura il segnale di fluorescenza emesso dalle sonde, allo scopo di monitorare la reidratazione delle microsferi, il riempimento delle provette di reazione, l'integrità delle sonde e la stabilità dei coloranti. La verifica della sonda si considera riuscita qualora siano soddisfatti i criteri di accettazione assegnati.

Controlli esterni

Possono essere usati controlli esterni, in conformità con gli organismi di accreditamento locali, regionali e nazionali pertinenti.

12 Interpretazione dei risultati

I risultati vengono interpretati dal sistema GeneXpert, a partire dai segnali fluorescenti misurati e dagli algoritmi di calcolo incorporati e vengono visualizzati nella finestra Visualizza risultati (View Results). Le schermate acquisite e le interpretazioni relative a tutte le combinazioni di risultati possibili con i cinque analiti bersaglio nel saggio Xpert Carba-R non vengono visualizzate; tuttavia, gli esempi seguenti sono indicativi del tipo di risultati che ci si può attendere.

Nota La tabella e le figure riportate di seguito mostrano solo esempi rappresentativi dei tipi di risultati che ci si può attendere con il saggio Xpert Carba-R. Non sono riportate tutte le combinazioni di risultati possibili con i cinque analiti bersaglio.

Tabella 1. Risultati rappresentativi per il saggio Xpert Carba-R e interpretazione

Risultato	Interpretazione
IMP RILEVATO (IMP DETECTED); VIM NON RILEVATO (VIM NOT DETECTED); NDM NON RILEVATO (NDM NOT DETECTED); KPC NON RILEVATO (KPC NOT DETECTED); OXA48 NON RILEVATO (OXA48 NOT DETECTED) Vedere la Figura 5.	<p>La sequenza bersaglio del DNA di IMP è stata rilevata; le sequenze bersaglio del DNA di VIM, NDM, KPC e OXA-48 non sono state rilevate.</p> <ul style="list-style-type: none"> L'amplificazione mediante PCR della sequenza bersaglio del DNA di IMP fornisce un valore Ct entro l'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra del valore soglia impostato; le sequenze bersaglio del DNA di VIM, NDM, KPC e OXA-48 sono assenti o al di sotto del livello di rilevamento del saggio. SPC: Non applicabile. Il risultato relativo all'SPC viene ignorato perché l'amplificazione della sequenza bersaglio del DNA di IMP può competere con questo controllo. PCC: AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi. Le strategie terapeutiche che includono agenti antimicrobici, come le combinazioni di inibitori beta-lattamici/beta-lattamasi con un'attività limitata o nulla contro i batteri produttori di metallo-beta-lattamasi, devono essere usate con cautela. I risultati del saggio Xpert Carba-R che mostrano la presenza di geni metallo-beta-lattamasi <i>bla</i>_{IMP}, <i>bla</i>_{VIM} e <i>bla</i>_{NDM} provenienti da colonie pure degli organismi dichiarati possono essere utili nel determinare una strategia terapeutica in pazienti con infezioni batteriche non suscettibili ai carbapenemi note o sospette.
IMP NON RILEVATO (IMP NOT DETECTED); VIM RILEVATO (VIM DETECTED); NDM NON RILEVATO (NDM NOT DETECTED); KPC NON RILEVATO (KPC NOT DETECTED); OXA48 NON RILEVATO (OXA48 NOT DETECTED) Vedere la Figura 6.	<p>La sequenza bersaglio del DNA di VIM è stata rilevata; le sequenze bersaglio del DNA di IMP, NDM, KPC e OXA-48 non sono state rilevate.</p> <ul style="list-style-type: none"> L'amplificazione mediante PCR della sequenza bersaglio del DNA di VIM fornisce un valore Ct entro l'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra del valore soglia impostato; le sequenze bersaglio del DNA di IMP, NDM, KPC e OXA-48 sono assenti o al di sotto del livello di rilevamento del saggio. SPC: Non applicabile. Il risultato relativo all'SPC viene ignorato perché l'amplificazione della sequenza bersaglio del DNA di VIM può competere con questo controllo. PCC: AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi. Le strategie terapeutiche che includono agenti antimicrobici, come le combinazioni di inibitori beta-lattamici/beta-lattamasi con un'attività limitata o nulla contro i batteri produttori di metallo-beta-lattamasi, devono essere usate con cautela. I risultati del saggio Xpert Carba-R che mostrano la presenza di geni metallo-beta-lattamasi <i>bla</i>_{IMP}, <i>bla</i>_{VIM} e <i>bla</i>_{NDM} provenienti da colonie pure degli organismi dichiarati possono essere utili nel determinare una strategia terapeutica in pazienti con infezioni batteriche non suscettibili ai carbapenemi note o sospette.

Tabella 1. Risultati rappresentativi per il saggio Xpert Carba-R e interpretazione (continua)

Risultato	Interpretazione
<p>IMP NON RILEVATO (IMP NOT DETECTED); VIM RILEVATO (VIM DETECTED); NDM RILEVATO (NDM DETECTED); KPC NON RILEVATO (KPC NOT DETECTED); OXA48 NON RILEVATO (OXA48 NOT DETECTED)</p> <p>Vedere la Figura 7.</p>	<p>Le sequenze bersaglio del DNA di VIM e NDM sono state rilevate; le sequenze bersaglio del DNA di IMP, KPC e OXA-48 non sono state rilevate.</p> <ul style="list-style-type: none"> L'amplificazione mediante PCR delle sequenze bersaglio del DNA di VIM e NDM fornisce valori Ct entro gli intervalli di validità ed endpoint di fluorescenza al di sopra dei valori soglia impostati; le sequenze bersaglio del DNA di IMP, KPC e OXA-48 sono assenti o al di sotto del livello di rilevamento del saggio. SPC: Non applicabile. Il risultato relativo all'SPC viene ignorato perché le amplificazioni delle sequenze bersaglio del DNA di VIM e NDM possono competere con questo controllo. PCC: AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi. Le strategie terapeutiche che includono agenti antimicrobici, come le combinazioni di inibitori beta-lattamici/beta-lattamasi con un'attività limitata o nulla contro i batteri produttori di metallo-beta-lattamasi, devono essere usate con cautela. I risultati del saggio Xpert Carba-R che mostrano la presenza di geni metallo-beta-lattamasi <i>bla</i>_{IMP}, <i>bla</i>_{VIM} e <i>bla</i>_{NDM} provenienti da colonie pure degli organismi dichiarati possono essere utili nel determinare una strategia terapeutica in pazienti con infezioni batteriche non suscettibili ai carbapenemi note o sospette.
<p>IMP RILEVATO (IMP DETECTED); VIM NON RILEVATO (VIM NOT DETECTED); NDM RILEVATO (NDM DETECTED); KPC NON RILEVATO (KPC NOT DETECTED); OXA48 NON RILEVATO (OXA48 NOT DETECTED)</p> <p>Vedere la Figura 8.</p>	<p>Le sequenze bersaglio del DNA di IMP e NDM sono state rilevate; le sequenze bersaglio del DNA di VIM, KPC e OXA-48 non sono state rilevate.</p> <ul style="list-style-type: none"> L'amplificazione mediante PCR delle sequenze bersaglio del DNA di IMP e NDM fornisce valori Ct entro gli intervalli di validità ed endpoint di fluorescenza al di sopra dei valori soglia impostati; le sequenze bersaglio del DNA di VIM, KPC e OXA-48 sono assenti o al di sotto del livello di rilevamento del saggio. SPC: Non applicabile. Il risultato relativo all'SPC viene ignorato perché le amplificazioni delle sequenze bersaglio del DNA di IMP e NDM possono competere con questo controllo. PCC: AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi. Le strategie terapeutiche che includono agenti antimicrobici, come le combinazioni di inibitori beta-lattamici/beta-lattamasi con un'attività limitata o nulla contro i batteri produttori di metallo-beta-lattamasi, devono essere usate con cautela. I risultati del saggio Xpert Carba-R che mostrano la presenza di geni metallo-beta-lattamasi <i>bla</i>_{IMP}, <i>bla</i>_{VIM} e <i>bla</i>_{NDM} provenienti da colonie pure degli organismi dichiarati possono essere utili nel determinare una strategia terapeutica in pazienti con infezioni batteriche non suscettibili ai carbapenemi note o sospette.
<p>IMP RILEVATO (IMP DETECTED); VIM RILEVATO (VIM DETECTED); NDM NON RILEVATO (NDM NOT DETECTED); KPC NON RILEVATO (KPC NOT DETECTED); OXA48 RILEVATO (OXA48 DETECTED)</p> <p>Vedere la Figura 9.</p>	<p>Le sequenze bersaglio del DNA di IMP, VIM e OXA-48 sono state rilevate; le sequenze bersaglio del DNA di NDM e KPC non sono state rilevate.</p> <ul style="list-style-type: none"> L'amplificazione mediante PCR delle sequenze bersaglio del DNA di IMP, VIM e OXA-48 fornisce valori Ct entro gli intervalli di validità ed endpoint di fluorescenza al di sopra dei valori soglia impostati; le sequenze bersaglio del DNA di KPC e NDM sono assenti o al di sotto del livello di rilevamento del saggio. SPC: Non applicabile. Il risultato relativo all'SPC viene ignorato perché le amplificazioni delle sequenze bersaglio del DNA di IMP, VIM e OXA-48 possono competere con questo controllo. PCC: AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi. Le strategie terapeutiche che includono agenti antimicrobici, come le combinazioni di inibitori beta-lattamici/beta-lattamasi con un'attività limitata o nulla contro i batteri produttori di metallo-beta-lattamasi, devono essere usate con cautela. I risultati del saggio Xpert Carba-R che mostrano la presenza di geni metallo-beta-lattamasi <i>bla</i>_{IMP}, <i>bla</i>_{VIM} e <i>bla</i>_{NDM} provenienti da colonie pure degli organismi dichiarati possono essere utili nel determinare una strategia terapeutica in pazienti con infezioni batteriche non suscettibili ai carbapenemi note o sospette.

Tabella 1. Risultati rappresentativi per il saggio Xpert Carba-R e interpretazione (continua)

Risultato	Interpretazione
IMP RILEVATO (IMP DETECTED); VIM RILEVATO (VIM DETECTED); NDM RILEVATO (NDM DETECTED); KPC NON RILEVATO (KPC NOT DETECTED); OXA48 RILEVATO (OXA48 DETECTED) Vedere la Figura 10.	<p>Le sequenze bersaglio del DNA di IMP, VIM, NDM e OXA-48 sono state rilevate; la sequenza bersaglio del DNA di KPC non è stata rilevata.</p> <ul style="list-style-type: none"> L'amplificazione mediante PCR delle sequenze bersaglio del DNA di IMP, VIM, NDM e OXA-48 fornisce valori Ct entro gli intervalli di validità ed endpoint di fluorescenza al di sopra dei valori soglia impostati; la sequenza bersaglio del DNA di KPC è assente o al di sotto del livello di rilevamento del saggio. SPC: Non applicabile. Il risultato relativo all'SPC viene ignorato perché le amplificazioni delle sequenze bersaglio del DNA di IMP, VIM, NDM e OXA-48 possono competere con questo controllo. PCC: AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi. Le strategie terapeutiche che includono agenti antimicrobici, come le combinazioni di inibitori beta-lattamici/beta-lattamasi con un'attività limitata o nulla contro i batteri produttori di metallo-beta-lattamasi, devono essere usate con cautela. I risultati del saggio Xpert Carba-R che mostrano la presenza di geni metallo-beta-lattamasi <i>bla</i>_{IMP}, <i>bla</i>_{VIM} e <i>bla</i>_{NDM} provenienti da colonie pure degli organismi dichiarati possono essere utili nel determinare una strategia terapeutica in pazienti con infezioni batteriche non suscettibili ai carbapenemi note o sospette.
IMP RILEVATO (IMP DETECTED); VIM RILEVATO (VIM DETECTED); NDM RILEVATO (NDM DETECTED); KPC RILEVATO (KPC DETECTED); OXA48 RILEVATO (OXA48 DETECTED) Vedere la Figura 11.	<p>Le sequenze bersaglio del DNA di IMP, VIM, NDM, KPC e OXA-48 sono state rilevate.</p> <ul style="list-style-type: none"> L'amplificazione mediante PCR delle sequenze bersaglio del DNA di IMP, VIM, NDM, KPC e OXA-48 fornisce valori Ct entro gli intervalli di validità ed endpoint di fluorescenza al di sopra dei valori soglia impostati. SPC: Non applicabile. Il risultato relativo all'SPC viene ignorato perché le amplificazioni delle sequenze bersaglio del DNA di IMP, VIM, NDM, KPC e OXA-48 possono competere con questo controllo. PCC: AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi. Le strategie terapeutiche che includono agenti antimicrobici, come le combinazioni di inibitori beta-lattamici/beta-lattamasi con un'attività limitata o nulla contro i batteri produttori di metallo-beta-lattamasi, devono essere usate con cautela. I risultati del saggio Xpert Carba-R che mostrano la presenza di geni metallo-beta-lattamasi <i>bla</i>_{IMP}, <i>bla</i>_{VIM} e <i>bla</i>_{NDM} provenienti da colonie pure degli organismi dichiarati possono essere utili nel determinare una strategia terapeutica in pazienti con infezioni batteriche non suscettibili ai carbapenemi note o sospette.
IMP NON RILEVATO (IMP NOT DETECTED); VIM NON RILEVATO (VIM NOT DETECTED); NDM NON RILEVATO (NDM NOT DETECTED); KPC NON RILEVATO (KPC NOT DETECTED); OXA48 NON RILEVATO (OXA48 NOT DETECTED) Vedere la Figura 12.	<p>Le sequenze bersaglio del DNA di IMP, VIM, NDM, KPC e OXA-48 non sono state rilevate.</p> <ul style="list-style-type: none"> Le sequenze bersaglio del DNA di IMP, VIM, NDM, KPC e OXA-48 sono assenti o al di sotto del livello di rilevamento del saggio. SPC: AMMESSO (PASS); L'amplificazione mediante PCR della sequenza bersaglio del DNA dell'SPC fornisce un valore Ct entro l'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra del valore soglia impostato. PCC: AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
NON VALIDO (INVALID) Vedere la Figura 13.	<p>La presenza o l'assenza delle sequenze bersaglio del DNA di IMP, VIM, NDM, KPC e OXA-48 non può essere determinata. Usare le istruzioni riportate nella Sezione 14, Procedura di ripetizione del test per ripetere il test.</p> <ul style="list-style-type: none"> SPC: NON RIUSCITO (FAIL); Non è stata amplificata nessuna sequenza del DNA dell'SPC, oppure il valore Ct dell'SPC non rientra nell'intervallo di validità e l'endpoint di fluorescenza è al di sotto del valore soglia impostato. PCC: AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.

Tabella 1. Risultati rappresentativi per il saggio Xpert Carba-R e interpretazione (continua)

Risultato	Interpretazione
ERRORE (ERROR)	<p>La presenza o l'assenza delle sequenze bersaglio del DNA di IMP, VIM, NDM, KPC e OXA-48 non può essere determinata. Usare le istruzioni riportate nella Sezione 14, Procedura di ripetizione del test per ripetere il test.</p> <ul style="list-style-type: none"> • SPC: NESSUN RISULTATO (NO RESULT) • PCC: NON RIUSCITO (FAIL)*. Uno o più risultati della verifica della sonda non sono validi. Il PCC probabilmente non è riuscito perché la provetta di reazione non è stata riempita correttamente o è stato rilevato un problema di integrità della sonda. <p>* Se la verifica della sonda ha avuto esito positivo, l'errore è dovuto a un guasto di un componente del sistema.</p>
NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	<p>La presenza o l'assenza delle sequenze bersaglio del DNA di IMP, VIM, NDM, KPC e OXA-48 non può essere determinata. Usare le istruzioni riportate nella Sezione 14, Procedura di ripetizione del test per ripetere il test. La quantità di dati raccolta non è sufficiente per generare i risultati del test (l'operatore, per esempio, ha interrotto un'analisi mentre era in corso oppure si è verificata un'interruzione di corrente).</p> <ul style="list-style-type: none"> • SPC: NESSUN RISULTATO (NO RESULT) • PCC: Non applicabile

