

EuSepScreen Lattanti

Test for the determination of bacterial DNA from biological samples

For *in vitro* diagnostic use only

Intended use

The Kit EuSepScreen Lattanti from Eurospital makes use of the Real Time PCR amplification to determine any presence of bacterial DNA belonging to all serotypes of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus B* o GBS) and *Listeria monocytogenes* in infants' biological samples such as blood, cerebrospinal fluid, pleural and synovial fluid or any other normally sterile human biological fluid or material.

Background

Neonatal sepsis remains one of the main causes of morbidity and mortality among both term and preterm infants (1). The World Health Organization (WHO) reports that more than a third of the nearly four million worldwide neonatal deaths per year are caused by serious infections, and a quarter, about one million deaths, are due to sepsis neonatal / pneumonia (2; WHO, www.who.int). Based on the timing of infection, neonatal sepsis was classified into early onset sepsis (EOS) and late onset sepsis (LOS).

This classification helps to guide antibiotic therapy as it implies differences in presumed transmission mode and predominant organisms.

EOS is defined as sepsis in the first 3 days of a new born's life and is mainly the result of vertical transmission of bacteria from mother to infant during the intrapartum period (3-4). The most frequent microorganisms in EOS are *S. agalactiae* (*Streptococcus B* o GBS) and *E. coli*, counting for about 70% of combined infections (4). Other pathogenic agents to be considered, which represent the rest of the cases, are other streptococci, most commonly *viridians* but also *S. pneumoniae* and *S. aureus*, gram-negative enteric bacilli as *H. influenzae* (practically all non-typable *Haemophilus spp* in the age of the vaccine for *H. influenzae b* [Hib]) and *L. monocytogenes* (5-7-4).

LOS is defined as an infection that occurs after the first week of a new-born life and is attributed to the horizontal transmission of pathogens acquired after birth and often the onset is even more insidious (6). Among the bacteria responsible for late-onset sepsis, *S. agalactiae* and *E. coli* play a decisive role, the importance of *Klebsiella spp.*, especially *K. pneumoniae*, is increasing, mainly due to the increasing antimicrobial resistance that these species are developing (8).

Although, advances in neonatal care have improved survival and reduced complications, accurate diagnosis of neonatal sepsis remains difficult because the signs and symptoms of the new-born may be subtle, often mimicking other medical conditions that occur frequently in the new-born (fever, hypothermia, apnoea, lethargy or irritability, and much more) (9). However, although the onset of the disease is often unspecific, the clinical course may be fulminant, leading to septic shock, intravascular coagulation, and death within a few hours of initial clinical symptoms (10).

In this scenario, rapid and correct diagnosis accompanied by immediate treatment is an important factor in reducing neonatal sepsis mortality.

At present, positive bacterial sepsis diagnosis is still dependent on microbiological tests based on blood culture techniques that normally require 12 to 24 hours of incubation for gram-negative organisms (i.e. *E. coli*) or 24 to 48 hours for Gram-positive organisms (i.e. *S. agalactiae*), with additional time required for microorganism isolation and complete identification (11-12). Although microbiological blood culture is still considered the *gold standard* in the diagnosis of neonatal sepsis, its sensitivity is unacceptably low (11).

For this reason, the most sensitive new molecular techniques, such as Real Time PCR (RT-PCR), are increasingly used to diagnose a wide range of infectious diseases (13-14).

RT-PCR is a fast technique and can detect bacteria directly from blood samples (14) even in very low sample sizes (such as blood or liquor collected from infants). Furthermore, since RT-PCR is based on DNA detection, it does not require vital bacteria, so it can be considered a valuable aid to cultural methods, especially when antimicrobial treatment has already begun (15-16).

Principle of the method

The *E. coli*, *S. agalactiae* and *L. monocytogenes* pathogens have been selected for the EuSepScreen Lattanti kit among all those that cause invasive bacterial diseases because in Italy these bacteria are under continuous health surveillance of the *Istituto Superiore di Sanità*, which periodically publishes epidemiologic data and their incidence (<http://www.iss.it>; last report published on 3rd April 2017). *K. pneumoniae* was also included in the kit first for its role in infant infections (11) but also for its emergent presence in neonatal and adult intensive care units (outbreaks) (17-19). The EuSepScreen Lattanti kit was designed to achieve the highest sensitivity and specificity in the majority of invasive bacterial diseases (meningitis, sepsis, pneumonia, etc.) in infants using directly biological samples such as blood, liquor or CSF, pleural fluid, synovial fluid or any other human normal liquid or biological material.

Supplied materials

(quantity sufficient for 8 tests)

Reagent A	1 x 1.6 ml
Reagent B	1 x 1.5 ml
Reagent C	1 x 0.5 ml
Positive control (lyophilized)	1 x 0.4 ml
Mix 1 (blue test tube)	1 strip x 8 test tubes
Mix 2 (yellow test tube)	1 strip x 8 test tubes
Mix 3 (clear test tube)	1 strip x 8 test tubes

Composition of the supplied materials/reagents

1. Reagent A

1 Eppendorf vial, purple cap, containing 1.6 ml Master Mix for RT-PCR. Ready to use.

2. Reagent B

1 Eppendorf vial, green cap, containing 1.5 ml Master Mix diluent. Ready to use.

3. Reagent C

Water for control reconstitution.

1 Eppendorf vial containing 0.5 ml sterile water to be used for positive control reconstitution.

4. Positive control

1 vial, yellow cap, containing reactive DNA for all mixes. Lyophilised, to be dissolved upon first usage.

5. Mix 1

1 strip with 8 blue test-tubes sealed by aluminium foil. Each test tube contains, in dried form, the detection system for the determination of *K. pneumoniae* and *E. coli*.

Warning: avoid direct exposure to light.

6. Mix 2

1 strip with 8 yellow test-tubes sealed by aluminium foil. Each test tube contains, in dried form, the detection system for the determination of *S. agalactiae* and *L. monocytogenes*.
Warning: avoid direct exposure to light.

7. Mix 3

1 strip with 8 clear test-tubes sealed by aluminium foil. Each test tube contains, in dried form, the human genomic DNA detection system.

Warning: avoid direct exposure to light.

Required, but not supplied, instruments and materials

- 5, 20, 100, 200, 500 µl pipettes
- Disposable sterile tips with filter, 5, 20, 100, 200, 500 µl pipettes
- Vortex
- Microcentrifuge for test tubes
- Rotor centrifuge for microplates
- Amplifier with 520 and 550 nm reading filters
- 0.2 ml test tubes with optical grade caps
- Optical grade microplates
- 0.2 ml test tube holder

Performance criteria

The system, with the use of the hydrolysis probes, allows the identification of bacterial DNA of *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. agalactiae* and *L. monocytogenes* in a biological sample after the nucleic acid extraction process.

The following target genes were identified for the individual pathogens:

- K. pneumoniae* - **phoE** gene (outer membrane phosphoprotein E)
- E. coli* - **uidB** gene (glucuronide transporter)
- S. agalactiae* **sip** gene (streptococcal surface immunogenic protein)
- L. monocytogenes* - **iap** gene (invasion associated protein).

The target genes used to ensure 100% specificity to the test. Using these gene sequences as target amplification, it's possible to identify the following serotypes:

- K. pneumoniae* - all different serotypes
- E. coli* - all different serotypes
- S. agalactiae* - all different serotypes
- L. monocytogenes* - serotypes that cause meningitis.

Sample collection

The EuSepScreen Lattanti kit requires the use of biological

samples such as blood, liquor, pleural fluid, synovial liquid or any other normally sterile human liquid or biological material. The sample consists of DNA extracted from these samples using the most common methods of nucleic acids extracting both manual and automatic. For the manual method the recommended product is Eu-Gen Extraction kit (cat. 9132).

