

Istruzioni per l'uso

Pneumocystis ELITe MGB® Kit

reagenti per la Real-Time PCR del DNA



REF RTS150ING

UDI 08033891486723



CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Rev.	Notifiche dei cambiamenti	Data (dd/mm/yyyy)
02	<p>Espansione dell'uso del prodotto in associazione con lo strumento «ELITe BeGenius®» (REF INT040) e la matrice Sputum</p> <p>Aggiornamento delle CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI:</p> <ul style="list-style-type: none"> - aggiornamento del valore di ULoQ per la matrice sputum - aggiornamento del Range di misurazione lineare per Sputum, effettuato in matrice invece che in PBS <p>Nuovo formato grafico e nuova impostazione dei contenuti dell'IFU</p>	25/07/2024
01	<p>Espansione dell'uso del prodotto in associazione con lo strumento «ELITe BeGenius®» (REF INT040) e la matrice BAL</p> <p>Descrizione del valore di cut off IC già adottato Nell'Assay Protocol del prodotto (sezione "Specificità diagnostica")</p> <p>Confermato il valore LoD. Aggiornato valore ULoQ/LLoQ calcolato sulla matrice BAL.</p>	15/05/2023
00	Nuovo sviluppo di prodotto	19/11/2019

NOTA

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

INDICE

1 USO PREVISTO	4
2 PRINCIPIO DEL SAGGIO.....	4
3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	5
4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	5
5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO	5
6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	5
7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI	7
8 CAMPIONI E CONTROLLI	8
9 PROCEDURA ELITe InGenius.....	10
10 PROCEDURA ELITe BeGenius	16
11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI.....	21
12 BIBLIOGRAFIA	30
13 LIMITI DELLA PROCEDURA	30
14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI.....	31
15 LEGENDA DEI SIMBOLI	33
16 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA.....	34
Appendix A QUICK START GUIDE.....	35

1 USO PREVISTO

Il prodotto **Pneumocystis ELITe® MGB Kit** è un dispositivo medico diagnostico in vitro destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come un saggio quantitativo Real Time PCR degli acidi nucleici per la rilevazione e quantificazione del DNA del *Pneumocystis jirovecii* (**PJ**) su campioni di DNA estratto da campioni clinici.

Il saggio è validato in associazione agli strumenti **ELITe InGenius®** ed **ELITe BeGenius®**, sistemi integrati e automatizzati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, a partire da campioni di lavaggi bronco alveolari (BAL) / bronco aspirati (BA) ed espettorati precedentemente fluidificati.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio dell'infezione da *Pneumocystis jirovecii*.

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

2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è una Real-Time PCR quantitativa per la rilevazione del DNA di *Pneumocystis jirovecii* (**PJ**), isolato da campioni e amplificato utilizzando il reagente **PJ PCR Mix**, che contiene primers e sonde con tecnologia MGB.

Le sonde ELITe MGB sono attivate quando ibridano con il prodotto specifico della PCR. **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** monitorano l'incremento di fluorescenza emessa e calcolano i "cicli soglia" (Ct) e le temperature di melting (Tm). La concentrazione del DNA di PJ è calcolata rispetto ad una curva di calibrazione.

Nelle sonde ELITe MGB i fluorofori non emettono segnale quando la sonda non ibrida con il prodotto di reazione specifico. Quando la sonda ibrida con il prodotto specifico di amplificazione, il quencher viene separato dal fluoroforo ed emette il segnale di fluorescenza. Da notare che la sonda non viene idrolizzata durante la PCR e può essere utilizzata per l'analisi di dissociazione e il calcolo della temperatura di melting.

3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

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

- il gene rRNA della **subunità mitocondriale maggiore (mtLSU)** di PJ, rilevato nel canale **PJ**: la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher®, e marcata con il fluoroforo FAM.
- la sequenza artificiale **IC2** del Controllo Interno esogeno, rilevata nel canale **IC**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 525 (AP525).

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

Il prodotto **Pneumocystis ELITe MGB Kit** consente di effettuare **96 test** in associazione con **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** (12 test per ciascuna provetta), utilizzando 20 µL per reazione.

Il prodotto **Pneumocystis ELITe MGB Kit** può essere anche utilizzato in associazione con altri strumenti equivalenti.

4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Tabella 1

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
PJ PCR Mix cod. RTS150ING	Miscela di reagenti per la Real-Time PCR, in provetta con tappo BIANCO	8 x 280 µL	-

5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o materiale analogo.
- Agitatore Vortex.
- Centrifuga da banco (~5,000 giri/minuto).
- Microcentrifuga da banco (~13,000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a spostamento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Provette sterili da 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005).
- Acqua per biologia molecolare.