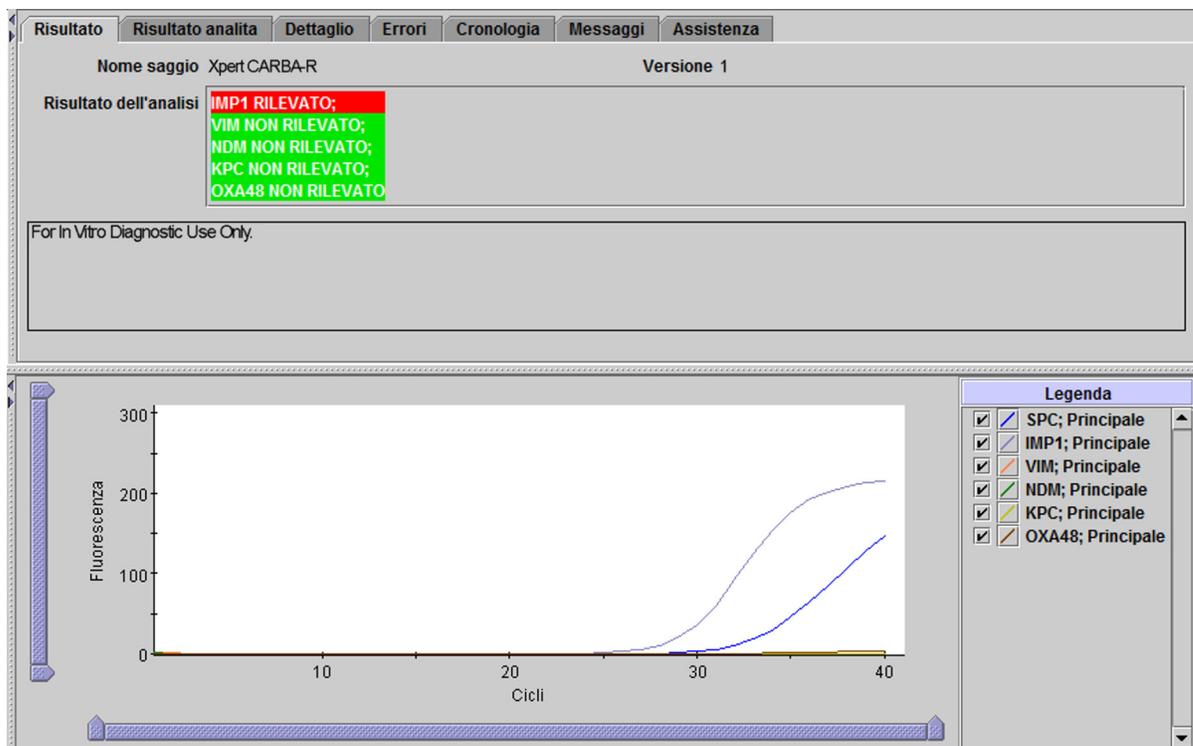


Figura 5. Saggio Carba-R – IMP rilevato

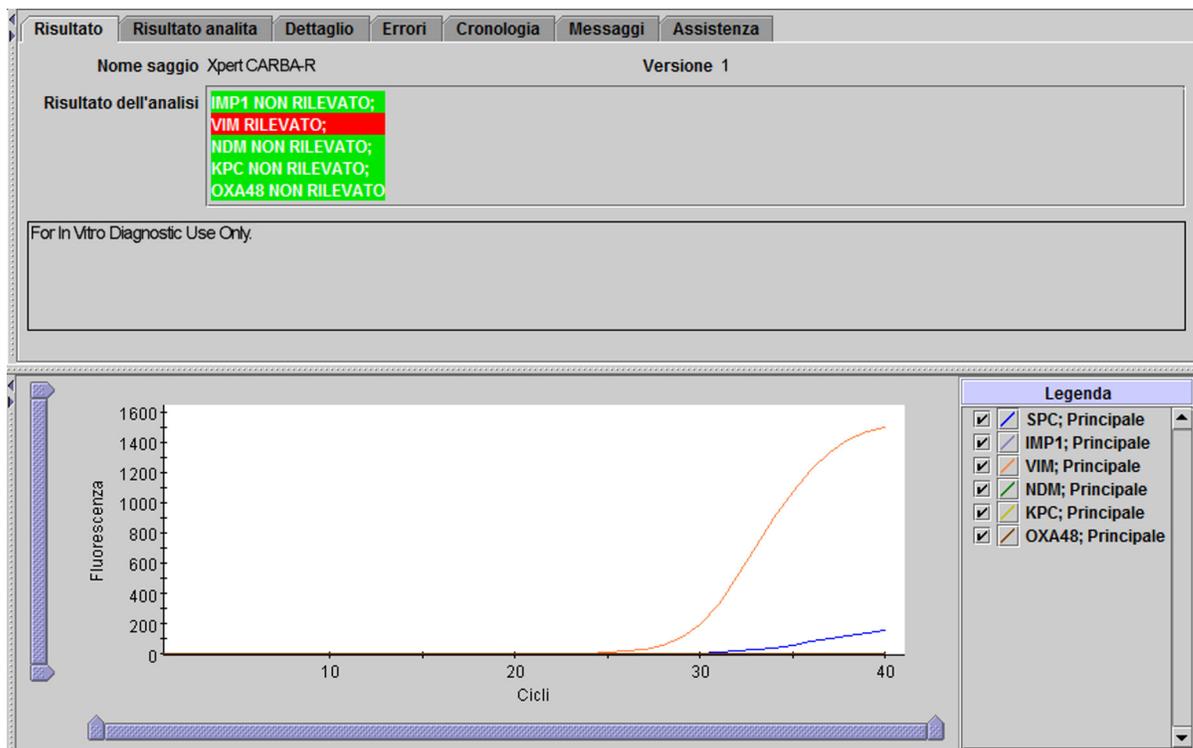


Figura 6. Saggio Carba-R – VIM rilevato

Nota Gli esempi relativi ai campioni NDM positivi, KPC positivi e OXA positivi non sono riportati.