Analytical specificity

To verify the specificity of the EuSepScreen Lattanti formula mix, the three detection mixes for *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. Agalactiae*, *L. monocytogenes* and beta globin were tested on bacterial, viral and human genomic DNA. Tested pathogens belong to the species detectable by the EuSepScreen Eurospital kits (cat. 9144, 9145, 9149, 9345, 9148 and 9146) such as *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae*, *E. coli*, *H. influenzae type b*, *H. influenzae* not capsulated; *H. aegyptius*, *H. haemolyticus* and other species such as *S. piogenes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. parainfluenza* and *H. aphrophilus* and Adenovirus.

Cross-tests with all mixes of the EuSepScreen Lattanti kit (cat. 9144-9148-9146) and EuSepScreen Plus (cat. 9345-9149-9147) confirmed that the mixes are 100% specific.

Diagnostic sensitivity

40 DNA samples extracted from biological samples, already characterized by a reference centre, were tested by this method. The results obtained with EuSepScreen showed a sensitivity and specificity of 100%.

Analytical sensitivity

For every single pathogen, an analytical sensitivity was defined in terms of a number of DNA copies detected in the reaction volume, using plasmids that contain target genes for individual microorganisms in their sequence. The definition of sensitivity refers to the positivity detected in duplicate for each individual pathogen within the same session and between different sessions. Each of the blends amplified the duplicate 2 copies / μ l (10 copies / PCR) DNA with average Ct values showing a CV less than 5%, so the analytical sensitivity for all pathogens detected in the EuSepScreen Lattanti kit equals to **10 copies / PCR**.

Storage

All kit components must be stored at 2 - 8°C. Mixes shall be stored away from light.

Stability after the first opening

All components, if used according to the instructions given in the "General warnings" section, are stable until the date printed on the label.

Stability in transport

An accelerated stability study has shown that all the kit components are stable after being stored at 37°C for 96 hours.

Sample storage

If not immediately submitted to amplification, the purified DNA can be stored at 2-8°C for 3 months, or at -20°C for longer periods: in this case, it is advisable to divide it into aliquots so to avoid repeated freezing/thawing cycles that deteriorate the DNA. A new use of the DNA stored at -20°C has been checked by Eurospital only by using the Eu-Gen Extraction kit reagent (cat. 9132). The use of other extraction kits requires to check the relevant procedure by the laboratory in order to assess the stability and storage conditions of the extracted DNA.

Positive Control resuspension

Upon the first use, briefly centrifuge the Positive Control vial. By using sterile tips only, add 0.4 ml of water for control reconstitution (Reagent C). Vortex with a mechanical agitator for at least 15 seconds to achieve an appropriate resuspension of the material contained in the control test tube.

Briefly centrifuge the vial to remove the drops on the walls and under the cap. The resuspended Positive Control is ready for use. The stability remains as printed on the label.

DNA Amplification Procedure

1. For each sample to be tested, cut out 1 test tube from each colored strip of 8 tubes (**Mix 1 Blue**, **Mix 2 Yellow**, **Mix 3 Transparent**);
2. Using the tip perforate the sealing aluminum foil and add 37.5 μ l of **reagent B (vial with green cap)** to each mix. Pipette a couple of times to resuspend the pellet attached to the bottom;
3. **Only for cat. 9144:** add 62.5 μ l of **reagent A (vial with purple cap)** to each mix and pipette a couple of times to make the solution homogeneous.
4. The 3 mixes are ready for use;
5. Dispense 20 μ l of each mix in 4 test tubes (if strips are used) or in 4 wells (if plates are used) as shown in the

diagram below:

	1	2	3
A	Mix 1	Mix 2	Mix 3
B	Mix 1	Mix 2	Mix 3
C	Mix 1	Mix 2	Mix 3
D	Mix 1	Mix 2	Mix 3

6. For each mix, perform the following actions, according to the table below:

- Do not add anything in the test tubes of line A (negative reaction control, no template control or NTC);
- Add 5 µl of extracted samples into the test tubes of lines B and C and pipet a couple of times to mix the solution (sample S1);
- Add 5 µl of Positive Control in line D tubes and pipet a couple of times to mix the solution (Positive Control, C+);

	1	2	3
A	Mix 1 NTC	Mix 2 NTC	Mix 3 NTC
B	Mix 1 S1	Mix 2 S1	Mix 3 S1
C	Mix 1 S1	Mix 2 S1	Mix 3 S1
D	Mix 1 C+	Mix 2 C+	Mix 3 C+

- Close the test tubes with adhesive sheets or optic caps;
- Shortly spin the microplate (or strips if using this support) to remove any bubbles from the amplification mixture;
- Follow the manual of the suggested Real Time thermal cyclers and set the fluorophores for each pathogen according to the following scheme:

	Target	Reporter	Quencer	Passive Reference
Mix 1	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i>	FAM	TAMRA	ROX
		JOE	TAMRA	ROX
Mix 2	<i>S. agalactiae</i> <i>L. monocytogenes</i>	FAM	TAMRA	ROX
		JOE	TAMRA	ROX
Mix 3	beta globin (#)	FAM	TAMRA	ROX

(#) Set only the FAM fluorophore on the wells containing the beta globin Mix3.

- Set the reaction volume to 25 µl;
- Set the following thermal protocol and set the optical

reading of the instrument in step 4 (yellow);

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
1	50°C	2 min.	1
2	95°C	10 min.	1
3	95°C	15 sec.	45
4	60°C	1 min.	

FAST Protocol

The EuSepScreen kit was also validated for the FAST method but only with the Taq Fast Advance Applied Biosystems (cat. 4444557) on the AB7500 Fast thermocycler.

If you wish to proceed with this protocol, please follow the instructions below:

- the reaction volumes do not vary with respect to the traditional method;
- use only microplates compatible with the equipment used;
- use * TaqMan FAST ADVANCED MMIX 2X Applied Biosystems (cat. 4444557) as Reagent A;
- set the reaction volume to 25 µl;
- set the following thermal protocol and set the optical reading of the instrument in step number 4 (yellow step);

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
1	50°C	2 min.	1
2	95°C	20 sec.	1
3	95°C	3 sec.	45
4	60°C	30 sec.	

(*) **TaqMan FAST ADVANCED MMIX 2X Applied Biosystem** must be stored at -20° C until first use; follow the instructions on the label.

Validation of the expected results

- Verify that for each mix the signals obtained for the NTC control are negative for both selected fluorophores (FAM and JOE).
- Verify that the signals, read on the FAM channel, obtained with **Mix 3** (beta globin) in both wells containing the sample to be tested (S1) are positive;

Note: the positivity obtained in the **Mix 3** with the sample indicates a correct execution of the nucleic acid extraction procedure and of the presence of genomic material in the starting biological sample.

- Verify that, for each mix, the signals obtained with C+ are **always** positive for both the set fluorophors (FAM and JOE) as indicated in gray in the tables below;
- Verify that for **Mix 1** and **Mix 2** the signals obtained in the two tubes containing the sample to be tested (S1) in doublet agree: both positive or both negative for the set reading filter.

If at least one of the above conditions does not occur, the test must be repeated. These data should however be compared with the patient's clinical picture and with the result of any related test.

Warning: Due to the presence of genetic material from *E. coli* in solutions containing Reagent A, low fluorescence signals may be detected in the **Mix 1** tubes of the EuSepScreen Lattanti kit reading at 550 nm (JOE channel). Inside the kit there is a CQ data sheet containing the Ct values imputable to the *E. coli* contamination of the Taq Polymerase (Reagent A) included in the kit.