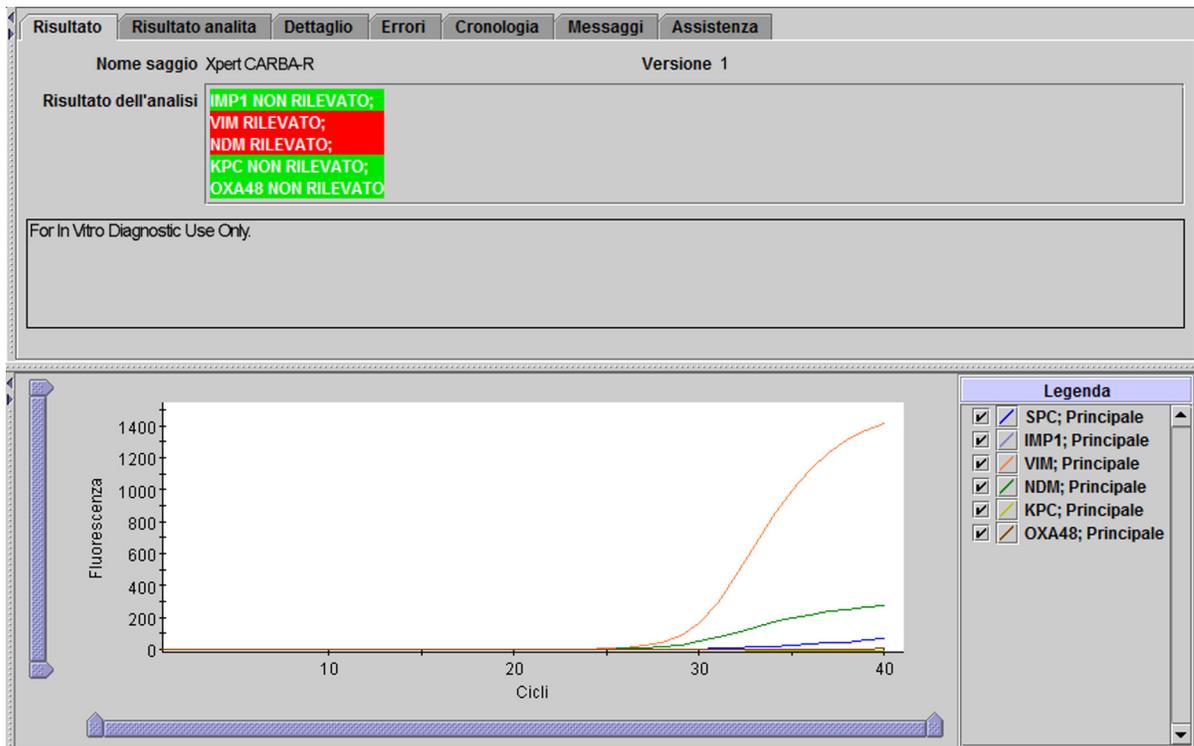


Figura 7. Saggio Carba-R – VIM e NDM rilevati

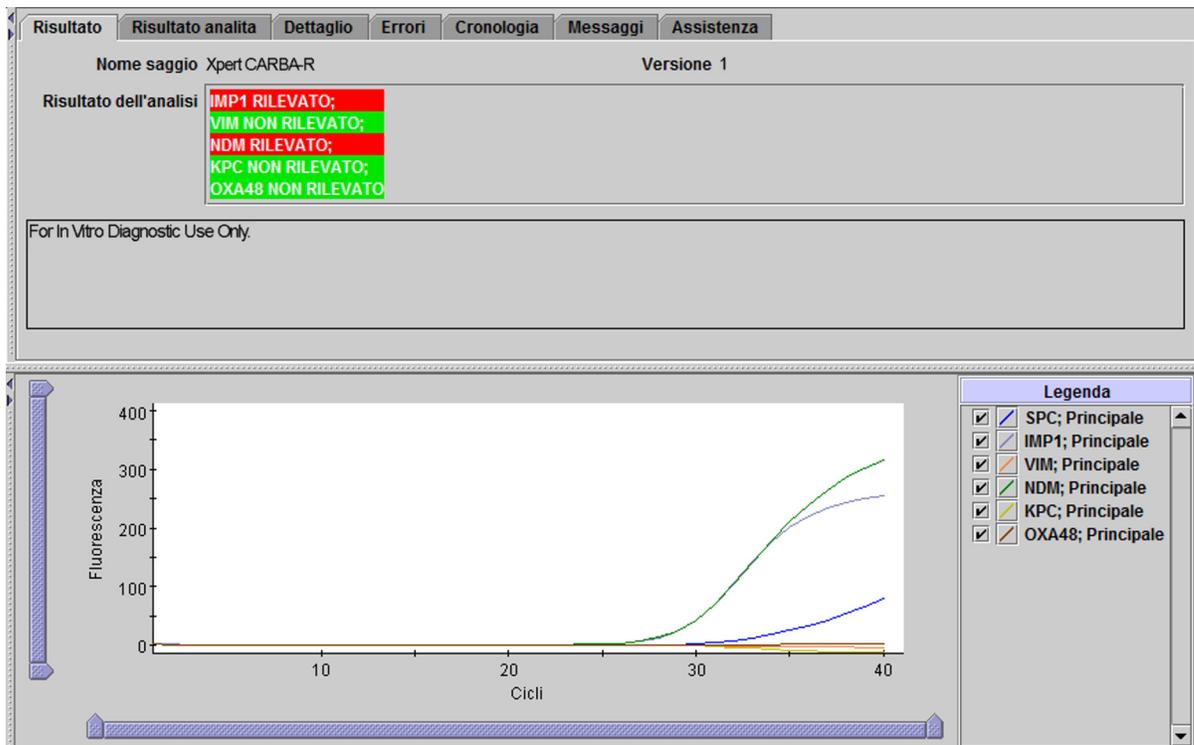


Figura 8. Saggio Carba-R – IMP e NDM rilevati

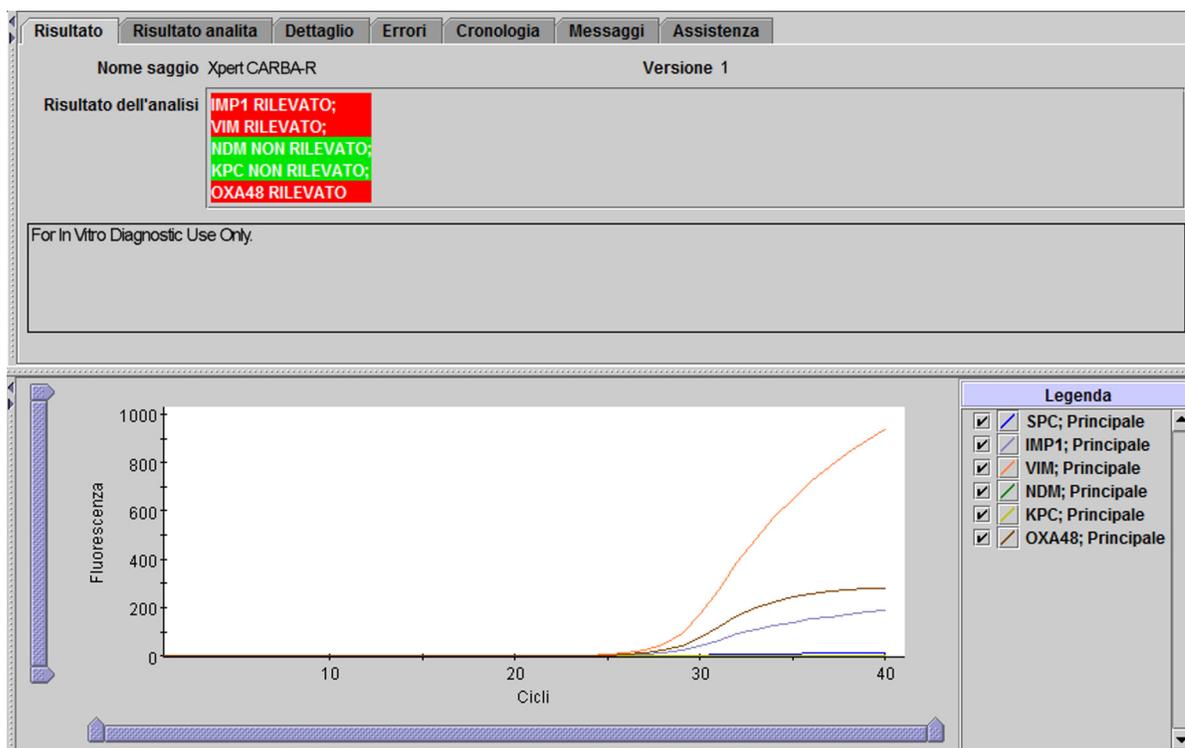


Figura 9. Saggio Carba-R – IMP, VIM, e OXA-48 rilevati

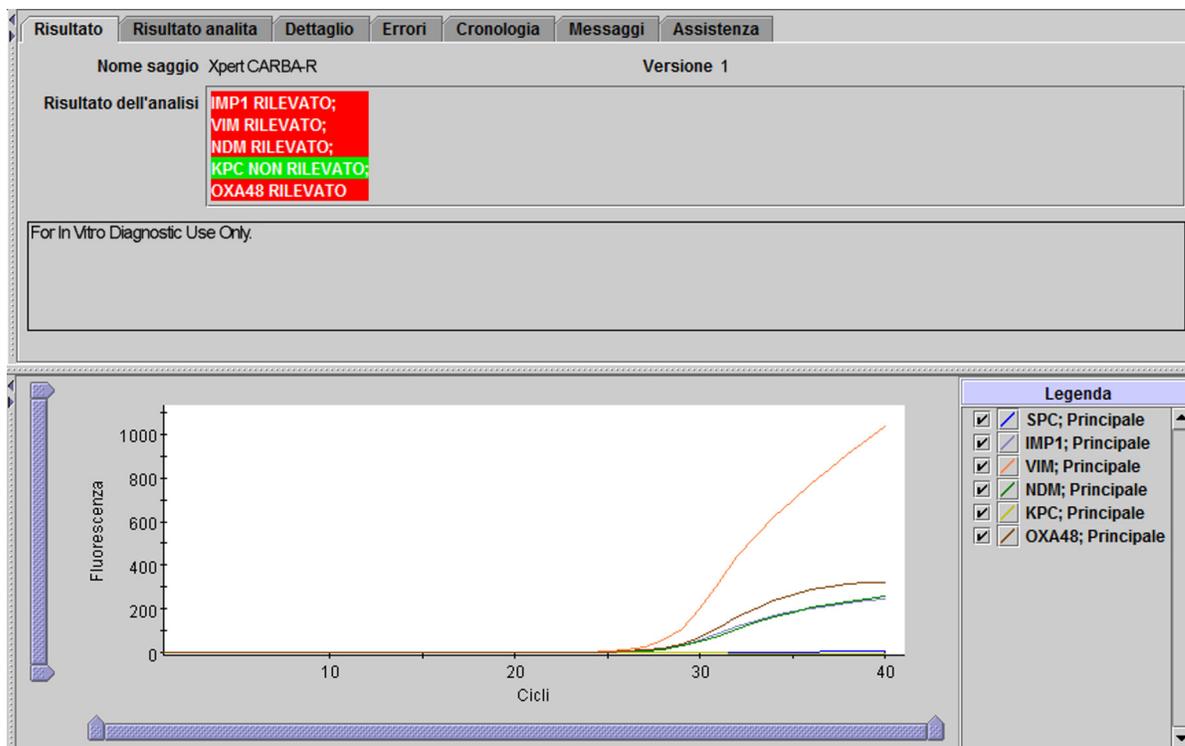


Figura 10. Saggio Carba-R – IMP, VIM, NDM e OXA-48 rilevati

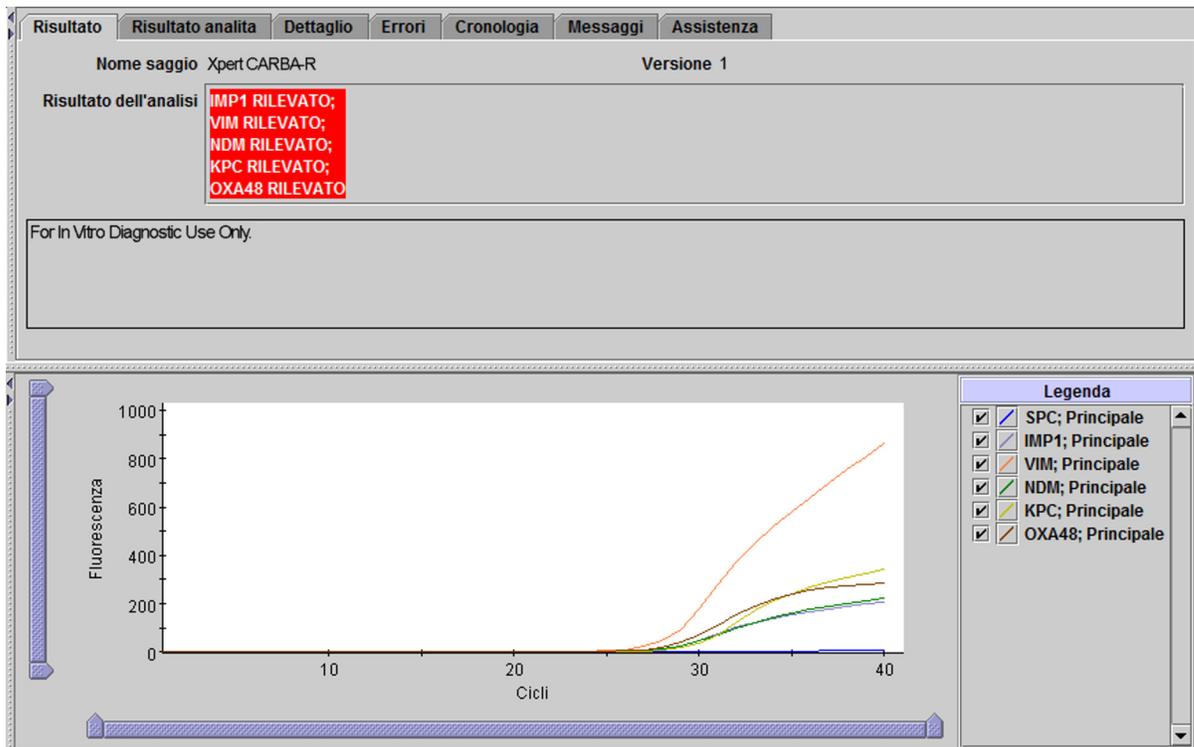


Figura 11. Saggio Carba-R – IMP, VIM, NDM, KPC e OXA-48 rilevati

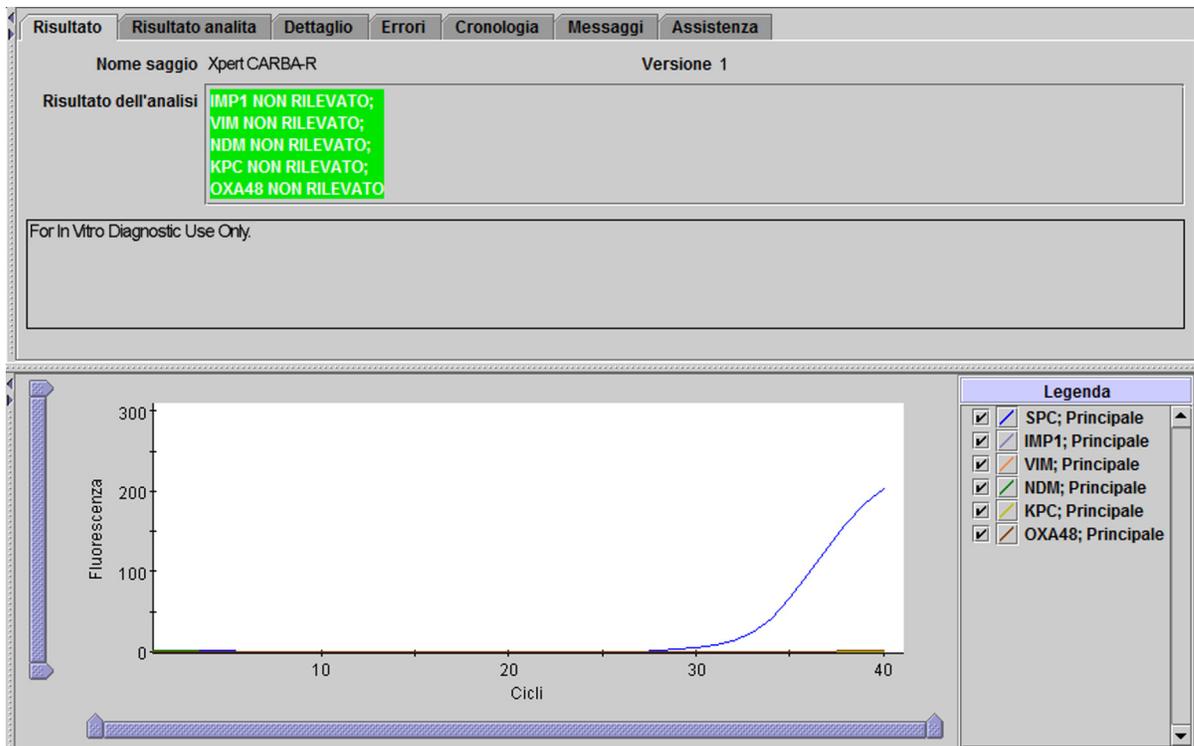


Figura 12. Saggio Carba-R – IMP, VIM, NDM, KPC e OXA-48 non rilevati

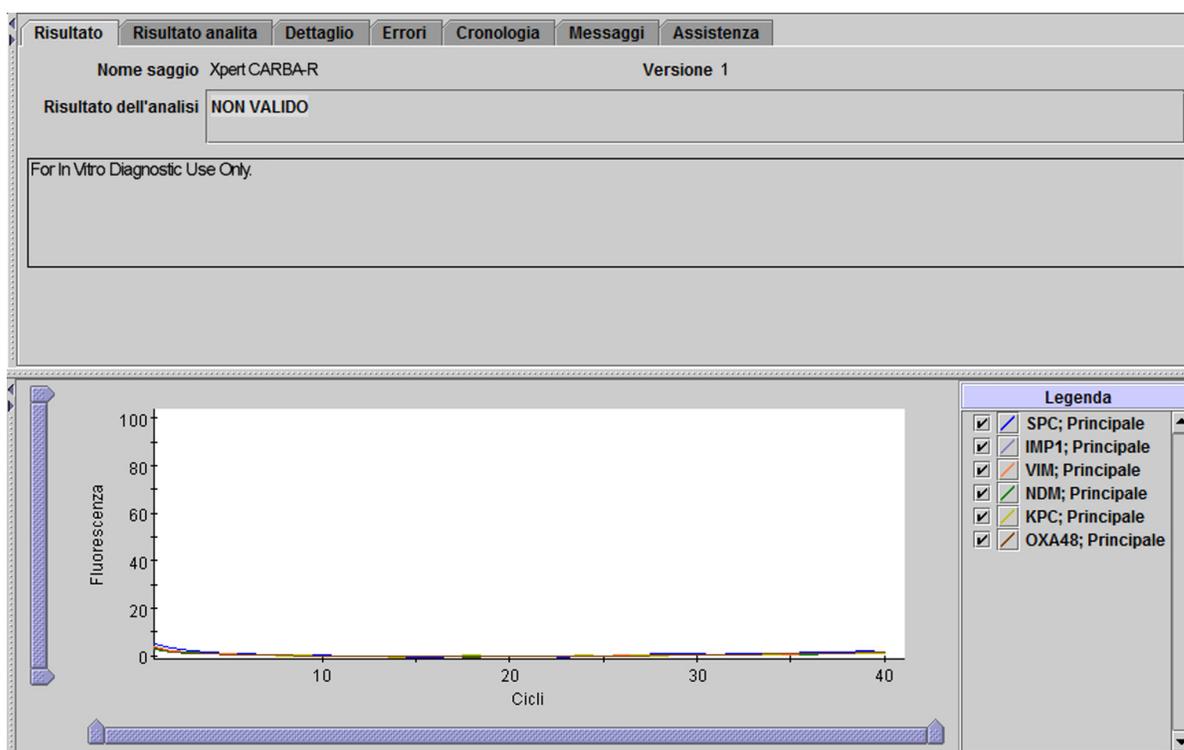


Figura 13. Saggio Carba-R – Non valido

13 Motivi per ripetere il test

Ripetere il test con una nuova cartuccia (non riutilizzare la cartuccia) e un nuovo flaconcino di reagente per il campione. Per ripetere il test, vedere Sezione 14, Procedura di ripetizione del test.

- Un risultato **NON VALIDO (INVALID)** indica che il controllo SPC non è valido. Il campione non è stato trattato correttamente o la PCR è stata inibita, oppure il volume del campione aggiunto era insufficiente.
- Il risultato **ERRORE (ERROR)** indica che il controllo per la verifica della sonda non ha avuto esito positivo e il saggio è stato interrotto, probabilmente a causa del riempimento inadeguato della provetta di reazione, dell'individuazione di un problema a livello di integrità della sonda del reagente, del superamento dei limiti massimi di pressione o dell'individuazione di un errore di posizionamento della valvola.
- **NESSUN RISULTATO (NO RESULT)** indica che i dati raccolti sono insufficienti. Per esempio, l'operatore ha interrotto un'analisi mentre era in corso oppure si è verificata un'interruzione di corrente.
- Se un controllo esterno non sortisce l'esito desiderato, ripetere il test di controllo esterno e/o contattare Assistenza Tecnica di Cepheid per ricevere assistenza.

14 Procedura di ripetizione del test

14.1 Procedura di ripetizione del test del tampone rettale e perirettale

1. Estrarre dal kit una nuova cartuccia, un nuovo flaconcino di reagente per il campione e una nuova pipetta di trasferimento.
2. Rimuovere il tampone rimasto dal contenitore di trasporto.
3. Inserire il tampone in un nuovo flaconcino del reagente per il campione. Tenere il tampone vicino al bordo del flaconcino reggendolo dall'asta, sollevare il tampone di qualche millimetro dal fondo del flaconcino e piegare l'asta sul bordo del flaconcino per spezzarla all'altezza della tacca, affinché il tampone risulti sufficientemente corto da entrare all'interno del flaconcino; in questo modo sarà possibile chiudere bene il tappo.
4. Chiudere saldamente il tappo del nuovo flaconcino di reagente per il campione e miscelare su vortex ad alta velocità per 10 secondi.

5. Aprire il coperchio della cartuccia. Utilizzando la pipetta di trasferimento in dotazione, aspirare il reagente per il campione fino al segno indicato sulla pipetta, quindi trasferire il materiale all'interno della camera della cartuccia del saggio Xpert Carba-R riservata al campione.
6. Chiudere il coperchio della cartuccia e introdurre la cartuccia nello strumento GeneXpert entro 30 minuti. Seguire Sezione 10.2, Avvio del test.

14.2 Procedura di ripetizione del test del campione di isolato batterico

1. Estrarre dal kit una nuova cartuccia, un nuovo flaconcino di reagente per il campione e una nuova pipetta di trasferimento.
2. Trasferire nel nuovo flaconcino di reagente per il campione l'intero contenuto del campione rimasto nel flaconcino del reagente per il campione.
3. Chiudere saldamente il tappo del nuovo flaconcino di reagente per il campione e miscelare su vortex ad alta velocità per 10 secondi.
4. Aprire il coperchio della cartuccia. Utilizzando la pipetta di trasferimento in dotazione, aspirare il reagente per il campione fino al segno indicato sulla pipetta, quindi trasferire il materiale all'interno della camera della cartuccia del saggio Xpert Carba-R riservata al campione.
5. Chiudere il coperchio della cartuccia e introdurre la cartuccia nello strumento GeneXpert entro 30 minuti. Seguire Sezione 10.2, Avvio del test.

Nota Per gli isolati batterici, non ripetere il test più di una volta perché le diluizioni ripetute possono generare risultati falsi negativi.

15 Limitazioni

15.1 Limitazioni generali

- Il saggio Xpert Carba-R rileva i geni *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{IMP} dai campioni di analisi di tamponi rettali e perirettali e le colonie pure, e non è destinato all'identificazione batterica. Il rilevamento di queste sequenze di geni non indica la presenza di organismi vitali.
- Il saggio Xpert Carba-R non è uno strumento di sottotipizzazione e pertanto non riporta le varianti dei geni *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} o *bla*_{OXA-48}.
- Alcune specie batteriche, come la *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* hanno dimostrato una resistenza ai carbapenemi dovuta a meccanismi di resistenza intrinseca.
- Nello studio non è stato valutato il rilevamento di altri geni OXA-carbapenemasi, oltre ai geni *bla*_{OXA-48} e *bla*_{OXA-181}.
- Le analisi *in silico* utilizzate per prevedere le varianti rilevate dal saggio sono basate su un confronto tra sequenze di geni bersaglio disponibili in GenBank e la sequenza degli oligonucleotidi e ampliconi primer/sonda del saggio Xpert Carba-R per ciascun gene bersaglio. Nel 2014-2015 sono state eseguite ricerche BLAST per analisi *in silico*. L'analisi *in silico* delle nuove sequenze di geni varianti depositate nel database dopo il 2015 per i cinque geni bersaglio non è stata eseguita.
- Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni che si legano alle sonde o ai primer possono influenzare il rilevamento delle varianti correnti, nuove o sconosciute delle sequenze *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{IMP} e di conseguenza determinare un risultato falso negativo.
- Il saggio Xpert Carba-R genererà un risultato IMP negativo quando si testano campioni contenenti sequenze di geni IMP-7, IMP-13 o IMP-14.
- Le prestazioni del saggio Xpert Carba-R con i geni delle carbapenemasi non bersaglio, diversi dai geni *bla*_{SPM}, *bla*_{SME} e *bla*_{IMI} non sono note.
- Poiché il rilevamento delle sequenze geniche *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{IMP} dipende dal numero di organismi presenti all'interno del campione, l'affidabilità dei risultati dipende dall'adeguatezza della manipolazione e della conservazione dei campioni di analisi.
- L'analisi con il saggio Xpert Carba-R deve essere utilizzata in aggiunta agli altri metodi disponibili.
- Talvolta il risultato del saggio Xpert Carba-R può essere **NON VALIDO (INVALID)** a causa del mancato superamento del controllo SPC, oppure **ERRORE (ERROR)** o **NESSUN RISULTATO (NO RESULT)** e richiedere la ripetizione del test con conseguenti ritardi nell'ottenimento dei risultati finali.

15.2 Limitazioni dei campioni di analisi rettali e perirettali

- Le prestazioni del saggio Xpert Carba-R non sono state valutate con campioni di analisi di tamponi rettali o perirettali provenienti da pazienti pediatrici.
- Studi analitici che utilizzano combinazioni di due popolazioni batteriche su campioni di analisi di tamponi creati appositamente indicano che quando una specie batterica produttrice di carbapenemasi viene inoculata in prossimità del LoD e un'altra specie batterica che produce carbapenemasi è presente a concentrazioni uguali o maggiori a 5×10^6 CFU/tampone, il bersaglio a bassa concentrazione può non essere rilevato. Con il saggio Xpert Carba-R è stata riportata la co-colonizzazione con due o più organismi produttori di carbapenemasi, ma è un evento raro. La mancata individuazione di un secondo bersaglio dovrebbe avere un impatto minimo sulla gestione del paziente in quanto per i pazienti che mostrano un risultato positivo a un organismo produttore di carbapenemasi verrebbero in ogni caso adottate procedure di isolamento.
- Interferenza con il saggio Xpert Carba-R può essere osservata con solfato di bario a $> 0,1\%$ p/v e Pepto-Bismol a $> 0,01\%$ p/v nei test con campioni della matrice di tamponi rettali.
- Interferenza con il saggio Xpert Carba-R può essere osservata con solfato di bario a $> 0,1\%$ p/v e Pepto-Bismol a $> 0,025\%$ p/v in test con campioni di matrici di tamponi perirettali.
- In tamponi rettali contenenti le sequenze bersaglio VIM, si può verificare interferenza se il grasso fecale è presente ad una concentrazione dello $0,25\%$ p/v, con conseguenti valori del ciclo soglia ritardati.
- Oltre ai gruppi *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* testati nello studio creato appositamente, sono state valutate anche altre non *Enterobacteriaceae*: *Pseudomonas stutzeri* (1), *Pseudomonas oryzae* (1), *Pseudomonas putida* (2) e *Empedobacter brevis* (1). Non sono state valutate e sono, pertanto, sconosciute le prestazioni del saggio Xpert Carba-R con altre non *Enterobacteriaceae* oltre a queste sei specie.
- Per i campioni di analisi di tamponi rettali, il saggio Xpert Carba-R ha mostrato una concordanza percentuale positiva ridotta (PPA del $55,6\%$) per il rilevamento della sequenza genica *bla*_{VIM} nella *Pseudomonas aeruginosa*. Sono stati osservati quattro (4) risultati falsi negativi con il saggio in campioni in cui la *Pseudomonas aeruginosa* contenente la sequenza genica *bla*_{VIM} è stata ottenuta con il metodo di riferimento.
- Per i campioni di analisi di tamponi rettali, il saggio Xpert Carba-R ha mostrato una concordanza percentuale positiva ridotta (PPA dell' $85,7\%$) per il rilevamento della sequenza genica *bla*_{IMP} in *Acinetobacter baumannii* durante lo studio appositamente creato. È stata osservata, inoltre, una bassa concordanza percentuale totale ($86,1\%$) tra i centri di studio sulla riproducibilità con campioni contenenti basse concentrazioni di organismi che ospitano la sequenza genica *bla*_{IMP}.
- Gli anaerobi resistenti ai carbapenemi potenzialmente presenti nei campioni di analisi fecali non sono stati valutati con il saggio Xpert Carba-R.
- Il rilevamento di *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e/o *bla*_{IMP} da campioni di analisi di tamponi rettali e perirettali può derivare da organismi diversi da *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*.
- Le prestazioni del saggio Xpert Carba-R con isolati sensibili contenenti le sequenze geniche *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e/o *bla*_{IMP} non sono state completamente valutate.

15.3 Limitazioni delle colonie pure

- Per quanto riguarda le colonie pure, le prestazioni del saggio Xpert Carba-R con batteri diversi da *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii* non sono state valutate. Prima del test con il saggio Xpert Carba-R, devono essere identificati gli organismi e deve essere determinato lo stato di non suscettibilità ai carbapenemi.
- Si possono ottenere risultati del test erronei come conseguenza di tecniche di coltura inadeguate, della mancata osservanza delle procedure consigliate per la preparazione della sospensione 0,5 McFarland, la manipolazione e la conservazione dei campioni, di errori tecnici, di commistione dei campioni o a causa di una presenza di organismi nel campione di analisi troppo esigua per essere rilevata dal test. La rigorosa osservanza delle istruzioni del presente foglietto illustrativo è necessaria per evitare risultati erronei.

16 Valori attesi

Nello studio clinico del saggio Xpert Carba-R sono stati valutati un totale di 2543 campioni, costituiti da campioni di analisi di tamponi rettali e perirettali e campioni creati appositamente, in 8 centri di studio all'interno e all'esterno degli Stati Uniti. I risultati del test del saggio Xpert Carba-R in confronto alla coltura e all'analisi di sequenziamento bidirezionale del DNA del gene bersaglio per ciascuno dei potenziali campioni combinati e creati appositamente sono presentati in Tabella 2.

In un separato studio clinico del saggio Xpert Carba-R, un totale di 467 isolati batterici sono stati valutati in 4 centri di studio all'interno e al di fuori degli Stati Uniti. Il confronto tra i risultati del saggio Xpert Carba-R e l'analisi di sequenziamento bidirezionale del DNA del gene bersaglio per ciascuno dei due tipi di agar è presentato in Tabella 8, Tabella 9, Tabella 10, Tabella 11, e Tabella 12.

17 Caratteristiche prestazionali

17.1 Prestazioni cliniche – Campioni di analisi di tamponi rettali e perirettali

Le caratteristiche prestazionali del saggio Xpert Carba-R con campioni di analisi di tamponi rettali e perirettali sono state determinate in uno studio di ricerca multicentrico. La concordanza percentuale positiva (PPA) e la concordanza percentuale negativa (NPA) del saggio Xpert Carba-R sono state valutate rispetto a un metodo di coltura di riferimento (brodo di arricchimento MacConkey) e all'analisi di sequenziamento del DNA PCR/bi-direzionale.

Otto centri con ubicazione geografica differente (sei negli Stati Uniti e due in Europa) hanno raccolto in modo prospettico campioni di analisi di tamponi rettali o perirettali accoppiati da soggetti che erano ricoverati o erano in una struttura di assistenza a lungo termine. I campioni di analisi di tamponi rettali e perirettali eccessivamente carichi, secondo le indicazioni della Sezione 9 (Preparazione e conservazione dei campioni) sono stati esclusi dallo studio. A causa della bassa prevalenza di ciascuno dei geni bersaglio di Xpert Carba-R in assenza di un focolaio epidemico, nello studio sono stati inclusi anche campioni creati appositamente.