Interpretation of results

Set the auto-baseline from cycle 3 to cycle 15. Define the manual threshold for each single selected fluorophore. The positivity obtained in Mix 3 with the sample indicates a correct execution of the nucleic acid extraction procedure and of the presence of genomic material in the starting biological sample. For Mixes 1 and 2, in the wells S1, the presence of a signal for the set reading filters is an indication of the presence in that sample of genetic material belonging to the pathogen agent according to the following scheme:

MIX 1			
Sample	Detector		Results
	FAM	JOE	
S1	positive	negative	Presence of <i>K. pneumoniae</i>
S1	negative	positive	Presence of <i>E. coli</i>
S1	positive	positive	Co presence of <i>K. pneumoniae</i> and <i>E. coli</i>
S1	negative	negative	Absence of <i>K. pneumoniae</i> and <i>E. coli</i>
C+ (*)	positive		Correct amplification of <i>K. pneumoniae</i> and <i>E. coli</i> controls
C+	negative		INVALID

MIX 2			
Sample	Detector		Results
	FAM	JOE	
S1	positive	negative	Presence of <i>S. agalactiae</i>
S1	negative	positive	Presence of <i>L. monocytogenes</i>
S1	positive	positive	Co presence of <i>S. agalactiae</i> and <i>L. monocytogenes</i>
S1	negative	negative	Absence of <i>S. agalactiae</i> and <i>L. monocytogenes</i>
C+ (*)	positive		Correct amplification of <i>S. agalactiae</i> and <i>L. monocytogenes</i> controls
C+	negative		INVALID

MIX 3			
Sample	Detector		Results
	FAM		
S1	positive		Presence of genomic DNA. Correct extraction procedure.
S1	negative		Absence of genomic DNA. Invalid test or DNA concentration in the sample, lower than system sensitivity limit.
C+ (*)	positive		Correct amplification of beta globin control
C+	negative		INVALID

Note(*): The C + must ALWAYS result positive for the set fluorophores in every performed session. It is advisable to always check the raw fluorescence values (called component in Applied Biosystems instruments) of the signals detected for the individual fluorophores in the sample reaction wells (see chapter Troubleshooting - false positives).

Lower detection limit

Recent literature data on the use of the Real Time PCR technique for the identification of pathogens involved in

invasive bacterial diseases, such as those identified by the EuSepScreen kits, indicate Ct values of 39-40 as the lower limit of detection, since Ct higher than 39 may not be distinguishable from accidental events or uncontrollable environmental contaminations and may be unreliable (20-21). For the pathogen *K. pneumoniae* alone, whose worldwide (22,23) and Italian (24,25) diffusion has significantly increased in the last years, both in the medical-hospital environments (23) and in the community (24), the lower detection limit is of Ct equal to 38.

It is however suggested to interpret the doubtful results obtained with EuSepScreen Lattanti using the patient's clinical picture and the results of any other related test.

Literature data concerning this topic are available at the laboratories of Eurospital S.p.A.

Precautions and warnings

1. Always wait for the reagents to reach room temperature before starting the test.
2. Scrupulously comply with the procedural recommendations. In case of accident or illness, immediately call a doctor and show him the container, the label and, if possible, the safety data sheet.
3. Warning: it is very important not to exchange the components of different lots.
4. If you do not operate under the hood, always use a protective mask to avoid contamination of the tubes.
5. It is advisable to operate in distinct and well-defined environments for sample preparation (extraction), reagent preparation and amplification steps.
6. Mixes 1, 2 and 3 contain specific DNA sequences, substances whose hazard is not completely tested.
7. Always use sterile tips with filters.
8. Adopt all precautions to avoid reagent contamination.
9. Keep mixes contained in the aluminium minigrip bags away from light.
10. Once the required number of test tubes has been taken, immediately put the rest of the strip back into the aluminium minigrip bag. Make sure that the desiccant is inside it.
11. Do not touch the tips with your hands. Always wear protective gloves to avoid contamination of reagents.
12. Use only test tubes, caps or adhesive foils of optical grade.
13. Do not mix components belonging to different lots.
14. The waste materials generated by the use of the kit must be disposed of and treated according to national

directives and laws dealing with the treatment of laboratory wastes coming from chemical and biological substances. Special attention must, therefore, be given to laboratory liquid wastes, generated during the extraction procedures, and other waste materials (e.g. pipette tips used for the samples) used with the kit, which must be treated as potentially infectious materials and inactivated before disposal.

15. Avoid contact between the waste materials and bleach.
16. After successful amplification, remove the tubes or plates containing the amplified material without ever opening them.
17. The mix contains specific DNA sequences, substances which dangerousness is not completely tested.
18. The EuSepScreen Lattanti kit must not be used for purposes other than those listed in the "intended use" and repeated in the "Performance criteria".

Recommended Thermal Cyclers

Recommended thermal cyclers are listed below:

- AB 7300/7500 Real Time PCR System
- AB 7500 FAST/7500 FAST Dx Real Time PCR System
- AB Step One e Step One Plus Realtime PCR System
- Bio-Rad CFX Touch e Connect
- Eppendorf RealPlex
- Qiagen Rotor-Gene 3000/6000

Limits of the test

1. The EuSepScreen Lattanti kit was optimized using the extraction reagents of the Eu-Gen Extraction kit (cat. 9132). The use of other extraction kits must be validated by the laboratory following the relative protocol, with regards to the extraction efficiency, stability and storage conditions of the extracted DNA. False negative results may occur if the extracted bacterial DNA concentration is lower than the limit of detection and/or for the eventual presence of inhibitors.

The table below describes the data of the diagnostic sensitivity of the EuSepScreen line kits on the most prevalent pathogens causing bacterial meningitis in Europe (26; 27) and in the USA (HYPERLINK "<http://www.cdc.gov/meningitidis/bacterial.html>" www.cdc.gov/meningitidis/bacterial.html) such as *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* and *L. monocytogenes*. These data derived from the automatic extraction (NUCLISENS easyMAG, Biomerieux) from 10 times serial dilution of bacterial DNA from the mentioned pathogens (Sambri and Cavrini; internal data).

Pathogen	Diagnostic sensitivity
<i>N. meningitidis</i> serogroup b	7.5x10 bacteria/ml
<i>S. pneumoniae</i> (serogroup 23F)	3.2x10 bacteria/ml
<i>H. influenzae</i> (type b)	1x10 bacteria/ml
<i>L. monocytogenes</i> (type 4)	4x10 ³ bacteria/ml
<i>L. monocytogenes</i> (type 1)	8.5x10 ³ bacteria/ml

- It is recommended to use DNA immediately after extraction from blood. The purified DNA, if not immediately subjected to amplification, can be stored at 2-8° C for 3 months, or at -20° C for longer times: in this case it is advisable to divide it into aliquots in order to avoid repeated freezing/thawing cycles that may degrade it. No data are available on the performance of EuSepScreen Lattanti with DNA samples stored for longer periods and extracted with systems other than those indicated.
- Due to the continuous updating of the nucleotide sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and due to the natural process of gene mutation and adaptation established by bacteria for their survival over time (28) the detection of pathogens included in EuSepScreen Lattanti, on sequences not covered, may occur below the detection limit of the kit and/or with low efficiency.
- The results obtained with EuSepScreen Lattanti must always be evaluated and compared using patients clinical picture and the results of any other related test.**

Troubleshooting

No signal detected

- Improper detection filter setting and/or selection.
- Reagents not correctly pipetted or missing.
- Inhibitors effects due to the sample: inadequate extraction procedure or/and poor extraction DNA yield, improper anticoagulant for the sample because not suitable for a PCR amplification test (heparin).
- Kit stored incorrectly.
- Check the thermal cycler performance.

The signal intensity is too low.

- Deterioration of the detection system owing to incorrect reagent handling and/or storage.
- Very low DNA concentration in the sample to be analyzed.

- Incorrect mix resuspension.
- Air bubbles trapped inside the amplification test tubes.
- Presence of genetic mutations not considered

False positive results

- DNA samples extracted, for the most part, using a method with magnetic beads, may in rare cases interfere with the kit reagents (Reagent A, master mix). These interferences create positive signals on the FAM channel in wells that should be negative, giving a linear-looking graph (instead of a typical exponential profile expected for a positive Real Time PCR); the threshold intersecting graph defines the Ct value.

If this event occurs, check the raw fluorescence signal recorded by the instrument (called the *component* on Applied Biosystems instruments), in the well / sample, that should be altered, but not attributable to an exponential trend, for the FAM and any passive reference (ROX) used. If this is the case, the result is to be considered a false positive.

- High positive signal intensities on the FAM channel can create false positive results on the JOE channel due to a proportional decrease of the passive fluorophore ROX (ROX DROP); when this happens on the Amplification Plot screen a graph is created for JOE parallel to the one generated by the FAM, but of lower intensity that, crossing the threshold can determine a detectable Ct value.

Also in this case check the raw fluorescence signal recorded by the instrument for FAM and JOE, making sure there is indeed an exponential growth index of bacterial DNA amplification / presence. If this signal exists for FAM and not for the JOE, the Ct for the detected pathogen with the JOE is to be considered a false positive.

False negative results

Negative results can occur due to:

- Low bacterial DNA concentration or very close to the limit of detection;
- Presence of inhibitors persisting after the extraction procedure;
- Errors in the test preparation;
- The presence of samples which are known to be difficult to handle and with low bacterial DNA load. This is the case of *L. monocytogenes*, which is an intracellular pathogen and its DNA isolation from the cerebrospinal fluid (CSF) is difficult to perform, first because the volume of CSF obtained is often very low and second because, when obtained, it has a very low yield of DNA (29-31).

EuSepScreen Lattanti

Test per la determinazione di DNA batterico in campioni biologici

Per uso diagnostico *in vitro*

Destinazione d'uso

Il Kit EuSepScreen Lattanti di Eurospital viene usato per determinare, mediante amplificazione in Real Time PCR, la presenza o meno in campioni biologici quali sangue, liquor, liquido pleurico, liquido sinoviale o qualunque altro liquido o materiale biologico umano di neonati normalmente sterile, di DNA batterico appartenente a tutti i sierogruppi di *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* (Streptococco B o GBS) e *Listeria monocytogenes*.

Contesto

La sepsi neonatale rimane una delle principali cause di morbilità e mortalità nei neonati sia a termine che pretermine (1). L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) riferisce che, più di un terzo dei circa quattro milioni di morti neonatali in tutto il mondo ogni anno, sono causati da infezioni gravi, e un quarto, circa un milione di morti, sono dovuti a sepsi neonatale/polmonite (2; WHO, HYPERLINK "<http://www.who.int>"). Sulla base della tempistica dell'infezione la sepsi neonatale è stata classificata in: sepsi ad insorgenza precoce (*early onset sepsis*, EOS) e sepsi ad insorgenza tardiva (*late onset sepsis*, LOS). Questa classificazione aiuta a guidare la terapia antibiotica in quanto implica differenze nelle presunte modalità di trasmissione e degli organismi predominanti.

EOS è definita come sepsi nei primi 3 giorni di vita di un neonato ed è principalmente il risultato della trasmissione verticale di batteri dalla madre al neonato durante il periodo intra-partum (3-4). I microrganismi più frequenti nelle EOS sono lo *S. agalactiae* (Gruppo B *Streptococcus* o GBS) e *E. coli*, che rappresentano circa il 70% delle infezioni combinate (4). Ulteriori agenti patogeni da considerare, che rappresentano il resto dei casi, sono altri streptococchi, più comunemente *viridians*, ma anche *S. pneumoniae* e *S. aureus*, bacilli enterici Gram-negativi come *H. influenzae* (praticamente tutti gli *Haemophilus spp* non tipizzabili nell'era del vaccino per *IH. influenzae b* [*Hib*]) e la *L. monocytogenes* (5-7-4). LOS viene definita come un'infezione che si verifica dopo una

settimana di vita di un neonato ed è attribuita alla trasmissione orizzontale di patogeni acquisiti dopo la nascita e spesso l'insorgenza è ancora più insidiosa (6). Tra i batteri responsabili della sepsi con esordio tardivo, lo *S. agalactiae* e *E. coli* hanno comunque un ruolo decisivo ma sta aumentando l'importanza di *Klebsiella spp.*, in special modo della *K. pneumoniae*, principalmente per le crescenti resistenze antimicrobiche che queste specie stanno sviluppando (8). Anche se i progressi nella cura neonatale hanno migliorato la sopravvivenza e ridotto le complicanze, la diagnosi accurata della sepsi neonatale rimane ancora difficile perché i segni ed i sintomi del bambino possono essere subdoli, spesso imitando altre condizioni mediche che si verificano di frequente nel neonato (febbre, ipotermia, apnea, letargia o irritabilità, e molto altro ancora) (9). Tuttavia, anche se l'insorgenza della malattia è spesso aspecifica, il decorso clinico può essere fulminante, portando a shock settico, coagulazione intravascolare disseminata e la morte in poche ore dai sintomi clinici iniziali (10).

In questo scenario una diagnosi rapida e corretta accompagnata da un trattamento immediato è un fattore importante nella riduzione della mortalità da sepsi neonatale. Attualmente, la diagnosi positiva per sepsi batterica dipende ancora da test microbiologici basati su tecniche di coltura del sangue che, normalmente, prevedono da 12 a 24 ore di incubazione per gli organismi gram-negativi (ad es: *E. coli*) o da 24 a 48 ore per organismi gram-positivi (es: *S. agalactiae*), con il tempo supplementare necessario per l'isolamento del microrganismo e la sua identificazione completa (11-12). Anche se la cultura microbiologica da sangue è ancora considerata il *gold standard* nella diagnosi di sepsi neonatale, la sua sensibilità è inaccettabilmente bassa (11); per questo motivo le nuove tecniche molecolari più sensibili, come la Real Time PCR (RT-PCR) vengono sempre più spesso utilizzate per diagnosticare una vasta gamma di malattie infettive (13-14). La RT-PCR è una tecnica rapida da eseguire ed è in grado di rilevare i batteri direttamente da campioni di sangue (14) anche in quantità molto basse di campione (come il sangue o liquor campionati da neonati); inoltre, poiché la RT-PCR si basa sulla rilevazione del DNA, non richiede batteri vitali quindi può essere considerata un valido aiuto ai metodi culturali, soprattutto quando è già iniziato il trattamento antimicrobico (15-16).

Principio del metodo

I patogeni *E. coli*, *S. agalactiae* e *L. monocytogenes* sono stati scelti per il kit EusepScreen Lattanti tra tutti quelli che causano malattie batteriche invasive perché, in Italia, questi batteri sono sotto continua sorveglianza sanitaria dell'Istituto Superiore di Sanità, che periodicamente pubblica i dati epidemiologici sulla loro incidenza (<http://www.iss.it>; ultimo rapporto pubblicato il 3 Aprile 2017).

La specie *K. pneumoniae*, è stata inclusa nel kit sia per il suo ruolo nelle infezioni infantili (11) sia per la sua emergente presenza nei reparti di terapia intensiva sia neonatale che adulta (focolai) (17-19).