Un tampone della coppia è stato utilizzato per il test del saggio Xpert Carba-R. Il secondo tampone è stato inoculato nel brodo di arricchimento MacConkey e utilizzato per il test del metodo di riferimento. Un laboratorio di coltura di riferimento ha determinato la presenza di organismi non suscettibili ai carbapenemi coltivando il brodo di arricchimento MacConkey di ciascuno dei campioni di analisi. Inizialmente, il brodo di arricchimento MacConkey è stato sottoposto a screening per la presenza di organismi non suscettibili ai carbapenemi tramite il piastramento del brodo su piastre di agar MacConkey con un dischetto di meropenem. Per i campioni di analisi che mostravano una crescita di batteri Gram-negativi attorno al dischetto di meropenem, la conferma della non suscettibilità ai carbapenemi è stata determinata su colonie isolate utilizzando il metodo di diffusione su disco (secondo il documento CLSI M02) e il documento CLSI M100.²⁰ Il DNA estratto dagli isolati non sensibili ai carbapenemi è stato purificato, quantificato e amplificato utilizzando primer specifici per tutti e cinque i geni bersaglio; le regioni amplificate includevano più basi rispetto alle regioni amplificate dal saggio Xpert Carba-R. La produzione del prodotto di amplificazione di dimensioni appropriate è stata confermata sul Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Se le bande mostrate sul Bioanalyzer corrispondevano alle dimensioni attese dell'amplicone di uno qualsiasi dei cinque geni bersaglio rilevati dal saggio Xpert Carba-R, l'amplicone per l'isolato è stato inviato a un laboratorio indipendente per l'analisi di sequenziamento bidirezionale di riferimento, che è stato convalidato per il rilevamento dei cinque bersagli nel saggio Xpert Carba-R. Se sul Bioanalyzer non sono state mostrate bande per nessuno dei cinque geni bersaglio, l'isolato non è stato inviato per l'analisi della sequenza e il risultato del metodo di riferimento è stato considerato negativo per i cinque geni bersaglio.

Risultati dei campioni di analisi prospettici ottenuti con il saggio Xpert Carba-R in confronto al metodo di riferimento

Inizialmente, un totale di 802 campioni di analisi di tamponi rettali prospettici sono stati inclusi in questo studio clinico, di cui 785 erano idonei all'inclusione. Dei 785 campioni di analisi idonei, 755 campioni di analisi sono stati inclusi nel set di dati finale dopo le esclusioni basate sulle deviazioni dal protocollo (compresi 16 organismi di *Stenotrophomonas maltophilia* che sono stati esclusi a causa della loro intrinseca resistenza ai carbapenemi testati).

Inizialmente, un totale di 963 campioni di analisi di tamponi perirettali prospettici sono stati inclusi in questo studio clinico, di cui 947 erano idonei all'inclusione. Dei 947 campioni di analisi idonei, 924 campioni di analisi sono stati inclusi nel set di dati finale dopo le esclusioni basate sulle deviazioni dal protocollo (compresi 10 organismi di *Stenotrophomonas maltophilia* uno di *Pseudomonas putida* e uno di *Pseudomonas stutzeri* che sono stati esclusi a causa dei criteri di progettazione dello studio).

Quando testato con campioni di analisi di tamponi rettali prospettici, il saggio Xpert Carba-R ha dimostrato un intervallo di PPA dal 60,0% al 100% per i quattro bersagli del saggio (bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , e bla_{OXA-48}) rispetto al metodo di riferimento (Tabella 2). La concordanza percentuale negativa (NPA) per le sequenze di geni bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{OXA-48} , e bla_{IMP} variava dal 98,6% al 99,9% rispetto al metodo di riferimento (Tabella 2).

Quando testato con campioni di analisi di tamponi perirettali prospettici, il saggio Xpert Carba-R ha dimostrato un PPA del 100% per i tre bersagli del saggio (bla_{NDM} , bla_{KPC} e bla_{OXA-48}) rispetto al metodo di riferimento. La concordanza percentuale negativa (NPA) per le sequenze di geni bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{OXA-48} , e bla_{IMP} variava dal 99,6% al 100% rispetto al metodo di riferimento (Tabella 2).

Con i campioni di analisi di tamponi rettali e perirettali prospettici combinati, il saggio Xpert Carba-R ha dimostrato un intervallo di PPA dal 60,0% al 100% per i quattro bersagli del saggio (bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , e bla_{OXA-48}) rispetto al metodo di riferimento (Tabella 2). La concordanza percentuale negativa (NPA) bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{OXA-48} , e bla_{IMP} variava dal 99,3% al 99,9% rispetto al metodo di riferimento (Tabella 2).

Per campioni con risultati discordanti (il saggio Xpert Carba-R era positivo per un gene bersaglio ma un organismo non suscettibile ai carbapenemi non era isolato dalla coltura di riferimento), l'analisi discordante è stata eseguita utilizzando il sequenziamento bidirezionale sul DNA estratto direttamente dal brodo di arricchimento MacConkey. I risultati dei test discrepanti sono indicati a piè di pagina Tabella 2.

Tabella 2. Confronto delle prestazioni del saggio Xpert Carba-R e la coltura di riferimento + sequenziamento – campioni di analisi prospettici

Tipo di campione di analisi	Bersaglio	N	TP	FP	TN	FN	PPA (IC al 95%)	NPA (IC al 95%)
Rettale ^a	IMP	755	0	1 ^b	754	0	N/A	99,9% (99,3-100)
	VIM	755	6	8 ^c	737	4	60,0% (31,3-83,2)	98,9% (97,9-99,5)
	NDM	755	7	3 ^d	745	0	100% (64,6-100)	99,6% (98,8-99,9)
	KPC	755	29	6 ^{e,f}	720	0	100% (88,3-100)	99,2% (98,2-99,6)
	OXA-48	755	29	10 ^g	715	1	96,7% (83,3-99,4)	98,6% (97,5-99,2)
Perirettale ^h	IMP	924	0	0	924	0	N/A	100% (99,6-100)
	VIM	924	0	0	924	0	N/A	100% (99,6-100)
	NDM	924	1	0	923	0	100% (20,7-100)	100% (99,6-100)
	KPC	924	2	4 ⁱ	918	0	100% (34,2-100)	99,6% (98,9-99,8)
	OXA-48	924	1	1 ^j	922	0	100% (20,7-100)	99,9% (99,4-100)
Combinato ^{a,h}	IMP	1679	0	1 ^b	1678	0	N/A	99,9% (99,7-100)
	VIM	1679	6	8 ^c	1661	4	60,0% (31,3-83,2)	99,5% (99,1-99,8)
	NDM	1679	8	3 ^d	1668	0	100% (67,6-100)	99,8% (99,5-99,9)
	KPC	1679	31	10 ^k	1638	0	100% (89,0-100)	99,4% (98,9-99,7)
	OXA-48	1679	30	11 ^l	1637	1	96,8% (83,8-99,4)	99,3% (98,8-99,6)

N = numero, TP = vero positivo, FP = falso positivo, TN = vero negativo, FN = falso negativo.

- Dei 755 campioni di analisi di tamponi rettali prospettici valutati nello studio, 636 campioni di analisi non hanno prodotto un isolato di coltura. Dai rimanenti 119 campioni di analisi, 112 organismi non suscettibili ai carbapenemi sono stati recuperati dalla coltura di riferimento oltre a 7 organismi suscettibili ai carbapenemi [*Pseudomonas aeruginosa* (5); *Escherichia coli* (1), e *Enterobacter cloacae* (1)].
- Risultati del sequenziamento: 1 su 1 è risultato negativo all'IMP.
- Risultati del sequenziamento: 2 su 8 sono risultati positivi al VIM; 6 di 8 sono risultati negativi al VIM.
- Risultati del sequenziamento: 1 su 3 è risultato positivo all'NDM; 2 su 3 sono risultati negativi all'NDM.
- Risultati del sequenziamento: 1 su 6 è risultato positivo al KPC; 5 su 6 sono risultati negativi al KPC.
- Il centro ha riferito che il soggetto stava assumendo l'ertapenem durante il periodo di raccolta del campione di analisi.
- Risultati del sequenziamento: 3 su 10 sono risultati positivi all'OXA-48; 7 su 10 sono risultati negativi all' OXA-48.

- h. Dei 924 campioni di analisi di tamponi perirettali prospettici valutati nello studio, 891 campioni di analisi non hanno prodotto un isolato di coltura. Dei rimanenti 33 campioni di analisi, 31 organismi non suscettibili ai carbapenemi sono stati recuperati dalla coltura di riferimento in aggiunta a due organismi suscettibili ai carbapenemi (*Pseudomonas aeruginosa*).
- i. Risultati del sequenziamento: 4 su 4 sono risultati negativi al KPC.
- j. Risultati del sequenziamento: 1 su 1 è risultato negativo all'OXA-48.
- k. Risultati del sequenziamento: 1 su 10 è risultato positivo al KPC; 9 su 10 sono risultati negativi al KPC.
- l. Risultati del sequenziamento: 3 su 11 sono risultati positivi all'OXA-48; 8 su 11 sono risultati negativi all'OXA-48.

Le prestazioni del saggio Xpert Carba-R sui campioni prospettici rettali e perirettali combinati sono mostrate in Tabella 3 per specie. Sono inclusi solo gli organismi per i quali è stato raccolto almeno un campione di analisi positivo nella Tabella 3.

Tabella 3. Confronto delle prestazioni di Xpert Carba-R e della coltura di riferimento + sequenziamento per tipo di organismo – campioni di analisi rettali e perirettali prospettici

Specie ^a	Bersaglio	N	TP	FP	TN	FN	PPA (IC al 95%)	NPA (IC al 95%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	IMP	1	0	0	1	0	N/A	100% (20,7-100)
	VIM	1	0	0	1	0	N/A	100% (20,7-100)
	NDM	1	0	0	1	0	N/A	100% (20,7-100)
	KPC	1	1	0	0	0	100% (20,7-100)	N/A
	OXA-48	1	0	0	1	0	N/A	100% (20,7-100)
<i>Enterobacter cloacae</i>	IMP	4	0	0	4	0	N/A	100% (51,0-100)
	VIM	4	1	0	3	0	100% (20,7-100)	100% (43,9-100)
	NDM	4	0	0	4	0	N/A	100% (51,0-100)
	KPC	4	0	0	4	0	N/A	100% (51,0-100)
	OXA-48	4	1	0	3	0	100% (20,7-100)	100% (43,9-100)
<i>E. coli</i>	IMP	10	0	0	10	0	N/A	100% (72,3-100)
	VIM	10	0	0	10	0	N/A	100% (72,3-100)
	NDM	10	3	0	7	0	100% (43,9-100)	100% (67,6-100)
	KPC	10	2	0	8	0	100% (34,2-100)	100% (64,6-100)
	OXA-48	10	3	0	7	0	100% (43,9-100)	100% (64,6-100)

Tabella 3. Confronto delle prestazioni di Xpert Carba-R e della coltura di riferimento + sequenziamento per tipo di organismo – campioni di analisi rettali e perirettali prospettici (continua)

Specie ^a	Bersaglio	N	TP	FP	TN	FN	PPA (IC al 95%)	NPA (IC al 95%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	IMP	1	0	0	1	0	N/A	100% (20,7-100)
	VIM	1	0	0	1	0	N/A	100% (20,7-100)
	NDM	1	0	0	1	0	N/A	100% (20,7-100)
	KPC	1	0	0	1	0	N/A	100% (20,7-100)
	OXA-48	1	1	0	0	0	100% (20,7-100)	N/A
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP	63	0	1	62	0	N/A	98,4% (91,5-99,7)
	VIM	63	0	1	62	0	N/A	98,4% (91,5-99,7)
	NDM	63	5	1	57	0	100% (56,6-100)	98,3% (90,9-99,7)
	KPC	63	28	1	34	0	100% (87,9-100)	97,1% (85,5-99,5)
	OXA-48	63	25	3	34	1	96,2% (81,1-99,3)	91,9% (78,7-97,2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP	58	0	0	58	0	N/A	100% (93,8-100)
	VIM	58	5	0	49	4	55,6% (26,7-81,1)	100% (92,7-100)
	NDM	58	0	1	57	0	N/A	98,3% (90,9-99,7)
	KPC	58	0	2	56	0	N/A	96,6% (88,3-99,1)
	OXA-48	58	0	0	58	0	N/A	100% (93,8-100)

a. *Acinetobacter baumannii* (14) e *Enterobacter amnigenus* (1) sono stati recuperati ma non contenevano sequenze bersaglio dal metodo di riferimento o dal saggio Xpert Carba-R.

Bersagli multipli sono stati rilevati dal saggio Xpert Carba-R in nove campioni di analisi prospettici. I dettagli sono forniti in Tabella 4, insieme al risultato della sequenza discrepante.

Tabella 4. Campioni di analisi prospettici rettali e perirettali con bersagli multipli rilevati

Campione di analisi	Bersagli rilevati dal saggio Xpert Carba-R	Bersagli rilevati mediante la sequenza di riferimento	Risultati di prova discrepanti - Bersagli rilevati mediante sequenza di riferimento
1	KPC, OXA-48	NEG	NEG
2	VIM, KPC	NEG ^a	NEG ^a
3	VIM, OXA-48	OXA-48	OXA-48
4	KPC, OXA-48	KPC	KPC, OXA-48
5	NDM, OXA-48	NDM	NDM, OXA-48
6	VIM, NDM	NEG ^a	NEG
7	NDM, KPC	KPC	NDM, KPC
8	VIM, KPC	VIM	VIM, KPC
9	NDM, OXA-48	NDM, OXA-48	N/A

a. Un organismo non è stato isolato dalla coltura di riferimento, pertanto il sequenziamento di riferimento non è stato eseguito.

Confronto fra i risultati di campioni di analisi creati appositamente ottenuti con il saggio Xpert Carba-R e il metodo di riferimento

Come parte dello studio clinico, è stato testato anche un totale di 864 campioni di analisi creati appositamente (432 preparati nella matrice di tamponi rettali e 432 nella matrice perirettale).

Oltre ai gruppi *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* testati nello studio appositamente creato, sono stati valutati anche altri 5 ceppi non *Enterobacteriaceae*: *Pseudomonas stutzeri* (1), *Pseudomonas oryzihabitans* (1), *Pseudomonas putida* (2) e *Empedobacter brevis* (1).

Quando testato con campioni di analisi creati appositamente, il saggio Xpert Carba-R ha dimostrato un intervallo di PPA dal 95% al 100% tra i bersagli del saggio (bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{OXA-48} , e bla_{IMP}). La concordanza percentuale negativa (NPA) per le sequenze geniche bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{OXA-48} e bla_{IMP} era del 100% rispetto al metodo di riferimento (Tabella 5).

Tabella 5. Confronto delle prestazioni di Xpert Carba-R e il metodo di riferimento – Campioni di analisi creati appositamente

Matrice	Bersaglio	N	TP	FP	TN	FN	PPA (IC al 95%)	NPA (IC al 95%)
Rettale	IMP	432	76	0	352	4	95,0% (87,8-98,0)	100% (98,9-100)
	VIM	432	81	0	350	1	98,8% (93,4-99,8)	100% (98,9-100)
	NDM	432	80	0	352	0	100% (95,4-100)	100% (98,9-100)
	KPC	432	80	0	352	0	100% (95,4-100)	100% (98,9-100)
	OXA-48	432	79	0	352	1	98,8% (93,3-99,8)	100% (98,9-100)

Tabella 5. Confronto delle prestazioni di Xpert Carba-R e il metodo di riferimento – Campioni di analisi creati appositamente (continua)

Matrice	Bersaglio	N	TP	FP	TN	FN	PPA (IC al 95%)	NPA (IC al 95%)
Perirettale	IMP	432	80	0	352	0	100% (95,4-100)	100% (98,9-100)
	VIM	432	82	0	350	0	100% (95,5-100)	100% (98,9-100)
	NDM	432	80	0	352	0	100% (95,4-100)	100% (98,9-100)
	KPC	432	80	0	352	0	100% (95,4-100)	100% (98,9-100)
	OXA-48	432	80	0	352	0	100% (95,4-100)	100% (98,9-100)
Combinato	IMP	864	156	0	704	4	97,5% (93,7-99,0)	100% (99,5-100)
	VIM	864	163	0	700	1	99,4% (96,6-99,9)	100% (99,5-100)
	NDM	864	160	0	704	0	100% (97,7-100)	100% (99,5-100)
	KPC	864	160	0	704	0	100% (97,7-100)	100% (99,5-100)
	OXA-48	864	159	0	704	1	99,4% (96,5-99,9)	100% (99,5-100)

Studio di equivalenza del tampone rettale e perirettale

Per dimostrare l'equivalenza dei campioni di analisi di tamponi perirettali e dei campioni di analisi di tamponi rettali, è stato condotto uno studio in un centro che ha incluso campioni di analisi di campioni prospettici prelevati per via rettale e perirettale freschi da soggetti consenzienti che erano ricoverati in ospedale.

I set di tamponi accoppiati forniti nel dispositivo di raccolta dei campioni di analisi Cepheid sono stati utilizzati per raccogliere campioni di analisi da ciascun soggetto. È stato utilizzato un set di tamponi accoppiati per prelevare il campione di analisi di tampone perirettale e per il prelievo del campione di analisi di tampone rettale è stato utilizzato un secondo set di tamponi accoppiati. Il campione di analisi di tampone perirettale è stato raccolto per primo, seguito dal campione di analisi di tampone rettale dello stesso soggetto. Un tampone per ciascun set di tamponi accoppiati è stato utilizzato per il test del saggio Xpert Carba-R. Il secondo tampone di ciascun set di tamponi accoppiati è stato utilizzato per test di coltura e sensibilità quando uno o entrambi i campioni di analisi di tamponi perirettali o rettali sono risultati positivi per uno o più bersagli mediante il saggio Xpert Carba-R. Se i campioni di analisi di tamponi perirettali e rettali sono risultati entrambi negativi con il saggio Xpert, non è stata eseguita alcuna coltura.

Il sequenziamento bidirezionale del DNA è stato eseguito su DNA estratto da colonie isolate che manifestava una non suscettibilità ai carbapenemi mediante il metodo di diffusione del disco CLSI o dal brodo MacConkey con dischetto di meropenem se il risultato della coltura era negativo e il risultato del saggio Xpert Carba-R era positivo. I risultati del metodo di riferimento non sono stati utilizzati per modificare i dati sulle prestazioni per lo studio di equivalenza dei tamponi.

Inizialmente, in questo studio clinico è stato incluso un totale di 207 campioni di analisi, tutti idonei all'inclusione. Dei 207 campioni di analisi idonei, 201 campioni di analisi sono stati inclusi nel set di dati finale utilizzato per le analisi. Sono stati esclusi sei campioni di tampone (4 campioni di analisi di tamponi perirettali e 2 campioni di analisi di tamponi rettali) a causa dei risultati indeterminati del saggio Xpert Carba-R.

Dei 201 campioni di analisi inclusi nelle analisi dei dati, 92 (45,8%) sono stati prelevati da soggetti di sesso femminile e 109 (54,2%) da soggetti di sesso maschile. Complessivamente, il 45,8% (92/201) dei campioni di analisi sono stati raccolti da soggetti di età compresa tra i 21 e i 65 anni e il 54,2% (109/201) provenivano da soggetti di >65 anni.

Le prestazioni (PPA e NPA) del saggio Xpert Carba-R utilizzando campioni di analisi di tamponi perirettali sono state determinate in relazione ai risultati del saggio Xpert Carba-R utilizzando campioni di analisi di tamponi rettali dello stesso soggetto. Le stime PPA e NPA sono riportate nella Tabella 6. In relazione ai risultati dei campioni di analisi di tamponi rettali del saggio Xpert Carba-R, i campioni di tamponi perirettali hanno dimostrato un PPA e un NPA complessivi del 94,7% (IC al 95%: 75,4-99,1) e 97,8% (IC al 95%: 94,5-99,1), rispettivamente.

Tabella 6. Saggio Xpert Carba-R – Confronto tra campioni di analisi di tamponi perirettali e campioni di analisi di tamponi rettali

Saggio Xpert Carba-R – Campioni di analisi di tamponi rettali				
Saggio Xpert Carba-R – Campioni di analisi di tamponi perirettali		Pos	Neg	Totale
	Pos	18 ^a	4 ^b	22
	Neg	1 ^c	178	179
	Totale	19	182	201
PPA			94,7% (IC al 95%: 75,4-99,1)	
NPA			97,8% (IC al 95%: 94,5-99,1)	

- Per un campione di analisi, il test Xpert del tampone rettale era positivo al KPC e OXA-48 e sul tampone perirettale era positivo solo all'OXA-48. Il campione di analisi era negativo alla coltura di entrambi i tamponi rettale e perirettale. I risultati delle sequenze di brodi MacConkey erano negativi per il tampone perirettale e OXA-48 positivi per il tampone rettale.
- 2 su 4 erano positivi alla coltura per i tamponi rettali e perirettali, i risultati della sequenza di isolati erano entrambi OXA-48 positivi, 1 su 4 era negativo alla coltura per i tamponi rettali e perirettali, il risultato della sequenza rettale non era disponibile a causa dell'isolato non salvato; l'isolato perirettale è stato interpretato come suscettibile ai carbapenemi e per sequenziamento del protocollo non è stato richiesto.
- Negativi alla coltura per i tamponi rettali e perirettali, i risultati della sequenza dei brodi MacConkey sono stati entrambi OXA-48 positivi.

17.2 Prestazioni cliniche - Isolati batterici

Le caratteristiche prestazionali del saggio Xpert Carba-R con isolati batterici sono state determinate in uno studio di ricerca multicentrico confrontando il saggio Xpert Carba-R al sequenziamento bidirezionale di riferimento del bersaglio del DNA amplificato. I campioni di studio comprendevano isolati batterici coltivati sia su agar sangue sia su agar MacConkey.

Per poter essere inclusi nello studio, gli isolati devono essere stati precedentemente identificati come *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii*. Per la determinazione della sensibilità, gli isolati devono essere stati intermedi o resistenti a meropenem, ertapenem e/o imipenem secondo le linee guida CLSI M100-S24.²² Gli isolati di *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii* devono essere stati intermedi oppure resistenti all'imipenem o al meropenem. Questi organismi sono intrinsecamente resistenti all'ertapenem. Per la valutazione della specificità, gli isolati possono essere stati suscettibili o resistenti al meropenem, ertapenem e imipenem secondo le linee guida CLSI M100-S24.²² Gli isolati di *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* devono essere stati suscettibili all'imipenem e al meropenem. Gli isolati sono stati testati solo una volta nello studio.

Inizialmente, in questo studio clinico è stato inserito un totale di 489 isolati batterici (431 isolati da stock clinici e 58 isolati freschi), di cui 485 erano idonei all'inclusione. Gli isolati non idonei comprendevano quattro isolati precedentemente inseriti nello studio.

Dei 485 isolati, 467 isolati (410 isolati da stock clinici e 57 isolati freschi) sono stati inclusi nel set di dati finale utilizzato per le analisi presentate in questo rapporto; due isolati sono stati esclusi perché il test di riferimento non è stato eseguito; e sedici isolati sono stati esclusi perché non sono stati identificati come *Enterobacteriaceae*, *A. baumannii*, o *P. aeruginosa*.

Per il test del saggio Xpert Carba-R, colonie ben isolate cresciute su ciascun tipo di agar sono state diluite ad una sospensione equivalente allo standard 0,5 McFarland utilizzando il metodo diretto di sospensione delle colonie secondo le linee guida CLSI M07-A9.²³

Per il sequenziamento di riferimento, il DNA degli isolati di coltura è stato purificato, quantificato e amplificato utilizzando primer specifici per tutti e cinque i geni target progettati per amplificare regioni più ampie dai bersagli del test rispetto ai primer inclusi nel saggio Xpert Carba-R. La produzione della dimensione appropriata del prodotto di amplificazione è stata confermata sul Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Se le bande mostrate sul Bioanalyzer corrispondevano alle dimensioni attese dell'amplicone di uno qualsiasi dei cinque geni bersaglio rilevati dal saggio Xpert Carba-R, l'amplicone per l'isolato è stato inviato a un laboratorio indipendente per l'analisi di sequenziamento bidirezionale di riferimento, che è stato convalidato per il rilevamento dei cinque bersagli nel saggio Xpert Carba-R. Se sul Bioanalyzer non sono state mostrate bande per nessuno dei cinque geni bersaglio, l'isolato non è stato inviato per l'analisi della sequenza e il risultato del metodo di riferimento è stato considerato negativo per i cinque geni bersaglio.

Bersagli multipli sono stati rilevati dal saggio Xpert Carba-R in campioni di dieci isolati. I dettagli sono forniti in Tabella 7, insieme al risultato di sequenziamento di riferimento.

Tabella 7. Isolati con bersagli multipli rilevati

Isolato	Tipo di Agar ^a	Bersagli rilevati dal saggio Xpert Carba-R	Bersagli rilevati mediante la sequenza di riferimento
1	BA, MC	NDM, OXA-48	NDM, OXA-48
2	BA	VIM, KPC	VIM
3	BA, MC	NDM, OXA-48	NDM, OXA-48
4	BA, MC	NDM, OXA-48	NDM, OXA-48
5	BA, MC	NDM, OXA-48	NDM, OXA-48
6	BA, MC	NDM, OXA-48	NDM, OXA-48
7	BA, MC	NDM, OXA-48	NDM, OXA-48
8	BA, MC	NDM, OXA-48	NDM, OXA-48
9	BA, MC	NDM, OXA-48	NDM, OXA-48
10	BA, MC	NDM, OXA-48	NDM, OXA-48

a. BA = agar sangue; MC = agar MacConkey

Se testato con isolati di agar sangue, il saggio Xpert Carba-R ha dimostrato una sensibilità e una specificità complessive rispettivamente del 100,0% (IC al 95%: 99,0-100) e 98,1% (IC al 95%: 93,2-99,5), rispetto alla sequenza di riferimento eseguita da isolati di agar sangue (Tabella 8). Il risultato combinato è stato definito positivo per il saggio Xpert Carba-R se uno qualsiasi dei bersagli era positivo, e negativo per il saggio Xpert Carba-R se tutti i bersagli erano negativi.

Tabella 8. Confronto di Xpert Carba-R (agar sangue) e sequenziamento di riferimento (isolato cresciuto su agar sangue) – Combinato

Bersaglio	N	TP	FP	TN	FN	Sensibilità (IC al 95%)	Specificità (IC al 95%)
Combinato	467	364 ^a	2 ^a	101	0	100% (99,0-100)	98,1% (93,2-99,5)

a. I risultati combinati rappresentano i risultati per isolato. Per alcuni isolati sono stati osservati più risultati del bersaglio.

Se testato con isolati di agar sangue, il saggio Xpert Carba-R ha dimostrato una sensibilità e una specificità complessive del > 99% per ciascuno dei cinque bersagli del dosaggio, rispetto al sequenziamento di riferimento eseguito dagli isolati di agar sangue (Tabella 9).

Per gli isolati con risultati discordanti tra il saggio Xpert Carba-R e il sequenziamento di riferimento, è stato eseguito il test discrepante utilizzando il sequenziamento bidirezionale sugli isolati delle piastre di agar MacConkey. I risultati dei test discrepanti sono indicati a piè di pagina Tabella 9 e Tabella 11.

Tabella 9. Confronto del saggio Xpert Carba-R (agar sangue) e del sequenziamento di riferimento (isolato cresciuto su agar sangue) – Per bersaglio

Bersaglio	N	TP	FP	TN	FN	Sensibilità (IC al 95%)	Specificità (IC al 95%)
IMP	467	40	1 ^a	426	0	100% (91,2-100)	99,8% (98,7-100)
VIM	467	82	1 ^b	384	0	100% (95,5-100)	99,7% (98,5-100)
NDM	467	78	0	389	0	100% (95,3-100)	100% (99,0-100)
KPC	467	84	1 ^c	382	0	100% (95,6-100)	99,7% (98,5-100)
OXA-48	467	89	0	378	0	100% (95,9-100)	100% (99,0-100)

- Il risultato del sequenziamento del DNA bidirezionale per questo isolato IMP falso positivo ha mostrato un'omologia di sequenza del 92,95%, leggermente inferiore ai criteri di cut-off del 95%. Il test discrepante non è stato eseguito.
- Risultati dei test discrepanti: 1 su 1 è risultato positivo al VIM.
- Questo isolato falso positivo è probabilmente dovuto alla contaminazione crociata KPC a livello di preparazione del campione. I test discrepanti non hanno prodotto una corrispondenza di sequenza con il bersaglio KPC. I test discrepanti hanno prodotto una corrispondenza di sequenza per il bersaglio VIM, pertanto, questo isolato è classificato come TP nella valutazione "combinata" presentata in Tabella 8, sopra.

Se testato con isolati di agar MacConkey, il saggio Xpert Carba-R ha dimostrato una sensibilità e una specificità complessive rispettivamente del 100% (IC al 95%: 99,0-100) e 97,1% (IC al 95%: 91,8-99,0), rispetto al sequenziamento di riferimento eseguito dagli isolati di agar sangue (Tabella 10). Il risultato combinato è stato definito positivo per il saggio Xpert Carba-R se uno qualsiasi dei bersagli era positivo e negativo per il saggio Xpert Carba-R se tutti i bersagli erano negativi.

Tabella 10. Confronto di Xpert Carba-R (agar MacConkey) e del sequenziamento di riferimento (Isolato cresciuto su agar sangue – combinato)

Bersaglio	N	TP	FP	TN	FN	Sensibilità (IC al 95%)	Specificità (IC al 95%)
Combinato	467	364 ^a	3	100	0	100% (99,0-100)	97,1% (91,8-99,0)

- I risultati combinati rappresentano i risultati per isolato. Per alcuni isolati sono stati osservati più risultati del bersaglio.

Se testato con isolati da agar MacConkey, il saggio Xpert Carba-R ha dimostrato una sensibilità e specificità del >99% per ciascuno dei cinque bersagli del saggio, rispetto al sequenziamento di riferimento eseguito dagli isolati dell'agar sangue (Tabella 11).

Tabella 11. Confronto di Xpert Carba-R (agar MacConkey) e del sequenziamento di riferimento (isolato cresciuto su agar sangue) – Per bersaglio

Bersaglio	N	TP	FP	TN	FN	Sensibilità (IC al 95%)	Specificità (IC al 95%)
IMP	467	40	1 ^a	426	0	100% (91,2-100)	99,8% (98,7-100)
VIM	467	82	1 ^b	384	0	100% (95,5-100)	99,7% (98,5-100)
NDM	467	78	1 ^c	388	0	100% (95,3-100)	99,7% (98,6-100)
KPC	467	84	0	383	0	100% (95,6-100)	100% (99,0-100)
OXA-48	467	89	0	378	0	100% (95,9-100)	100% (99,0-100)

- Il risultato del sequenziamento del DNA bidirezionale per questo isolato IMP falso positivo ha mostrato un'omologia di sequenza del 92,95%, leggermente inferiore ai criteri di cut-off del 95%. Il test discrepante non è stato eseguito.
- Risultati dei test discrepanti: 1 su 1 è risultato positivo al VIM.
- Il centro clinico ha riportato che la caratterizzazione interna di questo isolato falso positivo prima del test di studio ha portato a un bersaglio di gene NDM positivo. I test discrepanti non hanno prodotto una corrispondenza di sequenza per nessuno dei 5 target genici.

Le prestazioni del saggio Xpert Carba-R per gruppo di organismi specifici sono mostrate in Tabella 12 sia per agar sangue sia per terreno agar MacConkey. Il risultato complessivo è stato definito positivo per il saggio Xpert Carba-R se uno qualsiasi dei bersagli era positivo, e negativo per il saggio Xpert Carba-R se tutti i bersagli erano negativi.

Tabella 12. Confronto di Xpert Carba-R e sequenziamento di riferimento

Terreno	Organismi	Bersaglio	N	TP	FP	TN	FN	Sensibilità (IC al 95%)	Specificità (IC al 95%)
Agar sangue	<i>Enterobacteriaceae</i>	IMP	343	4	0	339	0	100% (51,0-100)	100% (98,9-100)
		VIM	343	51	1	291	0	100% (93,0-100)	99,7% (98,1-99,9)
		NDM	343	73	0	270	0	100% (95,0-100)	100% (98,6-100)
		KPC	343	83	1	259	0	100% (95,6-100)	99,6% (97,9-99,9)
		OXA-48	343	89	0	254	0	100% (95,9-100)	100% (98,5-100)
		Totale	343	291 ^a	1 ^a	51	0	100% (98,7-100)	98,1% (89,9-99,7)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP	80	16	1	63	0	100% (80,6-100)	98,4% (91,7-99,7)
		VIM	80	31	0	49	0	100% (89,0-100)	100% (92,7-100)
		NDM	80	0	0	80	0	N/A	100% (95,4-100)
		KPC	80	1	0	79	0	100% (20,7-100)	100% (95,4-100)
		OXA-48	80	0	0	80	0	N/A	100% (95,4-100)
		Totale	80	48	1	31	0	100% (92,6-100)	96,9% (84,3-99,5)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	IMP	44	20	0	24	0	100% (83,9-100)	100% (86,2-100)
		VIM	44	0	0	44	0	N/A	100% (92,0-100)
		NDM	44	5	0	39	0	100% (56,6-100)	100% (91,0-100)
		KPC	44	0	0	44	0	N/A	100% (92,0-100)
		OXA-48	44	0	0	44	0	N/A	100% (92,0-100)
		Totale	44	25	0	19	0	100% (86,7-100)	100% (83,2-100)

Tabella 12. Confronto di Xpert Carba-R e sequenziamento di riferimento (continua)

Terreno	Organismi	Bersaglio	N	TP	FP	TN	FN	Sensibilità (IC al 95%)	Specificità (IC al 95%)
Agar MacConkey	<i>Enterobacteriaceae</i>	IMP	343	4	0	339	0	100% (51,0-100)	100% (98,9-100)
		VIM	343	51	1	291	0	100% (93,0-100)	99,7% (98,1-99,9)
		NDM	343	73	1	269	0	100% (95,0-100)	99,6% (97,9-99,9)
		KPC	343	83	0	260	0	100% (95,6-100)	100% (98,5-100)
		OXA-48	343	89	0	254	0	100% (95,9-100)	100% (98,5-100)
		Totale	343	291 ^a	2	50	0	100% (98,7-100)	96,2% (87,0-98,9)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP	80	16	1	63	0	100% (80,6-100)	98,4% (91,7-99,7)
		VIM	80	31	0	49	0	100% (89,0-100)	100% (92,7-100)
		NDM	80	0	0	80	0	N/A	100% (95,4-100)
		KPC	80	1	0	79	0	100% (20,7-100)	100% (95,4-100)
		OXA-48	80	0	0	80	0	N/A	100% (95,4-100)
		Totale	80	48	1	31	0	100% (92,6-100)	96,9% (84,3-99,5)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	IMP	44	20	0	24	0	100% (83,9-100)	100% (86,2-100)
		VIM	44	0	0	44	0	N/A	100% (92,0-100)
		NDM	44	5	0	39	0	100% (56,6-100)	100% (91,0-100)
		KPC	44	0	0	44	0	N/A	100% (92,0-100)
		OXA-48	44	0	0	44	0	N/A	100% (92,0-100)
		Totale	44	25	0	19	0	100% (86,7-100)	100% (83,2-100)

a. I risultati complessivi rappresentano i risultati per isolato. Per alcuni isolati sono stati osservati più risultati del bersaglio.

I risultati del saggio Xpert Carba-R per fenotipo sono presentati in Tabella 13 e Tabella 14 sotto. I risultati fenotipici erano basati sull'identificazione dell'organismo e sui risultati di suscettibilità per ciascuno degli isolati. Il risultato combinato è stato definito positivo per il saggio Xpert Carba-R se uno qualsiasi dei bersagli era positivo, e negativo per il saggio Xpert Carba-R se tutti e cinque i bersagli erano negativi. Un fenotipo non suscettibile significa che l'isolato era intermedio o resistente ad almeno un carbapenem. Un fenotipo suscettibile significa che l'isolato era suscettibile a imipenem, meropenem ed ertapenem.

Tabella 13. Confronto di Xpert Carba-R (agar sangue) e del fenotipo – combinato

		Risultati fenotipici		
Xpert Carba-R		Non suscettibile	Suscettibile	Totale
	Gene rilevato	356	10	366
	Gene non rilevato	95	6	101
	Totale	451	16	467

Tabella 14. Confronto di Xpert Carba-R (agar MacConkey) e del fenotipo – combinato

		Risultati fenotipici		
Xpert Carba-R		Non suscettibile	Suscettibile	Totale
	Gene rilevato	357	10 ^a	367
	Gene non rilevato	94 ^b	6	100
	Totale	451	16	467

- I 10 isolati che sono fenotipicamente suscettibili ai carbapenemi ma positivi con il saggio Xpert Carba-R possono contenere mutazioni che inibiscono o riducono l'espressione del gene della resistenza ai carbapenemi rilevata dal saggio Xpert Carba-R.
- I 94 isolati che sono fenotipicamente non suscettibili ai carbapenemi ma negativi con il saggio Xpert Carba-R possono contenere altri meccanismi di resistenza ai carbapenemi, come la beta-lattamasi AmpC o le beta-lattamasi a spettro esteso in combinazione con le mutazioni delle porine o potenzialmente altri geni di resistenza ai carbapenemi non rilevati dal saggio Xpert Carba-R.