Il kit EuSepScreen Lattanti è stato disegnato per ottenere la più alta sensibilità e specificità nella determinazione della maggior parte delle malattie batteriche invasive (meningiti, sepsi, polmoniti, etc.) nei lattanti utilizzando direttamente campioni biologici quali sangue, liquor, liquido pleurico, liquido sinoviale o qualunque altro liquido o materiale biologico umano normalmente sterile.

Materiali forniti con il kit

(quantità sufficiente per 8 test)

Reagente A	1 x 1,6 ml
Reagente B	1 x 1,5 ml
Reagente C	1 x 0,5 ml
Controllo positivo (liofilo)	1 x 0,4 ml
Mix 1 (provetta blu)	1 strip x 8 prov.
Mix 2 (provetta gialla)	1 strip x 8 prov.
Mix 3 (provetta trasparente)	1 strip x 8 prov.

Composizione dei materiali/reagenti forniti

1. Reagente A

1 fiala con tappo viola, contenente 1,6 ml di Master Mix per RealTime PCR. Pronto all'uso.

2. Reagente B

1 fiala con tappo verde, contenente 1,5 ml di diluente per master mix. Pronto all'uso.

3. Reagente C

Acqua per ricostituzione controllo.

1 fiala tipo Eppendorf contenente 0,5 ml di acqua sterile da utilizzare per la ricostituzione del controllo positivo.

4. Controllo positivo

1 fiala con tappo giallo, contenente 0,4 ml del DNA reattivo per tutte le Mix. Liofilo, da risospendere al primo utilizzo.

5. Mix 1

1 strip da 8 provette blu sigillate da un foglio di alluminio. Ogni provetta contiene, in forma essiccata, il sistema di rilevamento per *K. pneumoniae* ed *E. Coli*.
Attenzione: evitare l'esposizione diretta alla luce.

6. Mix 2

1 strip da 8 provette gialle sigillate da un foglio di alluminio. Ogni provetta contiene, in forma essiccata, il sistema di rilevamento per *S. agalactiae* e *L. monocytogenes*.
Attenzione: evitare l'esposizione diretta alla luce.

7. Mix 3

1 strip da 8 provette trasparenti sigillate da un foglio di alluminio. Ogni provetta contiene, in forma essiccata, il sistema di rilevamento per DNA genomico umano.
Attenzione: evitare l'esposizione diretta alla luce.

Strumenti e materiali richiesti ma non forniti

1. Pipette da 5, 20, 100, 200, 500 µl
2. Puntali sterili monouso con filtro, per pipette da 5, 20, 100, 200, 500 µl
3. Vortex
4. Centrifuga per provette
5. Centrifuga con rotore per micropiastre
6. Termociclatore Real Time con filtri di lettura a 520 e 550 nm
7. Provette da 0,2 ml con tappi di grado ottico
8. Micropiastre di grado ottico
9. Supporto per provette da 0,2 ml

Criteri di prestazione

Il sistema, attraverso l'utilizzo di sonde ad idrolisi, consente l'identificazione di DNA batterico di *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. agalactiae* e *L. monocytogenes* in un campione biologico, a seguito di processo di estrazione degli acidi nucleici.

Di seguito vengono riportati i geni target individuati per i singoli patogeni:

- *K. pneumoniae* - gene **phoE** (outer membrane phosphoprotein protein E)
- *E. coli* - gene **uidB** (glucuronide transporter)
- *S. agalactiae* - gene **sip** (streptococcal surface immunogenic protein)
- *L. monocytogenes* - gene **iap** (invasion associated protein).

I geni target utilizzati conferiscono il 100% di specificità al test. Utilizzando queste sequenze geniche come target di amplificazione, si riescono ad individuare i seguenti sierotipi:

- *K. pneumoniae* - tutti i differenti sierotipi
- *E. coli* - tutti i differenti sierotipi
- *S. agalactiae* - tutti i differenti sierotipi
- *L. monocytogenes* - i ceppi che determinano meningite.

Raccolta e preparazione dei campioni

Il kit EuSepScreen Lattanti richiede l'utilizzo di campioni biologici quali sangue, liquor, liquido pleurico, liquido sinoviale

o qualunque altro liquido o materiale biologico umano normalmente sterile. Il campione è costituito dal DNA estratto da questi campioni attraverso l'utilizzo delle più comuni metodiche di estrazione degli acidi nucleici sia manuali sia automatiche. Per la metodica manuale si consiglia l'utilizzo del kit Eu-Gen Estrazione (cat. 9132).

Specificità analitica

Per verificare la specificità delle mix del sistema EuSepScreen Lattanti le tre mix di rilevazione per *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. agalactiae* e *L. monocytogenes* e quella per la beta globina sono state testate su DNA batterico, virale e DNA genomico umano certificate. I patogeni testati appartengono alle specie rilevabili dalla linea EuSepScreen Eurospital (cat. 9144, 9145, 9149, 9345, 9148 e 9146) quali *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae*, *E. coli*, *H. influenzae capsulato di tipo b*, *H. influenzae non capsulato*; *H. aegyptius*, *H. Haemolyticus*, e da altre specie quali *S. piogenes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. parainfluenzae* ed *H. aphrophilus* ed Adenovirus.

I test incrociati con tutte le mix del kit EuSepScreen Lattanti (cat. 9144-9148-9146) ed EuSepScreen Plus (cat. 9345-9149-9147) hanno confermato che le mix sono specifiche al 100%.

Sensibilità diagnostica

40 campioni di DNA estratti da campioni biologici, già caratterizzati presso un centro di riferimento, sono stati testati con questo metodo. I risultati ottenuti con EuSepScreen hanno evidenziato una sensibilità e una specificità diagnostica del 100%.

Sensibilità analitica

Per ogni singolo patogeno è stata definita una sensibilità analitica in termini di numero di copie di DNA rilevate nel volume di reazione, attraverso l'uso di plasmidi che contengono nella loro sequenza i geni target per i singoli microrganismi. La definizione del dato di sensibilità si riferisce alla positività rilevata in duplicato, per ogni singolo patogeno, all'interno della stessa seduta e tra sedute diverse. Ognuna delle mix ha amplificato il DNA plasmidico a 2 copie/ μ l (10 copie/PCR) in duplicato con valori medi di Ct che mostrano un CV inferiore al 5%, quindi la sensibilità analitica per tutti i patogeni rilevabili nel kit EuSepScreen Lattanti risulta pari a **10 copie/PCR**.

Conservazione

Tutti i componenti del kit devono essere conservati a 2-8°C. Mantenere le mix a riparo dalla luce.

Stabilità dopo la prima apertura

Tutti i componenti, se utilizzati con le accortezze riportate nel capitolo 'Avvertenze generali', sono stabili fino alla data riportata in etichetta.

Stabilità al trasporto

In uno studio di stabilità accelerata tutti i componenti del dispositivo si sono dimostrati stabili dopo conservazione a 37°C per 96 ore.

Conservazione dei campioni

Il DNA purificato, se non immediatamente sottoposto ad amplificazione, può essere conservato a 2-8°C per 3 mesi, oppure a -20°C per tempi più lunghi: in questo caso è consigliabile suddividerlo in aliquote in modo da evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti che potrebbero degradarlo. Il riutilizzo del DNA conservato a -20°C è stato verificato da Eurospital unicamente con i reagenti presenti nel kit Eu-Gen Estrazione (cat. 9132). L'impiego di altri kit di estrazione prevede infatti, la verifica delle relative procedure d'uso da parte del laboratorio, riguardo a stabilità e conservabilità del DNA estratto.

Risospensione del Controllo positivo

Al primo utilizzo, centrifugare brevemente la fiala del Controllo positivo. Utilizzando solo puntali sterili, aggiungere 0,4 ml di acqua per la ricostituzione del controllo (reagente C). Agitare utilizzando un agitatore meccanico (vortex) per almeno 15 secondi per permettere una corretta risospensione del materiale contenuto all'interno della provetta del controllo. Centrifugare brevemente la fiala per eliminare le gocce dalle pareti e dall'interno del coperchio. Il controllo positivo così risospeso è pronto per l'uso. La validità rimane quella indicata in etichetta.

Procedimento di Amplificazione del DNA

1. Per ogni campione da testare, tagliare 1 provetta da ogni strip colorata da 8 provette (**Mix 1** blu, **Mix 2** gialla, **Mix 3** trasparente);
2. Forando con il puntale il foglio di alluminio che sigilla la provetta, aggiungere ad ogni mix 37,5 μ l del **reagente B (fiala con il tappo verde)**. Pipettare un paio di volte per risospendere il pellet adeso sul fondo;
3. **Solo per cat. 9144:** aggiungere ad ogni mix 62,5 μ l del reagente **reagente A (fiala con il tappo viola)** e pipettare un paio di volte per rendere omogenea la soluzione.
4. Le 3 mix sono così pronte per l'uso;
5. Dispensare 20 μ l di ciascuna mix in 4 provette (se si usano strip) oppure in 4 pozzetti (se si usano piastre)

come riportato nello schema sottostante:

	1	2	3
A	Mix 1	Mix 2	Mix 3
B	Mix 1	Mix 2	Mix 3
C	Mix 1	Mix 2	Mix 3
D	Mix 1	Mix 2	Mix 3

6. Per ogni mix eseguire le seguenti azioni, secondo la tabella sottostante:

- non aggiungere niente nelle provette della riga A (controllo negativo di reazione, no template control o NTC);
- aggiungere 5 µl di campione estratto nelle provette delle righe B e C e pipettare un paio di volte per mescolare la soluzione (sample S1);
- aggiungere 5 µl di Controllo positivo nelle provette della riga D e pipettare un paio di volte per mescolare la soluzione (Controllo positivo, C+);

	1	2	3
A	Mix 1 NTC	Mix 2 NTC	Mix 3 NTC
B	Mix 1 S1	Mix 2 S1	Mix 3 S1
C	Mix 1 S1	Mix 2 S1	Mix 3 S1
D	Mix 1 C+	Mix 2 C+	Mix 3 C+

- Chiudere le provette con fogli adesivi o tappi di grado ottico;
- Centrifugare brevemente la micropiastra (o le strip se si usa tale supporto) per togliere eventuali bolle dalla miscela di amplificazione;
- Seguendo il manuale dei singoli termociclatori RealTime suggeriti impostare i fluorofori per ogni singolo patogeno in base allo schema seguente:

	Target	Reporter	Quencer	Passive Reference
Mix 1	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i>	FAM	TAMRA	ROX
		JOE	TAMRA	ROX
Mix 2	<i>S. agalactiae</i> <i>L. monocytogenes</i>	FAM	TAMRA	ROX
		JOE	TAMRA	ROX
Mix 3	Beta globina (#)	FAM	TAMRA	ROX

(#) **Impostare solo il fluoroforo FAM sui pozzetti contenenti la Mix 3 della beta globina.**

10. Impostare il volume di reazione a 25 µl;

11. Impostare il seguente protocollo termico e settare la

lettura ottica dello strumento allo step 4 (in giallo);

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
1	50°C	2 min.	1
2	95°C	10 min.	1
3	95°C	15 sec.	45
4	60°C	1 min.	

Protocollo FAST

Il kit EuSepScreen Lattanti è stato validato anche per l'esecuzione in metodica FAST esclusivamente con TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, cat. 4444557).

Nel caso in cui si volesse procedere in tal senso sarà necessario seguire le indicazioni di seguito riportate:

- i volumi di reazione non variano rispetto alla metodica tradizionale;
- utilizzare esclusivamente micropiastrine compatibili con l'apparecchio utilizzato;
- utilizzare *TaqMan FAST ADVANCED MMIX 2X Applied Biosystems (cat. 4444557) in qualità di Reagente A;
- impostare il volume di reazione a 25 µl;
- impostare il seguente protocollo termico e settare la lettura ottica dello strumento allo step numero 4 (in giallo);

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
1	50°C	2 min.	1
2	95°C	20 sec.	1
3	95°C	3 sec.	45
4	60°C	30 sec.	

(* TaqMan FAST ADVANCED MMIX 2X Applied Biosystem deve essere conservata alla temperatura di -20°C fino al primo utilizzo; seguire le indicazioni presenti in etichetta.

Validazione dei risultati ottenuti

- Verificare che per ogni mix i segnali ottenuti per il controllo NTC siano negativi per entrambi i fluorofori selezionati (FAM e JOE);
- Verificare che i segnali, letti sul canale del FAM, ottenuti con la **Mix 3** (beta globina) in entrambe i pozzetti contenenti il campione da testare (S1) siano positivi;

Note: la positività ottenuta nella **Mix 3** con il campione è indice di una corretta esecuzione della procedura di estrazione degli acidi nucleici e della presenza di materiale genomico nel campione biologico di partenza.

3. Verificare che, per ogni mix, i segnali ottenuti con il C+ siano **sempre** positivi per entrambi i fluorofori impostati (FAM e JOE) come indicato in grigio nelle tabelle sottostanti;
4. Verificare che per le **Mix 1 e Mix 2** i segnali ottenuti nelle due provette contenenti il campione da testare (S1) in doppietto siano concordi: entrambi positivi o entrambi negativi per il filtro di lettura impostato.

Nel caso non si verifichi almeno una delle condizioni sopra riportate, il test deve essere ripetuto. Tali dati vanno comunque confrontati con il quadro clinico del paziente e con il risultato di eventuali esami correlati.

Attenzione: a causa della presenza di materiale proveniente da *E. coli* nelle soluzioni contenenti il reagente A è possibile rilevare segnali di fluorescenza bassi nelle provette della **Mix1** del kit EuSepscreen Lattanti per letture a 550 nm (JOE).

All'interno del kit è contenuto un foglio di CQ che riporta i valori di Ct imputabili alla contaminazione da *E. coli* della Taq Polimerasi (Reagente A) inserita nel kit.

Interpretazione dei risultati

Impostare l'auto-baseline dal ciclo 3 al ciclo 15.

Definire la *threshold* manuale per ogni singolo fluoroforo selezionato. La positività ottenuta nella Mix 3 con il campione è indice di una corretta esecuzione della procedura di estrazione degli acidi nucleici e della presenza di materiale genomico nel campione biologico di partenza.

Per le Mix 1 e 2, nei pozzetti S1, la presenza di un segnale per i filtri di lettura impostati è indice della presenza in quel campione, di materiale genetico appartenente all'agente patogeno secondo il seguente schema:

MIX 1			
Campione	Detector		Risultato
	FAM	JOE	
S1	positivo	negativo	Presenza di <i>K. pneumoniae</i>
S1	negativo	positivo	Presenza di <i>E. coli</i>
S1	positivo	positivo	Copresenza di <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i>
S1	negativo	negativo	Assenza di <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i>
C+ (*)	positivo		Corretta amplificazione del controllo per <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i>
C+	negativo		NON VALIDO

MIX 2			
Campione	Detector		Risultato
	FAM	JOE	
S1	positivo	negativo	Presenza di <i>S. agalactiae</i>
S1	negativo	positivo	Presenza di <i>L. monocytogenes</i>
S1	positivo	positivo	Copresenza di <i>S. agalactiae</i> e <i>L. monocytogenes</i>
S1	negativo	negativo	Assenza di <i>S. agalactiae</i> e <i>L. monocytogenes</i>
C+ (*)	positivo		Corretta amplificazione del controllo per <i>S. agalactiae</i> e <i>L. monocytogenes</i>
C+	negativo		NON VALIDO