Tra i 934 test eseguiti (467 isolati x 2 tipi di agar), uno ha avuto un esito iniziale **NESSUN RISULTATO (NO RESULT)** (0,10%, IC al 95% 0,00-0,58). L'isolato ha prodotto risultati validi quando è stato ripetuto il saggio. Il tasso di validità complessivo del saggio è stato del 100% (934/934).

18 Prestazioni analitiche

18.1 Sensibilità analitica (limite di rilevamento) - Tamponi rettali e perirettali

La sensibilità analitica o il limite di rilevamento (LoD) del saggio Xpert Carba-R è stato valutato utilizzando organismi produttori di carbapenemasi seminati in matrici di tamponi rettali umani negativi combinati in pool e matrici di tamponi perirettali umani negativi combinati in pool. Il LoD è stato determinato per due batteri produttori di carbapenemasi per ciascun analita genico, vale a dire i geni codificanti KPC, NDM, VIM, OXA-48 e IMP. I batteri sono stati titolati in base ai conteggi su piastra e inoculati in tamponi puliti. I tamponi sono stati collocati in una matrice di tamponi rettali negativi combinati in pool o in una matrice di tamponi perirettali negativi combinati in pool e replicati di 20 sono stati valutati a un minimo di cinque concentrazioni differenti per quattro giorni. Il LoD per ciascuno dei dieci organismi produttori di carbapenemasi è stato stimato mediante l'analisi probit. Il LoD stimato è definito come la concentrazione più bassa di cellule del bersaglio (CFU/tampone) che possono essere distinte in modo riproducibile dai campioni negativi con una confidenza del 95%. Lo studio è stato eseguito con due lotti differenti di reagenti Xpert Carba-R e l'LoD dichiarato è quello più alto fra le due determinazioni. I LoD stimati sono stati verificati preparando e analizzando 10 replicati da due diluizioni indipendenti di ciascun batterio a ciascun LoD stimato.

Il LoD dichiarato per ciascuna coppia di organismi produttori di carbapenemasi in matrici di tamponi rettali e perirettali è mostrato in Tabella 15 e Tabella 16.

Tabella 15. Le stime e la verifica di LoD per organismi che ospitano i geni della carbapenemasi utilizzando il saggio Xpert Carba-R nella matrice del campione rettale

Gene e organismo bersaglio	LoD stimati (Probit) CFU/tampone		LoD dichiarato CFU/tampone	LoD stimato in reagente per il campione (CFU/ml)	Verifica (positivi/20)
	Lotto 1	Lotto 2			
IMP-1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	174	141	174	35	20/20
IMP-1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	303	306	306	61	20/20
VIM-1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	247	305	305	61	20/20
VIM-4 <i>Escherichia coli</i>	815	468	815	163	20/20
NDM-1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-2146	117	251	251	50	20/20
NDM <i>Klebsiella pneumoniae</i>	74	57	74	15	19/20
KPC-3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13438	373	292	373	75	20/20
KPC <i>Enterobacter cloacae</i>	779	537	779	156	20/20
OXA-48 <i>Enterobacter cloacae</i>	154	109	154	31	20/20
OXA-48 <i>Escherichia coli</i>	104	99	104	21	20/20

Tabella 16. Le stime e la verifica di LoD per organismi che ospitano i geni della carbapenemasi utilizzando il saggio Xpert Carba-R nella matrice del campione perirettale

Gene e organismo bersaglio	Stime LoD (Probit) CFU/tampone		LoD dichiarato CFU/tampone	LoD stimato in reagente per il campione CFU/ml	Verifica (positivi/20)
	Lotto 1	Lotto 2			
IMP-1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	90	118	118	24	19/20
IMP-1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	269	635	635	127	20/20
VIM-1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	901	514	901	180	20/20
VIM-4 <i>Escherichia coli</i>	446	403	446	89	20/20
NDM-1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-2146	133	113	133	27	20/20
NDM <i>Klebsiella pneumoniae</i>	56	54	56	11	20/20
KPC-3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13438	358	292	358	72	20/20
KPC <i>Enterobacter cloacae</i>	1259	1303	1303	261	20/20
OXA-48 <i>Enterobacter cloacae</i>	223	166	223	45	20/20
OXA-48 <i>Escherichia coli</i>	126	137	137	27	20/20

18.2 Reattività analitica (inclusività)

18.2.1 Studio delle matrici di tamponi rettali e perirettali

La reattività analitica del saggio Xpert Carba-R con matrici di tamponi rettali e matrici di tamponi perirettali è stata valutata analizzando un pannello di 72 campioni. Questo pannello era composto da 11 ceppi batterici *bla*_{KPC} (KPC), 11 *bla*_{VIM} (VIM), 8 *bla*_{OXA-48} (OXA-48), 5 *bla*_{NDM}/*bla*_{OXA-181} (NDM/OXA-181), 6 *bla*_{OXA-181} (OXA-181), 17 *bla*_{IMP} (IMP) e uno *bla*_{KPC}/*bla*_{VIM} (KPC/VIM) ben caratterizzati. I ceppi testati nelle matrici di tamponi rettali e perirettali e le concentrazioni dei loro test sono presentati in Tabella 17.

Per l'analisi nelle matrici di tamponi rettali e perirettali, gli organismi sono stati seminati in una matrice di tamponi rettali negativi combinati in pool e una matrice di tamponi perirettali negativi combinati in pool. Tutti i ceppi batterici sono stati testati in triplicato per entrambe le matrici di tamponi. I geni bersaglio del saggio Xpert Carba-R sono stati rilevati in 69 su 72 ceppi batterici produttori di carbapenemasi benché l'IMP-4 sia stato rilevato soltanto usando una concentrazione più elevata (Tabella 17). Le sequenze di DNA bersaglio del saggio Xpert Carba-R non sono state rilevate in tre ceppi batterici come mostrato in Tabella 17. In uno dei tre ceppi batterici, il gene IMP-13 non è stato rilevato dal saggio, benché sia stato previsto che venisse rilevato da analisi *in silico*. In due degli altri tre ceppi batterici, non era previsto che i geni IMP-7 e IMP-14 fossero rilevati da analisi *in silico* e non sono stati rilevati dal saggio. Vedere Sezione 15, Limitazioni nel foglietto illustrativo.

Tabella 17. Reattività analitica del saggio Xpert Carba-R in matrici di tamponi rettali e matrici di tamponi perirettali

ID ceppo	Organismo	Marcatore della resistenza con informazioni sulle varianti	Concentrazione testata in matrici di tamponi rettali e matrici di tamponi perirettali (CFU/ml)
NCTC 13438	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-3	153
31551	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-4	50
ATCC BAA-1705	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	130
PA-Col	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KPC-2	250
KBM18	<i>Enterobacter aerogenes</i>	KPC-2	250
BM9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-3	330
PA3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	100
CGNC	<i>Serratia marcescens</i>	KPC-2	300
CFVL	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-2	160
COL	<i>Escherichia coli</i>	KPC-2	147
GR-04/KP-69	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2, VIM	80
164-3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	KPC	70
NCTC 13437	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-10	500
NCTC 13439	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	130
NCTC 13440	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	70
758	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM	250
PA-87	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM	200
B92A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM	2000
Col1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-2	500
BM19	<i>Serratia marcescens</i>	VIM-2	250
KOW7	<i>Escherichia coli</i>	VIM-4	250
DIH	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-19	250
MSH2014-3	<i>Enterobacter cloacae</i>	VIM	500
NCTC 13443	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	80
ATCC BAA-2146	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	80

Tabella 17. Reattività analitica del saggio Xpert Carba-R in matrici di tamponi rettali e matrici di tamponi perirettali (continua)

ID ceppo	Organismo	Marcatore della resistenza con informazioni sulle varianti	Concentrazione testata in matrici di tamponi rettali e matrici di tamponi perirettali (CFU/ml)
34262	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	80
GEN	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NDM-1	130
3047	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM-1	70
7892	<i>Proteus mirabilis</i>	NDM-1	30
CAN	<i>Salmonella spp.</i>	NDM-1	70
EGY	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NDM-2	40
I5	<i>Escherichia coli</i>	NDM-4	30
405	<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	30
CF-ABE	<i>Citrobacter freundii</i>	NDM	30
73999	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NDM	50
39365	<i>Providencia rettgeri</i>	NDM-1	70
NCTC 13442	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	40
OM11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	60
501	<i>Enterobacter cloacae</i>	OXA-48	80
DUW	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	120
OM22	<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	80
BOU	<i>Enterobacter cloacae</i>	OXA-48	80
TUR	<i>Enterobacter cloacae</i>	OXA-48	120
11670	<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	100
166643	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	20
42194	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	20
MSH2014-64	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	280
MSH2014-72	<i>Escherichia coli</i>	OXA-181	100
74	<i>Escherichia coli</i>	OXA-181	100
CDC0051	<i>Klebsiella ozaenae</i> ^a	OXA-181	250
B108A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM, OXA-181	10
C10192-DISCS	<i>Enterobacter aerogenes</i>	NDM, OXA-181	10
KP-OMA3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM, OXA-181	60
1300920	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM, OXA-181	15
MSH2014-69	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM, OXA-181	20
NCTC 13476	<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	250
695	<i>Acinetobacter baumannii</i>	IMP-1	1720
2340	<i>Enterobacter cloacae</i>	IMP-1	250

Tabella 17. Reattività analitica del saggio Xpert Carba-R in matrici di tamponi rettali e matrici di tamponi perirettali (continua)

ID ceppo	Organismo	Marcatore della resistenza con informazioni sulle varianti	Concentrazione testata in matrici di tamponi rettali e matrici di tamponi perirettali (CFU/ml)
IMPBMI	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-1	100
Yonsei_1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	IMP-1	1000
Yonsei_2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	IMP-1	500
6852	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-1	100
MKAM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-1	500
70450-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-1	250
3994	<i>Pseudomonas spp.</i>	IMP-10	250
CDC0161	<i>Enterobacter aerogenes</i> ^a	IMP-4	5,00E+04
5344	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-2	60
3985	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-11	2000
4032	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-6	80
3424	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-7 ^{b,c}	1,00E+06
32443	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-13 ^c	1,00E+06
92	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-14 ^{b,c}	1,00E+06

a. Questi organismi non sono stati testati come isolati batterici.

b. I geni IMP-7 e IMP-14 (*Pseudomonas aeruginosa*) non sono stati rilevati dal saggio e non si prevedeva che venissero rilevati da analisi *in silico* (vedere Sezione 15, Limitazioni).

c. IMP-13 gene (*Klebsiella pneumoniae*): benché si prevedeva che fosse rilevato da analisi *in silico*, il gene IMP-13 non è stato rilevato dal saggio (vedere Sezione 15, Limitazioni).

18.2.2 Studio sugli isolati batterici

È stata valutata anche la sensibilità analitica del saggio Xpert Carba-R con isolati batterici testando un pannello composto da 71 campioni costituiti da 11 ceppi batterici *bla*_{KPC} (KPC), 13 *bla*_{NDM} (NDM), 11 *bla*_{VIM} (VIM), 8 *bla*_{OXA-48} (OXA-48), 5 *bla*_{NDM/bla}_{OXA-181} (NDM/OXA-181), 5 *bla*_{OXA-181} (OXA-181), 17 *bla*_{IMP} (IMP) e un *bla*_{KPC/bla}_{VIM} (KPC/VIM) ben caratterizzati. I ceppi testati come isolati batterici sono presentati in Tabella 18.

Per il test degli isolati batterici, gli organismi sono stati analizzati in replicati di quattro campioni preparati diluendo 10 µl di sospensione cellulare 0,5 McFarland per ciascun ceppo batterico in 5 ml di reagente per il campione. I test sono stati eseguiti utilizzando sia piastre di agar sangue che MacConkey. I geni bersaglio del saggio Xpert Carba-R sono stati rilevati in 68 dei 71 ceppi batterici di entrambe le piastre. Le sequenze di DNA bersaglio del saggio Xpert Carba-R non sono state rilevate in tre ceppi batterici come indicato nella nota a piè di pagina Tabella 18. In uno dei tre ceppi batterici, il gene IMP-13 non è stato rilevato dal saggio, benché si era previsto che venisse rilevato da analisi *in silico*. In due dei tre ceppi batterici, i geni IMP-7 e IMP-14 non rilevati dal saggio, non erano rilevati neanche dall'analisi *in silico*. Vedere la sezione Limitazioni nel foglietto illustrativo.

Tabella 18. Reattività analitica del saggio Xpert Carba-R – Isolati batterici

ID ceppo	Organismo	Marcatore della resistenza con informazioni sulle varianti
NCTC 13438	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-3
31551	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-4
ATCC BAA-1705	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2
PA-Col	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KPC-2
KBM18	<i>Enterobacter aerogenes</i>	KPC-2
BM9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-3
PA3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2
CGNC	<i>Serratia marcescens</i>	KPC-2
CFVL	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-2
COL	<i>Escherichia coli</i>	KPC-2
GR-04/KP-69	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2, VIM
164-3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	KPC
NCTC 13437	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-10
NCTC 13439	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1
NCTC 13440	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1
758	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM
PA-87	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM
B92A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM
Col1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-2
BM19	<i>Serratia marcescens</i>	VIM-2
KOW7	<i>Escherichia coli</i>	VIM-4
DIH	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-19
MSH2014-3	<i>Enterobacter cloacae</i>	VIM
NCTC 13443	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1
ATCC BAA-2146	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1
34262	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM
GEN	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NDM-1
3047	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM-1
7892	<i>Proteus mirabilis</i>	NDM-1
CAN	<i>Salmonella spp.</i>	NDM-1
EGY	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NDM-2
I5	<i>Escherichia coli</i>	NDM-4
405	<i>Escherichia coli</i>	NDM-5
CF-ABE	<i>Citrobacter freundii</i>	NDM
73999	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NDM
39365	<i>Providencia rettgeri</i>	NDM-1
NCTC 13442	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48

Tabella 18. Reattività analitica del saggio Xpert Carba-R – Isolati batterici (continua)

ID ceppo	Organismo	Marcatore della resistenza con informazioni sulle varianti
OM11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48
501	<i>Enterobacter cloacae</i>	OXA-48
DUW	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48
OM22	<i>Escherichia coli</i>	OXA-48
BOU	<i>Enterobacter cloacae</i>	OXA-48
TUR	<i>Enterobacter cloacae</i>	OXA-48
11670	<i>Escherichia coli</i>	OXA-48
MSH2014-64	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181
MSH2014-72	<i>Escherichia coli</i>	OXA-181
B108A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM, OXA-181
C10192-DISCS	<i>Enterobacter aerogenes</i>	NDM, OXA-181
KP-OMA3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1, OXA-181
166643	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181
42194	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181
1300920	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM, OXA-181
MSH2014-69	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM, OXA-181
74	<i>Escherichia coli</i>	OXA-181
NCTC 13476	<i>Escherichia coli</i>	IMP-1
695	<i>Acinetobacter baumannii</i>	IMP-1
2340	<i>Enterobacter cloacae</i>	IMP-1
IMPBMI	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-1
6852	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-1
Yonsei_1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	IMP-1
Yonsei_2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	IMP-1
70450-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-1
3994	<i>Pseudomonas spp.</i>	IMP-10
MKAM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-1
5344	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-2
G029	<i>Specie Salmonella</i>	IMP-4
3985	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-11
4032	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-6
3424	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-7 ^{a,b}
32443	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-13 ^a
92	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-14 ^{a,b}

a. Non rilevato da Xpert Carba-R (vedere Sezione 15, Limitazioni).

b. I geni IMP-7 e IMP-14 non sono stati rilevati dal saggio e non si prevedeva che venissero rilevati da analisi *in silico* (vedere Sezione 15, Limitazioni).

Le varianti rilevate e le previsioni per il rilevamento di altri sottotipi di ciascun gene di resistenza basato su analisi *in silico*, sono presentate in Tabella 19 (che rappresenta i risultati della matrice del tampone rettale e dello studio sugli isolati batterici).

Tabella 19. Riepilogo delle varianti rilevate da test umido o che si prevede possano essere rilevate in base all'analisi *in silico*

Marcatore (o sottogruppo tradizionale)	Test umido			Non testato ma che si prevede possa essere rilevato in base all'analisi <i>in silico</i>
	N. di campioni	Tipi rilevati	Tipi non rilevati	
KPC	12	KPC-2,3,4	--	KPC-5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
NDM	18	NDM-1,2,4,5	--	NDM-3, 6, 7, 8, 9
VIM	12	VIM-1,2,4,10,19	--	VIM-5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38
OXA-48	18	OXA-48, 181 (variante OXA-48)	--	OXA-162, 163, 204, 232, 244, 245, 247
IMP	17	IMP-1 (9 ceppi), IMP-2, 4, 6, 10, 11	IMP-7 ^a , 13 ^b , 14 ^a	IMP-3, 8, 9, 13 ^b , 19, 20, 21, 22, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 33, 37, 40, 42

- a. I geni IMP-7 e IMP-14 (*Pseudomonas aeruginosa*) non sono stati rilevati dal saggio e non si prevedeva che venissero rilevati da analisi *in silico* (vedere Sezione 15, Limitazioni).
- b. Gene IMP-13 (*Klebsiella pneumoniae*) è stato testato: benché si prevedeva che potesse essere rilevato con analisi *in silico*, il gene IMP-13 non è stato rilevato dal saggio (vedere Sezione 15, Limitazioni).

18.3 Specificità analitica (reattività crociata)

La specificità analitica del saggio Xpert Carba-R è stata valutata per isolati batterici, organismi seminati nella matrice di tamponi rettali e organismi seminati nella matrice di tamponi perirettali. Per tutti e tre i tipi di campioni di analisi, un pannello di 62 ceppi batterici ben caratterizzati di batteri con suscettibilità o senza suscettibilità ai carbapenemi a causa di geni o meccanismi diversi dai geni bersaglio di Xpert Carba-R (Tabella 20 e Tabella 21) e 24 ceppi batterici commensali e altri microrganismi enterici sono anche stati valutati nello studio (Tabella 22). Anche le cellule umane sono state testate in matrici di tamponi rettali e in matrici di tamponi perirettali (Tabella 23). I meccanismi di resistenza sono stati determinati mediante saggi PCR individuali, analisi della sequenza del DNA o versione dell'array Check-Points CT102.