MIX 3			
Campione	Detector		Risultato
	FAM		
S1	positivo		Presenza di DNA genomico. Corretta procedura di estrazione.
S1	negativo		Assenza di DNA genomico. Test non valido o concentrazione di DNA nel campione, inferiore al limite di sensibilità del sistema.
C+ (*)	positivo		Corretta amplificazione del controllo per la beta globina
C+	negativo		NON VALIDO

Note (*): il C+ deve risultare SEMPRE positivo per i fluorofori impostati ad ogni seduta effettuata. Si consiglia di verificare sempre i valori di fluorescenza grezza (detti *component* negli strumenti Applied Biosystems) dei segnali rilevati per i singoli fluorofori nei pozzetti di reazione dei campioni (vedi capitolo **Troubleshooting falsi positivi).**

Limite inferiore di rilevamento

Dati recenti in letteratura sull'utilizzo della tecnica Real Time

PCR per l'identificazione di patogeni coinvolti nelle malattie batteriche invasive, come quelli identificabili dalla linea EuSepScreen, indicano valori di Ct pari a 39-40 come limite inferiore di rilevamento in quanto Ct maggiori di 39 possono non essere distinguibili da eventi accidentali o contaminazioni ambientali incontrollabili e potrebbero risultare poco attendibili (20-21).

Per il solo patogeno *K. pneumoniae*, la cui diffusione a livello mondiale (22,23) e nazionale (24,25) è notevolmente aumentata negli ultimi anni sia negli ambienti medico-ospedalieri (23) che in comunità (24), il limite inferiore di rilevamento è di Ct pari a 38.

Si suggerisce comunque di interpretare i risultati dubbi ottenuti con EuSepScreen Lattanti avvalendosi del quadro clinico del paziente e del risultato di eventuali altri esami correlati.

I dati di letteratura riguardanti questo argomento sono disponibili presso i laboratori di Eurospital S.p.A.

Precauzioni e avvertenze generali

1. Attendere sempre che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente prima di iniziare il test.
2. Attenersi scrupolosamente ai consigli di procedura. In caso di incidente o malessere, chiamare immediatamente un medico e mostrargli il contenitore, l'etichetta e, se possibile, la scheda di sicurezza.
3. Attenzione: è molto importante non scambiare i componenti di lotti diversi.
4. Nel caso non si operasse sotto cappa, usare sempre la mascherina per evitare la contaminazione delle provette.
5. È consigliabile operare in ambienti distinti e ben delimitati per le fasi di preparazione del campione (estrazione), di preparazione dei reagenti e di amplificazione.
6. Le mix 1, 2 e 3 contengono sequenze specifiche di DNA, sostanze la cui pericolosità non è completamente testata.
7. Utilizzare sempre puntali sterili con filtro.
8. Adottare tutte le precauzioni per evitare la contaminazione dei reagenti.
9. Evitare di lasciare esposte alla luce le mix contenute nei sacchetti minigrp di alluminio.
10. Una volta prelevato il numero di provette richiesto, riporre immediatamente il resto della strip all'interno del sacchetto minigrp di alluminio. Accertarsi della presenza al suo interno del desiccante.
11. Indossare sempre i guanti di protezione per evitare la contaminazione dei reagenti e per la protezione dell'operatore.
12. Utilizzare solo provette, tappi o fogli adesivi di grado ottico.
13. Evitare di mescolare tra loro componenti di lotti diversi.

14. I materiali di rifiuto prodotti utilizzando il kit devono essere smaltiti e trattati secondo le direttive nazionali e le leggi che regolamentano il trattamento dei rifiuti di laboratorio provenienti da sostanze chimiche e biologiche. In particolare, i rifiuti liquidi generati dalle procedure di estrazione dei campioni e gli altri materiali di rifiuto generati (ad esempio: puntali usati per campioni) devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo e inattivati prima dello smaltimento.
15. Evitare il contatto dei rifiuti di estrazione con candeggina.
16. Dopo l'avvenuta amplificazione, eliminare le provette o le piastre contenenti il materiale amplificato senza mai aprirle.
17. Le mix contengono sequenze specifiche di DNA, sostanze la cui pericolosità non è completamente testata.
18. Il kit EuSepScreen Lattanti non deve essere utilizzato per fini diversi da quelli riportati nel "Destinazione d'uso" e ribaditi nei "Criteri di prestazione".

Termociclatori Real Time consigliati

Si consiglia l'uso dei seguenti termociclatori Real Time

- AB 7300/7500 Real Time PCR System
- AB 7500 FAST/7500 FAST Dx Real Time PCR System
- AB Step One e Step One Plus Realtime PCR System
- Bio-Rad CFX Touch e Connect
- Eppendorf RealPlex
- Qiagen Rotor-Gene 3000/6000

Limiti del test

1. Il kit EuSepScreen Lattanti è stato ottimizzato utilizzando i reagenti di estrazione presenti nel kit Eu-Gen Estrazione (cat. 9132). L'impiego di altri kit di estrazione prevede la verifica delle relative procedure d'uso da parte del laboratorio, riguardo efficienza di estrazione, stabilità e conservabilità del DNA estratto. Risultati falsi negativi, possono verificarsi se la concentrazione di DNA batterico estratto è inferiore al limite di rilevamento del kit e/o per la presenza nei campioni di inibitori non eliminati dal metodo di estrazione. A titolo di esempio si riportano i dati di sensibilità diagnostica ottenuti, con i kit della linea EuSepScreen, sulle specie batteriche che maggiormente causano la meningite batterica in Europa (26; 27) e in America (www.cdc.gov/meningitis/bacterial.html), quali la *N. meningitidis*, lo *S. pneumoniae*, l'*H. influenzae* e la *L. monocytogenes*. Questi dati sono stati ottenuti su DNA batterico estratto con metodica automatica (NUCLISENS easyMAG, Biomerieux) a partire da diluizioni scalari in base 10 delle corrispondenti colture batteriche (Sambri e Cavrini, dati interni).

Patogeno	Sensibilità diagnostica
<i>N. meningitidis</i> (siero gruppo B)	7,5x10 ³ batteri/ml
<i>S. pneumoniae</i> (siero gruppo 23F)	3,2x10 ³ batteri/ml
<i>H. influenzae</i> (tipo b)	1x10 ³ batteri/ml
<i>L. monocytogenes</i> (tipo 4)	4x10 ³ batteri/ml
<i>L. monocytogenes</i> (tipo 1)	8,5x10 ³ batteri/ml

- Si consiglia di utilizzare il DNA immediatamente dopo l'estrazione. Il DNA purificato, se non immediatamente sottoposto ad amplificazione, può essere conservato a 2-8°C per 3 mesi, oppure a -20°C per tempi più lunghi: in questo caso è consigliabile suddividerlo in aliquote in modo da evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti che potrebbero degradarlo. Non sono disponibili dati sulle prestazioni di EuSepScreen Lattanti con campioni di DNA conservato per periodi più lunghi ed estratto con sistemi diversi da quello indicato, tranne quelli riportati nella tabella riportata sopra.
- A causa del continuo aggiornamento delle sequenze nucleotidiche in rete (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e del naturale processo di mutazione genica e adattamento instaurato dai batteri per la loro sopravvivenza nel tempo (28) la rilevazione dei patogeni inclusi in EuSepScreen Lattanti, su sequenze non contemplate, potrebbe avvenire al di sotto del limite di rilevamento del kit o con bassa efficienza per la presenza di mutazioni e riarrangiamenti della sequenza target.
- Il risultato ottenuto con il kit EuSepScreen Lattanti va sempre valutato e confrontato con il quadro clinico del paziente e con il risultato di eventuali altri esami correlati.**

Troubleshooting

Assenza di segnale.

- Errata impostazione dei filtri di lettura.
- Errori di dispensazione od omissione di reagenti
- Effetti inibitori del campione: processi di estrazione purificazione del DNA insufficienti, utilizzo di un anticoagulante non idoneo all'esecuzione di test di PCR nel caso di prelievi di sangue intero (eparina).
- Errata conservazione del kit.
- Controllare le performance del termociclatore.

Intensità di segnale troppo bassa.

- Deterioramento del sistema di rilevamento dovuto ad errato trattamento e/o conservazione dei reagenti.
- Concentrazioni molto basse di DNA nel campione da analizzare.
- Inappropriata risospensione delle mix.

- Bolle d'aria intrappolate all'interno delle provette da amplificazione.
- Presenza di mutazioni geniche non contemplate.

Falsi positivi.

- Campioni di DNA estratti, per la maggiore parte mediante metodica con biglie magnetiche, possono in rari casi interferire con i reagenti del kit (Reagente A, master mix). Tali interferenze creano dei segnali di positività sul canale del FAM in pozzetti che dovrebbero risultare negativi, dando un grafico dall'aspetto lineare (anziché un tipico profilo esponenziale atteso per una Real Time PCR positiva); questo grafico intersecando i valori di *threshold* dà dei valori di Ct.
Nel caso si verifichi tale evento controllare il segnale di fluorescenza grezzo registrato dallo strumento (detto *component* sulle macchine Applied Biosystem), nel pozzetto/campione, che risulterà alterato ma non riconducibile ad un andamento esponenziale, per il FAM e per l'eventuale *passive reference* (ROX) utilizzato. Se si verifica questo scenario il risultato è da considerarsi un falso positivo.
- Alte intensità di segnale positivo sul canale del FAM possono creare dei risultati falsi positivi sul canale del JOE a causa di un calo proporzionale del fluoroforo passivo ROX (ROX DROP); quando questo accade sulla schermata dell'*Amplification Plot* si crea un grafico per JOE parallelo a quello generato dal FAM, ma di intensità inferiore che, intersecando la soglia (*threshold*) può determinare un valore di Ct rilevabile.
Anche in questo caso controllare il segnale di fluorescenza grezzo registrato dallo strumento per il FAM e JOE accertandosi che esista effettivamente una crescita esponenziale indice di amplificazione/presenza del DNA batterico. Se tale segnale esiste per FAM e non per il JOE, il Ct per il patogeno rilevato con il JOE è da considerarsi un falso positivo.

Falsi negativi.

Risultati falsi negativi, possono verificarsi:

- Se la concentrazione di DNA batterico estratto è al di sotto del limite di rilevamento del kit;
- Per la presenza nei campioni di inibitori non eliminati dal metodo di estrazione;
- A causa di errori di procedura nello svolgimento del test;
- In presenza di campioni di difficile trattamento e con carica batterica limitata. Ad esempio, per patogeni quali la *L. monocytogenes*, batterio intracellulare, potrebbero verificarsi dei falsi negativi, poiché è noto in letteratura come l'isolamento di questo patogeno in campioni clinici, come il liquido cefalorachidiano (CSF), è spesso difficile da analizzare, a causa della bassa carica batterica presente e del poco volume di CSF normalmente prelevato (29-31). Se tale carica è al di sotto del limite di rilevamento del kit il test può risultare negativo.

Literature/Bibliografia

1. Camacho-Gonzalez *et al.*; *Pediatr Clin North Am*, 2013. 60(2): p. 367-89.
2. <http://www.who.int>
3. Shah B.A. and Padbury J.F. *Virulence*, 2014. 5(1): p. 170-8.
4. Simonsen K.A. *et al.*; *ClinMicrobiol Rev*, 2014. 27(1): p. 21-47.
5. Weston E.J. *et al.*; *Pediatr Infect Dis J*, 2011. 30(11): p. 937-41.
6. Bizzarro M.J. *et al.*; *Pediatrics*, 2005. 116(3): p. 595-602.
7. Stoll B.J. *et al.*; *Pediatr*, 1996. 129(1): p. 72-80.
8. Nordmann P. and Poirel L.; *ClinMicrobiol Infect*, 2014. 20(9): p. 821-30.
9. Gerdes J.S.; *PediatrClin North Am*, 2004. 51(4): p. 939-59, viii-ix.
10. Ng P.C.; *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2004. 89(3): p. F229-35.
11. Silva-Junior W.P. *et al.*; *J Infect Dev Ctries*, 2016. 10(12): p. 1318-1324.
12. Jordan J.A. and Durso M.B.; *J MolDiagn*, 2005. 7(5): p. 575-81.
13. Warhurst G. *et al.*; *Health Technol Assess*, 2015. 19(35): p. 1-142.
14. Opota O. *et al.*; *J Med Microbiol*, 2015. 64(10): p. 1174-85.
15. Resti M., *et al.*; *Clin Infect Dis*, 2010. 51(9): p. 1042-9.
16. Azzari, C. *et al.*; *PLoS One*, 2010. 5(2): p. e9282.
17. Calbo E. *et al.*; *Clin Infect Dis*, 2011. 52(6): p. 743-9.
18. Laurent C. *et al.*; *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008. 29(6): p. 517-24.
19. Macrae M.B. *et al.*; *J HospInfect*, 2001. 49(3): p. 183-92.
20. C. T. Sacchi *et al.*; *PLOS ONE*, v.6, n.6, 2011, e20675.
21. Henry M.Wu. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13:26.
22. David P. Calfee. Version 1. F1000Res. 2017;
23. R. Herruzo *et al.*; *J Prev Med Hyg*. 2017;
24. Gagliotti C *et al.*; *Eurosurveillance*, Vol 19, Issue 43, 30 October 2014;
25. Iacchini S. *et al.*; *Euro Surveill*. 2019 Jan 31; 24(5): 1800159.
26. D. van de Beek *et al.*; *Clin Microbiol Infect* 2016; 22; S37-S62 2016;
27. Wagner *et al.*; *J Clin Microbiol* 2018, 56(2) e01492-17
28. Darmon and David. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014 Mar; 78(1): 139.
29. Piana *et al.*; *Italian Journal of Public Health*, 2005, vol2, No1, 29-34

30. Le Monnier *et al.*; *J Clin Microbiol*, 2011, 3917-3923

31. Disson *et al.*; *Virulence* 2012, 3:2, 213-221

EuSepScreen Lattanti

Cat. 9144 (8 tests /test)

















Cat. 9148 (16 tests /test)

Cat. 9146 (24 tests /test)



Revision date /Data di revisione: 2019.09.10
Rev.04

Legend / Legenda

	Lot/Lotto
	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Catalogue number / Numero di catalogo
	Reagent / Reagente A 1 x 1.6 ml
	Reagent / Reagente B 1 x 1.5 ml
	Reagent / Reagente C 1 x 0.5 ml
	Positive control / Controllo positivo 1 x 0.4 ml
	Mix 1 - 1 x 8 strip
	Mix 2 - 1 x 8 strip
	Mix 3 - 1 x 8 strip
	Consult instructions for use / Consultare le istruzioni per l'uso
	Use By / Data di scadenza
	European Conformity / Conformità agli standard europei
	Temperature limitation / Limiti di temperatura
	Sufficient for / Sufficiente per
	Keep out of the sunlight / Tenere lontano dalla luce del sole

Eurospital 

Eurospital SpA

34147 Trieste, via Flavia 122

Tel. +39 040 8997.1 Fax +39 040 280944

www.eurospital.com - info@eurospital.com