Per i campioni di matrici di tamponi rettali e perirettali, sono stati testati 62 ceppi a concentrazioni $>1 \times 10^6$ CFU/ml ad eccezione dello *Peptostreptococcus anaerobius* che è stato testato a 5×10^5 CFU/ml. I virus sono stati testati a $>1 \times 10^5$ TCID₅₀/ml o maggiore di $2,5 \times 10^7$ copie di RNA/ml. La linea cellulare della vescica (DNA genomico umano) è stata analizzata a 1×10^5 cellule/ml. Gli organismi sono stati diluiti in una matrice di tamponi rettali negativi combinati in pool o in una matrice di tamponi perirettali negativi combinati in pool e analizzati in triplicato. Il saggio Xpert Carba-R non ha rilevato alcuno dei 94 organismi e degli acidi nucleici con potenziale reattività crociata analizzati.

Per gli isolati batterici, gli organismi sono stati coltivati aerobicamente su piastre di agar sangue e agar MacConkey. Sono state preparate sospensioni a due cellule equivalenti a una sospensione cellulare da 0,5 McFarland da colonie isolate su ciascun tipo di piastra di agar. Ciascun organismo è stato testato per un totale di quattro volte (due replicati da ciascuna delle due sospensioni di cellule di 0,5 McFarland per organismo) da ciascuna piastra.

Il saggio Xpert Carba-R non ha reagito in modo incrociato con nessuno degli organismi testati (Tabella 20, Tabella 21, Tabella 22, e Tabella 23). La specificità analitica del saggio era del 100%.

Tabella 20. Numero di organismi suscettibili e non suscettibili ai carbapenemi per ciascun antibiotico

	Ertapenem	Imipenem	Meropenem
Suscettibile	19	30	24
Intermedio	0	8	4
Resistente	43	24	34

Tabella 21. Pannello di reattività crociata

Organismo	ID ceppo	Meccanismi di resistenza confermati	Suscettibilità ai carbapenemi (S/I/R) ^a		
			ETP ^a	IMP ^a	MEM ^a
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13441	CTX-M (-1, simile a -tipo 15); TEM	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13465	CTX-M (25)	S	S	S
<i>Enterobacter aerogenes</i>	810	Carenza di OmpC/OmpF; TEM	R	R	R
<i>Citrobacter freundii</i>	1698	TEM (WT+164S)	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	5557	AmpC (ACT/MIR)	R	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	kpn5	CTX-M-2	R	S	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	kpn12	TEM; SHV; CTX-M	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	eco1	TEM; CTX-M-2	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	eco2	CTX-M (2); TEM; OXA-2	R	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	cor1	CTX-M (2); TEM	R	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	hpp21	CTX-M (2); TEM	S	S	S
<i>Morganella morganii</i>	fer29	CTX-M (2); TEM	S	R	S
<i>Proteus mirabilis</i>	gut25	CTX-M (2); TEM	S	R	S
<i>Salmonella spp.</i>	3209	CTX-M (2); TEM	S	S	S
<i>Shigella flexnerii</i>	3331	CTX-M (2); TEM	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	PA_3	AmpC; CTX-M-15; TEM	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32189	SHV	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32443	CTX-M (1, simile a -tipo 15); SHV	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32598	CTX-M (-1, simile a -tipo 15); SHV; TEM	R	I	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33560	CTX-M (15); SHV-11; TEM-1	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33603	SHV-2	R	I	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33617	SHV-27	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33643	SHV (-5, -55); TEM	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34430	SHV; TEM; CTX-M-15	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34680	TEM; CTX-M-2	R	S	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34732	CTX-M (15); SHV; TEM	R	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	PA_174	GX-/Coltura+; SHV; TEM	S	S	S

Tabella 21. Pannello di reattività crociata (continua)

Organismo	ID ceppo	Meccanismi di resistenza confermati	Susceptibilità ai carbapenemi (S/I/R) ^a		
			ETP ^a	IMP ^a	MEM ^a
<i>Enterobacter aerogenes</i>	STU 645	SHV (WT+238S+240K)	R	S	R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	STU 669	SHV (WT+238S+240K)	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	C3015	AmpC (CMY II); TEM	R	R	R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	RI_100	AmpC (DHA); SHV	R	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B4A	SHV (WT + 238S +240K)	R	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B13A	SHV (WT + 238S +240K)	R	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	RI_474	AmpC (ACT/MIR)	R	I	I
<i>Enterobacter amnigenus</i>	B71	AmpC (ACT/MIR)	R	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DD82A	SHV (WT + 238S + 240K)	R	S	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B100	CTX-M (simile -1, tipo-15); SHV (WT+238S); TEM	R	S	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	135B	TEM	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B157	SHV; TEM	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	T2914280	CTX-M (-1, -15); TEM	R	S	R
<i>Providencia stuartii</i>	DD188	TEM (104K + 164S)	R	I	I
<i>Enterobacter cloacae</i>	DD189	AmpC (ACT/MIR)	R	S	S
<i>Escherichia coli</i>	B198B	CTX-M (simile a -1, tipo-15); TEM	R	S	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	T3019989-1	CTX-M (simile a -1, tipo-15); SHV	R	I	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	T3019989-2	CTX-M (simile a -1, tipo-15); SHV	R	S	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	ENC-THAI14	VEB-1, TEM	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	CB154006	CTX-M (9); TEM	R	I	I
<i>Enterobacter cloacae</i>	S35766	AmpC (ACT/MIR)	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	X1856910	AmpC (ACT/MIR); TEM	R	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	W3758164	CTX-M (simile a -1, -15); SHV; TEM	R	I	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X2135758	CTX-M (simile a -1, -15); SHV	R	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	W3809535	CTX-M (simile a -1, -15); SHV	R	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDC0064	SPM	R	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	CDC0099	SME	R	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	CDC0121	SME	R	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	CDC0122	SME	R	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	CDC0123	SME	R	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	CDC0124	SME	R	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	CDC0130	SME	R	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	CDC0131	SME	R	R	R

Tabella 21. Pannello di reattività crociata (continua)

Organismo	ID ceppo	Meccanismi di resistenza confermati	Susceptibilità ai carbapenemi (S/I/R) ^a		
			ETP ^a	IMP ^a	MEM ^a
Gruppo <i>Enterobacter cloacae</i>	CDC0132	IMI	R	R	R
Complesso <i>Enterobacter cloacae</i>	CDC0164	IMI	R	R	R

a. S/I/R = Suscettibile/Intermedio/Resistente, ETP = Ertapenem, IMP = Imipenem, MEM = Meropenem

Tabella 22. Pannello di reattività crociata (microrganismi commensali e altri microrganismi enterici)

ID ceppo	Organismo	Concentrazione testata (CFU/ml se non diversamente specificato)
ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>	2,67E+06
ATCC 29212	<i>Enterococcus faecalis</i>	3,15E+06
ATCC 700603	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,20E+06
ATCC 35218	<i>Escherichia coli</i>	2,47E+06
ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	4,53E+06
ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,17E+06
ATCC 9689	<i>Clostridium difficile</i> ^a	1,80E+07
ATCC 700621	<i>Enterobacter cloacae</i>	8,95E+06
ATCC 9756	<i>Enterococcus faecium</i>	6,54E+06
ATCC 13182	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4,76E+06
ATCC BAA-747	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2,27E+06
ATCC 33128	<i>Citrobacter freundii</i>	2,01E+06
ATCC 49948	<i>Morganella morganii</i>	8,19E+06
ATCC 51331	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3,15E+06
ATCC 27028	<i>Citrobacter koseri</i>	5,05E+06
ATCC 49809	<i>Providencia stuartii</i>	3,01E+06
ATCC 49037	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ^a	5,00E+05
CCUG 29780 / ATCC 12401	<i>Streptococcus agalactiae</i>	5,21E+06
ATCC 15703	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ^a	1,10E+08
ATCC 51697	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3,19E+06
ATCC 43071	<i>Proteus mirabilis</i>	1,78E+06
CCUG 34787	<i>Acinetobacter spp.</i>	2,40E+06
CCUG 418	<i>Citrobacter freundii</i>	2,95E+06
CCUG 33629	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	4,48E+06
CCUG 17874	<i>Helicobacter pylori</i>	1,61E+06
CCUG 33548	<i>Listeria monocytogenes</i>	4,77E+06
CCUG 6325	<i>Providencia alcalifaciens</i>	4,91E+06

Tabella 22. Pannello di reattività crociata (microrganismi commensali e altri microrganismi enterici) (continua)

ID ceppo	Organismo	Concentrazione testata (CFU/ml se non diversamente specificato)
CCUG 43594 / ATCC 33560	<i>Campylobacter jejuni</i> ^a	3,27E+06
MRVP/ZeptoMetrix	Adenovirus B tipo 7A/NY ^a	1,40E+05 TCID ₅₀ /ml
MRVP/ZeptoMetrix	Enterovirus tipo 71/NY ^a	4,40E+05 TCID ₅₀ /ml
Campione clinico – Cepheid	Norovirus GI ^a	2,5 x 10 ⁷ copie di RNA/ml

a. Questi organismi sono stati testati su matrice di tampone rettale e perirettale.

Tabella 23. Linea cellulare rappresentante DNA genomico umano

Nome organismo	Fonte
Carcinoma delle cellule della vescica (hgDNA)	ATCC HTB-4

18.4 Interferenza competitiva

È stato condotto uno studio sull'interferenza competitiva per provare se un titolo elevato di uno o più organismi produttori di carbapenemasi interferirebbe con il rilevamento di un secondo organismo produttore di carbapenemasi bersaglio presente a un titolo basso. Campioni ad alto titolo sono stati formulati a concentrazioni di 5 x 10⁶ CFU/ tampone e i bersagli a titolo basso sono stati formulati a circa 2x LoD per il rispettivo ceppo nella matrice di tamponi rettali o nella matrice di tamponi perirettali. In questo studio è stato usato un ceppo batterico produttore di carbapenemasi per ciascun analita genico, vale a dire i geni codificanti KPC, NDM, VIM, OXA-48 e IMP. Ciascun tipo di ceppo batterico produttore di carbapenemasi è stato testato a titoli bassi insieme a un titolo elevato di ciascuno degli altri uno o due tipi di ceppi batterici produttori di carbapenemasi (Tabella 24). I campioni sono stati testati in replicati di otto.

Un effetto inibitorio è stato osservato per tre dei cinque bersagli (IMP, VIM e OXA-48) quando una bassa concentrazione di ciascun bersaglio era presente in combinazione con un'alta concentrazione di uno o due altri bersagli per i campioni testati nella matrice di tamponi rettali. I tre bersagli (IMP, VIM e OXA-48) sono stati testati a una concentrazione più elevata (4x LoD) in combinazione con un'alta concentrazione di uno o due altri bersagli per campioni nella matrice di tamponi rettali. Nessun effetto inibitorio è stato osservato per i tre bersagli (IMP, VIM e OXA-48) a 4x LoD in presenza di infezioni concomitanti clinicamente rilevanti per il saggio Xpert Carba-R.

Un effetto inibitorio è stato osservato per due dei cinque bersagli (NDM e IMP) quando una bassa concentrazione di ciascun bersaglio era presente in combinazione con un'alta concentrazione di uno o due altri bersagli per campioni testati nella matrice di tamponi perirettali. I due bersagli (NDM e IMP) sono stati testati a una concentrazione più elevata (4x LoD) in combinazione con un'alta concentrazione di uno o due altri bersagli per campioni nella matrice di tamponi perirettali. Nessun effetto inibitorio è stato osservato per i due target (NDM e IMP) a 4x LoD in presenza di infezioni concomitanti clinicamente rilevanti per il saggio Xpert Carba-R.

L'effetto inibitorio competitivo sui bersagli Carba-R (NDM, IMP, VIM e OXA-48) è illustrato in Sezione 15, Limitazioni nel foglietto illustrativo.

Tabella 24. Combinazioni di batteri produttori di carbapenemasi testati con il saggio Xpert Carba-R

Combinazione
KPC alto/NDM alto/VIM basso
KPC alto/NDM alto/OXA basso
KPC alto/NDM alto/IMP basso
VIM alto/OXA alto/KPC basso
VIM alto/OXA alto/NDM basso
VIM alto/OXA alto/IMP basso

Tabella 24. Combinazioni di batteri produttori di carbapenemasi testati con il saggio Xpert Carba-R (continua)

Combinazione
IMP alto/KPC basso
IMP alto/NDM basso
IMP alto/VIM basso
IMP alto/OXA basso
OXA alto/VIM basso
VIM alto/OXA basso
KPC alto/NDM basso
Negativo

18.5 Sostanze potenzialmente interferenti

Le prestazioni del saggio Xpert Carba-R sono state valutate con 24 sostanze potenzialmente interferenti che possono essere presenti nei campioni di analisi di tamponi rettali e perirettali. Sono state preparate e analizzate soluzioni di sostanze potenzialmente interferenti (SI) alle concentrazioni specificate nella Tabella 25. In questo studio sono stati inclusi campioni positivi e negativi. I campioni positivi consistevano in un mix di cinque organismi produttori di carbapenemasi che ospitavano sequenze di geni KPC, NDM, VIM, IMP-1 e OXA-48 seminati in una matrice di tamponi rettali negativi combinati in pool o tamponi perirettali negativi combinati in pool a circa 3x LoD. Otto campioni positivi replicati sono stati testati per sostanza. I campioni negativi consistevano in matrice di tamponi rettali negativi combinati in pool matrice di tamponi perirettali negativi combinati in pool non seminati con organismi produttori di carbapenemasi. Per ogni sostanza sono stati analizzati otto campioni replicati negativi per determinare l'effetto sulle prestazioni del controllo di elaborazione del campione (SPC). I controlli consistevano in campioni positivi e negativi senza aggiunta di sostanze interferenti. L'effetto di ciascuna sostanza potenzialmente interferente sui replicati positivi e negativi è stato valutato confrontando i valori del ciclo soglia (Ct) del bersaglio generati in presenza della sostanza ai valori Ct ottenuti dai controlli che non contenevano la sostanza. I campioni replicati positivi e negativi per 22 sostanze potenzialmente interferenti sono stati correttamente identificati utilizzando il saggio Xpert Carba-R. Interferenza con il saggio Xpert Carba-R può essere osservata con solfato di bario a > 0,1% p/v e Pepto-Bismol a > 0,01% p/v nei test con campioni della matrice di tamponi rettali. Vedere Sezione 15, Limitazioni nel foglietto illustrativo. Campioni di matrici di tampone rettale, positivi per una miscela di cinque organismi produttori di carbapenemasi che ospitano sequenze di geni KPC, NDM, VIM, IMP-1 e OXA-48 testati con grasso fecale allo 0,25% p/v, non hanno prodotto risultati falsi negativi, tuttavia, sono stati osservati valori ciclo soglia ritardato per il bersaglio VIM. Questa potenziale interferenza della presenza di grasso fecale allo 0,25% p/v è fornita nella sezione Limitazioni del foglietto illustrativo. Interferenza con il saggio Xpert Carba-R può essere osservata con solfato di bario a > 0,1% p/v e Pepto-Bismol a > 0,025% p/v in test con campioni di matrici di tamponi perirettali. Vedere la Sezione 15, Limitazioni.

Tabella 25. Sostanze potenzialmente interferenti analizzate

Sostanza/Classe	Principio attivo	Concentrazione analizzata
Farmaco antinfiammatorio non steroideo	Naproxene	0,25% p/v
Composto per esami diagnostici per immagini	Solfato di bario	0,25% e 0,1% p/v
Antibiotico (orale)	Cephalexina	0,25% p/v
Antibiotico (orale)	Ciprofloxacina	0,25% p/v
Preservativo con lubrificante spermicida	Nonoxynol-9	1 preservativo ^a
Crema/unguento/supposte	Idrocortisone	0,25% p/v
Lassativo	Senosidi	0,25% p/v
Lipidi	Acido stearico/acido palmitico/colesterolo (grasso fecale)	0,25% p/v

Tabella 25. Sostanze potenzialmente interferenti analizzate (continua)

Sostanza/Classe	Principio attivo	Concentrazione analizzata
Farmaci anti-diarrea	Loperamide cloridrato/ bismuto subsalicilato (Imodium)	0,25% p/v
Farmaci anti-diarrea	Loperamide cloridrato/ bismuto subsalicilato (Kaopectate)	0,25% p/v
Unguento topico	K-Y Jelly	0,25% p/v
Antiacidi	Carbonato di calcio/idrossido di alluminio/ idrossido di magnesio/simeticone (Latte di magnesia)	0,25% p/v
Clisteri	Olio minerale	0,25% p/v
Antibiotico (topico)	Polimixina B/Neomicina/ Bacitracina (Neosporin)	0,25% p/v
Antimicotico/ Vaginale antiprurito	Nistatina	0,25% p/v
Antiacido	Famotidina (Pepcid)	0,25% p/v
Farmaci anti-diarrea	Loperamide cloridrato / bismuto subsalicilato (Pepto-Bismol)	0,25%, 0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,01% p/v
Unguento topico	Petrolato	0,25% p/v
Crema/unguenti contro le emorroidi	Fenilefrina (Preparation H)	0,25% p/v
Riduttore acido; antiacido	Omeprazolo (Prilosec)	0,25% p/v
Clisteri	Clistere con soluzione fisiologica	0,25% p/v
Antiacido	Cimetidina (Tagamet)	0,25% p/v
Vaginale antimicotica/antiprurito	Benzocaina, resorcinolo (Vagisil)	0,25% p/v
Salviettine antisettiche	Cloruro di benzalconio, etanolo (Salviettine Wet Ones)	1 salviettina ^b

a. Un preservativo aggiunto a matrice di tampone da 40 ml.

b. Un pezzo (12,7 cm x 19,1 cm) aggiunto alla matrice tampone da 40 ml.

18.6 Studio sulla contaminazione da carry-over

È stato condotto uno studio allo scopo di dimostrare che l'impiego delle cartucce chiuse monouso GeneXpert previene la contaminazione da carry-over nelle sessioni di campioni negativi, successive a sessioni con campioni caratterizzati da valori positivi molto elevati. Lo studio consisteva nel trattamento di un campione negativo all'interno dello stesso modulo GeneXpert subito dopo un campione positivo con valori molto elevati. Il campione positivo con valori molto elevati è composto di cellule inattivate di *E. coli* contenenti un plasmide con un inserto costituito da un oligonucleotide sintetico delle sequenze di ampliconi dai geni dei cinque bersagli (bersagli KPC, NDM, VIM, IMP e OXA-48) di Xpert Carba-R. Le cellule positive sono state diluite in una matrice di tamponi rettali e perirettali negativi combinati in pool a una concentrazione di 1×10^6 CFU/ml. Lo schema di analisi è stato ripetuto 25 volte su due moduli GeneXpert per un totale di 102 analisi (25 campioni positivi con valori molto elevati per modulo e 26 campioni negativi per modulo) per la matrice di tamponi rettali e perirettali. Tutti i 50 campioni positivi hanno riportato correttamente tutti i bersagli Xpert Carba-R come **RILEVATO (DETECTED)** e tutti i 52 campioni negativi hanno riportato correttamente tutti i bersagli Xpert Carba-R come **NON RILEVATO (NOT DETECTED)** per ciascun tipo di matrice testato.

19 Riproducibilità

19.1 Studio della matrice del tampone rettale e perirettale

La riproducibilità del saggio Xpert Carba-R è stata valutata utilizzando due pannelli di 11 campioni, uno preparato in matrice di tamponi rettali negativi combinati in pool e uno preparato in matrice di tamponi perirettali negativi combinati in pool. Due operatori presso ciascuno dei tre centri di studio hanno analizzato un pannello di 11 campioni in replicati di quattro al giorno per sei giorni di analisi (11 campioni x 2 replicati x 2 volte al giorno x 6 giorni x 2 operatori x 3 centri). In ciascuno dei 3 centri di analisi sono stati utilizzati tre lotti di cartucce del saggio Xpert Carba-R. Il saggio Xpert Carba-R è stato eseguito in base alla procedura prevista per il saggio Xpert Carba-R. I risultati sono riepilogati nella Tabella 26.

Tabella 26. Riepilogo dei risultati di riproducibilità – % concordanza, matrici di tamponi rettali e perirettali

Campione	Matrice ^a	Centro 1			Centro 2			Centro 3			% concordanza totale per campione
		Op 1	Op 2	Centro	Op 1	Op 2	Centro	Op 1	Op 2	Centro	
Neg	R	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
IMP Mod Pos	R	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
IMP Basso Pos	R	91,7% (22/24)	87,5% (21/24)	89,5% (43/48)	83,3% (20/24)	87,5% (21/24)	85,4% (41/48)	87,5% (21/24)	79,2% (19/24)	83,3% (40/48)	86,1% (124/144)
VIM Mod Pos	R	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
VIM Basso Pos	R	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
NDM Mod Pos	R	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
NDM Basso Pos	R	91,7% (22/24)	95,8% (23/24)	93,8% (45/48)	95,8% (23/24)	95,8% (23/24)	95,8% (46/48)	100% (24/24)	91,7% (22/24)	95,8% (46/48)	95,1% (137/144)
KPC Mod Pos	R	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
KPC Basso Pos	R	95,8% (23/24)	100% (24/24)	97,9% (47/48)	100% (24/24)	91,7% (22/24)	95,8% (46/48)	95,8% (23/24)	95,8% (23/24)	95,8% (46/48)	96,5% (139/144)
OXA-48 Mod Pos	R	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
OXA-48 Basso Pos	R	95,8% (23/24)	100% (24/24)	97,9% (47/48)	95,8% (23/24)	100% (24/24)	97,9% (47/48)	91,7% (22/24)	100% (24/24)	95,8% (46/48)	97,2% (140/144)
Neg	PR	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
IMP Mod Pos	PR	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
IMP Basso Pos	PR	95,8% (23/24)	91,7% (22/24)	93,8% (45/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	91,7% (22/24)	95,8% (46/48)	96,5% (139/144)
VIM Mod Pos	PR	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
VIM Basso Pos	PR	100% (24/24)	91,7% (22/24)	95,8% (46/48)	91,7% (22/24)	91,7% (22/24)	91,7% (44/48)	95,8% (23/24)	83,3% (20/24)	89,6% (43/48)	92,4% (133/144)
NDM Mod Pos	PR	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
NDM Basso Pos	PR	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	87,5% (21/24)	100% (24/24)	93,8% (45/48)	97,9% (141/144)
KPC Mod Pos	PR	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
KPC Basso Pos	PR	91,7% (22/24)	91,7% (22/24)	91,7% (44/48)	91,7% (22/24)	95,8% (23/24)	93,8% (45/48)	100% (24/24)	91,7% (22/24)	95,8% (46/48)	93,8% (135/144)
OXA-48 Mod Pos	PR	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
OXA-48 Basso Pos	PR	87,5% (21/24)	87,5% (21/24)	87,5% (42/48)	100% (24/24)	95,8% (23/24)	97,9% (47/48)	95,8% (23/24)	95,8% (23/24)	95,8% (46/48)	93,8% (135/144)

a. R = rettale, PR = perirettale

La riproducibilità del saggio Xpert Carba-R è stata inoltre valutata in termini di segnale di fluorescenza espresso in valori Ct per ciascun bersaglio rilevato. La media, la deviazione standard (DS) e il coefficiente di variazione (CV) tra i centri, tra i lotti, tra i giorni, tra gli operatori e all'interno dei saggi per ciascun elemento del pannello sono riportati nella Tabella 27.

Tabella 27. Riepilogo dei dati di riproducibilità, matrici dei tamponi rettali e perirettali

Campione	Matrice ^a	Canale del saggio (analita)	N ^b	Ct medio	Tra centri		Tra lotti		Tra giorni		Tra operatori		All'interno del saggio		Totale	
					DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)
Neg	R	SPC	144	32,9	0,2	0,5	0,2	0,7	0,0	0,1	0,0	0	0,6	1,8	0,7	2,0
IMP Mod Pos	R	IMP	144	34,5	0,0	0,0	0,2	0,5	0	0,0	0,1	0,2	0,7	2,0	0,7	2,1
IMP Basso Pos	R	IMP	140	36,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,5	0,0	0	1,2	3,3	1,2	3,4
VIM Mod Pos	R	VIM	144	31,0	0,0	0,0	0,3	0,9	0	0,0	0,2	0,5	0,5	1,6	0,6	1,9
VIM Basso Pos	R	VIM	144	33,8	0,0	0,0	0,6	1,8	0,3	0,9	0,3	1,0	1,4	4,0	1,6	4,6
NDM Mod Pos	R	NDM	144	33,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,6	1,7	0,6	1,7
NDM Basso Pos	R	NDM	143	36,2	0,2	0,7	0,0	0,0	0,3	0,7	0,0	0,0	0,8	2,3	0,9	2,5
KPC Mod Pos	R	KPC	144	34,2	0,0	0,0	0,3	0,8	0,2	0,6	0,0	0,0	0,4	1,2	0,6	1,6
KPC Basso Pos	R	KPC	141	35,8	0,0	0,0	0,5	1,5	0,0	0,0	0,3	0,9	0,7	1,9	0,9	2,6
OXA-48 Mod Pos	R	OXA-48	144	34,3	0,0	0,0	0,2	0,5	0,2	0,5	0,1	0,3	0,5	1,6	0,6	1,7
OXA-48 Basso Pos	R	OXA-48	143	36,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,6	0,0	0,0	0,8	2,3	0,9	2,4
Neg	PR	SPC	144	32,7	0,0	0,0	0,2	0,6	0,0	0,0	0,2	0,5	0,4	1,2	0,5	1,4
IMP Mod Pos	PR	IMP	144	33,7	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,2	0,5	0,5	1,5	0,5	1,6
IMP Basso Pos	PR	IMP	142	36,0	0,2	0,5	0,0	0,0	0,1	0,3	0,2	0,5	0,8	2,1	0,8	2,3
VIM Mod Pos	PR	VIM	144	31,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,0	0,1	0,2	0,5	0,4	1,3	0,5	1,5
VIM Basso Pos	PR	VIM	142	35,0	0,0	0,0	0,6	1,6	0,0	0,0	0,6	1,7	1,4	4,1	1,6	4,7
NDM Mod Pos	PR	NDM	144	33,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,5	0,2	0,5	0,4	1,2	0,5	1,4
NDM Basso Pos	PR	NDM	143	35,7	0,2	0,5	0,0	0,0	0,2	0,6	0,0	0,0	0,9	2,4	0,9	2,5
KPC Mod Pos	PR	KPC	144	34,6	0,0	0,0	0,3	1,0	0,0	0,0	0,2	0,5	0,4	1,3	0,6	1,7
KPC Basso Pos	PR	KPC	143	36,4	0,0	0,0	0,5	1,3	0,1	0,4	0,0	0,0	0,7	2,0	0,9	2,4
OXA-48 Mod Pos	PR	OXA-48	144	34,4	0,1	0,2	0,2	0,6	0,0	0,0	0,2	0,5	0,5	1,5	0,6	1,7
OXA-48 Basso Pos	PR	OXA-48	144	36,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	1,2	0,0	0,0	1,0	2,7	1,1	2,9

a. R = rettale, PR = perirettale

b. Risultati con valori Ct su 144 diversi da zero.

19.2 Studio sugli isolati batterici

La riproducibilità del saggio Xpert Carba-R è stata valutata utilizzando un pannello di 13 campioni di batteri che includevano: due diversi organismi per ciascuno dei cinque bersagli del gene di resistenza rilevati dal saggio Xpert Carba-R; due campioni di stock che includevano due bersagli genici; e un campione di stock negativo per tutti e cinque i bersagli genici. Due operatori in ciascuno dei tre centri di studio hanno testato un pannello di 13 campioni in replicati di quattro al giorno. Ciascun campione è stato utilizzato per realizzare due sospensioni equivalenti a 0,5 McFarland da cui sono stati testati due replicati in sei giorni di test (13 campioni x 2 replicati x 2 volte / giorno x 6 giorni x 2 operatori x 3 centri). In ciascuno dei 3 centri di analisi sono stati utilizzati tre lotti di cartucce del saggio Xpert Carba-R. Il saggio Xpert Carba-R è stato eseguito in base alla procedura del saggio Xpert Carba-R. Al termine del test, sono stati esclusi 25 test eseguiti su un modulo dello strumento con un totale di 1847 campioni inclusi nelle analisi. I risultati sono riepilogati nella Tabella 28.

Tabella 28. Riepilogo dei risultati di riproducibilità – Percentuale di concordanza, isolati batterici

Gene di resistenza (campione n.)	Centro 1			Centro 2			Centro 3			% concordanza totale per campione
	Op 1	Op 2	Centro	Op 1	Op 2	Centro	Op 1	Op 2	Centro	
KPC (1)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
KPC (2)	100% (23/23)	100% (22/22)	100% (45/45)	95,8% (23/24)	100% (24/24)	97,9% (47/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	99,3% (140/141)
VIM (1)	100% (22/22)	100% (23/23)	100% (45/45)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (141/141)
VIM (2)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (46/46)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (142/142)
IMP (1)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (47/47)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (143/143)
IMP (2)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (46/46)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (142/142)
OXA (1)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (46/46)	100% (24/24)	91,7% (22/24)	95,8% (46/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	98,6% (140/142)
OXA (2)	100% (23/23)	100% (22/22)	100% (45/45)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (141/141)
NDM (1)	100% (22/22)	100% (21/21)	100% (43/43)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (139/139)
NDM (2)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (46/46)	91,7% (22/24)	100% (24/24)	95,8% (46/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	98,6% (140/142)
OXA,NDM (1)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (47/47)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (143/143)
OXA,NDM (2)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (47/47)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (143/143)
NEG	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)

La riproducibilità del saggio Xpert Carba-R è stata inoltre valutata in termini di segnale di fluorescenza espresso in valori Ct per ciascun bersaglio rilevato. La media, la deviazione standard (DS) e il coefficiente di variazione (CV) tra i centri, tra i lotti, tra i giorni, tra gli operatori e all'interno dei saggi per ciascun elemento del pannello sono riportati nella Tabella 29.

Tabella 29. Riepilogo dei dati di riproducibilità - Isolati batterici

Gene di resistenza (Campione n.)	Canale del saggio (analita)	N ^a	Tra centri		Tra lotti		Tra giorni		Tra operatori		All'interno del saggio		Totale	
			DS	CV	DS	CV	DS	CV	DS	CV	DS	CV	DS	CV
KPC (1)	KPC	144	1,1	4,4	0	0	0	0	0,6	2,6	0,6	2,6	1,4	5,8
KPC (2)	KPC	143	0,8	3,1	0,1	0,2	0,2	0,9	0,5	2,0	0,8	3,1	1,2	4,9
VIM (1)	VIM	141	1,1	5,1	0	0	0	0	0,5	2,3	0,8	3,7	1,5	6,7
VIM (2)	VIM	142	0,3	1,3	0,2	0,8	0	0	0,8	3,8	0,7	3,1	1,1	5,1
IMP (1)	IMP	143	0,3	1,0	0	0	0,3	1,2	0,6	2,3	0,8	3,1	1,0	4,2
IMP (2)	IMP	142	1,4	6,3	0,1	0,5	0	0	0,6	2,8	0,7	3,2	1,7	7,6
OXA (1)	OXA48	140	0,6	2,6	0	0	0	0	0,7	2,8	0,8	3,5	1,2	5,2
OXA (2)	OXA48	141	1,1	4,9	0,3	1,5	0	0	0,5	2,0	0,7	3,3	1,5	6,4
NDM (1)	NDM	139	1,2	5,3	0	0	0	0	0,6	2,4	0,7	3,1	1,5	6,6
NDM (2)	NDM	140	0,9	4,0	0,3	1,4	0	0	0,8	3,3	0,8	3,3	1,5	6,3
NDM/OXA (1)	NDM	143	1,3	5,4	0,2	0,8	0	0	0,6	2,5	0,7	3,1	1,6	6,8
	OXA48	143	1,2	6,2	0,3	1,4	0	0	0,5	2,4	0,7	3,7	1,5	7,7
NDM/OXA (2)	NDM	143	1,2	5,3	0,2	1,1	0	0	0,5	2,4	0,8	3,5	1,6	6,9
	OXA48	143	1,2	6,0	0,2	1,2	0	0	0,5	2,5	0,7	3,8	1,5	7,6
NEG	SPC	144	0,1	0,3	0,1	0,3	0	0	0,2	0,5	0,4	1,3	0,5	1,5

a. Risultati con valori Ct su 144 diversi da zero.

20 Riferimenti bibliografici

1. Kallen AJ, et al. 2010. Current epidemiology of multidrug-resistant gram-negative bacilli in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 31 Suppl 1: S51–54.
2. Nordmann P, et al. 2012. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a call for action! *Clin Microbiol Infect.* 18: 411–412.
3. Cornaglia G, et al. 2011. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis.* 11: 381–393.
4. Kitchel B, et al. 2009. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in the United States: Clonal expansion of MLST sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:3365–3370.
5. Schwaber MJ, et al. 2011. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin Infect Dis.* 52: 848–855.
6. Kumarasamy KK, et al. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 10: 597–602.
7. Cuzon G, et al. 2008. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 3463–3464.
8. Nordmann P, et al. 2011. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 17: 1791–1798.
9. Grundmann H, et al. 2010. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill.* 15:1-13.
10. van Duin D, et al. 2016. Ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam: second-generation β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. *Clin Infect Dis.* 63(2):234-241.
11. Falcone M, Paterson D. 2016. Spotlight on ceftazidime/avibactam: a new option for MDR gram-negative infections. *J Antimicrob.* 71(10):2713-2722.
12. Navas, M and Jacobs M. 2016. Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* - A review for laboratorians. American Association for Clinical Chemistry (AACC) Clinical Laboratory News.
13. Vasoo S, et al. 2015. In vitro activities of ceftazidime-avibactam, aztreonam-avibactam, and a panel of older and contemporary antimicrobial agents against carbapenemase-producing gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(12):7842-7846.
14. Avycaz package insert. Section 14.2 Microbiology.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical laboratories (refer to latest edition). <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>
16. Centers for Disease Control and Prevention. Accessed January 20, 2016. Healthcare-associated Infections (HAIs). <http://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/cre-facilities.html>
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
18. REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on the classification labeling and packaging of substances and mixtures amending and repealing, List of Precautionary Statements, Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC (amending Regulation (EC) No 1907/2007).
19. Occupational Safety and Health Standards, Hazard Communication, Toxic and Hazard Substances (March 26, 2012) (29 C.F.R., pt. 1910, subpt. Z).
20. CLSI M100. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA (refer to latest edition).
21. CLSI M07-A10. 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically; Tenth Edition, CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA.
22. CLSI M100-S24. 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Edition, CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA.
23. CLSI M07-A9. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically; Ninth Edition, CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA.

21 Ubicazione delle sedi centrali Cepheid

Sede centrale globale

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
Stati Uniti
Telefono: + 1 408 541 4191
Fax: + 1 408 541 4192
www.cepheid.com

Sede centrale europea

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francia
Telefono: + 33 563 825 300
Fax: + 33 563 825 301
www.cepheidinternational.com

22 Assistenza Tecnica

Prima di contattare l'Assistenza Tecnica di Cepheid, raccogliere le seguenti informazioni:

- Nome del prodotto
- Numero di lotto
- Numero di serie dello strumento
- Messaggi di errore (se presenti)
- Versione del software e, se pertinente, codice riportato sull'etichetta di servizio (Service Tag) del computer

Informazioni di contatto

Stati Uniti
Telefono: + 1 888 838 3222
E-mail: techsupport@cepheid.com

Francia
Telefono: + 33 563 825 319
E-mail: support@cepheideurope.com

Le informazioni di contatto di tutti gli uffici di Assistenza Tecnica di Cepheid sono disponibili nel sito:
www.cepheid.com/en/CustomerSupport.

23 Tabella dei simboli

Simbolo	Significato
	Numero di catalogo
	Dispositivo medico per uso diagnostico <i>in vitro</i>
	Non riutilizzare
	Rappresentante autorizzato nell'Unione Europea
	Rappresentante autorizzato in Svizzera
	Importatore
	Codice lotto
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Attenzione
	Produttore
	Paese di produzione
	Contenuto sufficiente per <n> test
	Controllo
	Data di scadenza
	Limiti di temperatura
	Rischi biologici
	Attenzione
	Marchio CE - Conformità europea



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA
Telefono: + 1 408 541 4191
Fax: + 1 408 541 4192



Cepheid Europe S.A.S.
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francia
Tel.: + 33 563 825 300
Fax: + 33 563 825 301



Cepheid Switzerland GmbH
Zürcherstrasse 66
Postfach 124, Thalwil
CH-8800
Switzerland



Cepheid Switzerland GmbH
Zürcherstrasse 66
Postfach 124, Thalwil
CH-8800
Switzerland