6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA dai campioni da analizzare, il controllo interno di estrazione e di inibizione, i controlli positivo e negativo di amplificazione, i DNA standard a quantità nota e i materiali di consumo **non** sono inclusi in questo prodotto.

Per l'estrazione automatica degli acidi nucleici, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati delle analisi eseguite sui campioni da analizzare, sono richiesti i seguenti prodotti.

Tabella 2

Strumenti e Software	Prodotti e Reagenti
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA cod. INT030) ELITe InGenius Software versione 1.3.0.19 (o successiva) PJ ELITe_STD , Assay Protocol (Protocollo di Saggio) con i parametri per l'analisi dei Calibratori PJ ELITe_PC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo PJ ELITe_NC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo PJ ELITe_BAL_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di lavaggi bronco-alveolari PJ ELITe_SP_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di espettorato	ELITe InGenius SP 200 (EG SpA, cod. INT032SP200) ELITe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, cod. INT032CS) ELITe InGenius PCR Cassette (EG SpA, cod. INT035PCR) ELITe InGenius Waste Box (EG SpA, cod. F2102-000) 300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., cod. TF-350-L-R-S) solo per ELITe InGenius
ELITe BeGenius (EG SpA cod. INT040) ELITe BeGenius Software versione 2.2.1. (o successiva) PJ ELITe_Be_STD , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei Calibratori PJ ELITe_Be_PC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo PJ ELITe_Be_NC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo PJ ELITe_Be_BAL_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di lavaggi bronco-alveolari PJ ELITe_Be_SP_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di espettorato.	1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Switzerland, cod. 30180118) solo per ELITe BeGenius CPE - Internal Control (EG SpA, cod. CTRCPE) Pneumocystis ELITe Standard (EG SpA, cod. STD150ING) Pneumocystis- ELITe Positive Control (EG SpA, cod. CTR150ING)

7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

7.1 Avvertenze e precauzioni generali

Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare provette, puntali, e gli altri materiali che vengono a contatto con i campioni biologici per almeno 30 minuti con ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o in autoclave a 121 °C per un'ora prima di smaltrirlo.

Manipolare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali utilizzati per eseguire il saggio come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare e smaltire i rifiuti nel rispetto di norme di sicurezza adeguate. Incenerire il materiale monouso combustibile. Neutralizzare i rifiuti liquidi contenenti acidi o basi prima di smaltrirli. Evitare che i reagenti di estrazione entrino in contatto con l'ipoclorito di sodio (candeggina).

- Indossare indumenti protettivi e guanti adatti a proteggersi gli occhi e il viso.
- Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.
- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici sul posto di lavoro.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.
- Eliminare i reagenti avanzati e i rifiuti secondo le norme vigenti.
- Prima di eseguire il saggio, leggere attentamente tutte le istruzioni fornite con il prodotto.
- Durante l'esecuzione del saggio attenersi alle istruzioni fornite con il prodotto.
- Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.
- Utilizzare solo i reagenti in dotazione con il prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.
- Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

7.2 Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

Le procedure di biologia molecolare devono essere eseguite da personale qualificato e addestrato per evitare il rischio di risultati errati, soprattutto a causa della degradazione degli acidi nucleici contenuti nei campioni o della contaminazione dei campioni stessi da parte di prodotti di amplificazione.

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

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

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

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

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

7.3 Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Componente	Temperatura di conservazione	Utilizzo dalla prima apertura	Cicli di congelamento/scongelamento	Stabilità On board (ELITe InGenius ed ELITe BeGenius)
PJ PCR Mix	-20 °C o inferiore (protetta dalla luce)	entro un mese	fino a sette	fino a sette sessioni indipendenti* da tre ore ciascuna oppure fino a 7 ore consecutive (2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna più il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro)

*con congelamento intermedio

8 CAMPIONI E CONTROLLI

8.1 Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato su **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** con i seguenti campioni clinici identificati e gestiti secondo le linee guida di laboratorio e raccolti, trasportati e conservati nelle seguenti condizioni:

Tabella 3

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto e conservazione		
		+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Lavaggi bronco-alveolari (BAL)/ bronco aspirati (BA)	in una soluzione fisiologica sterile o PBS*	≤1 settimana	≤ 30 giorni	≤ 1 anno
Espettorato (SP)	-	≤1 settimana	≤ 30 giorni	Lunghi periodi

*PBS: tampone fosfato salino

Se i campioni di BAL/BA sono particolarmente mucosi, possono essere liquefatti con reagenti a base di ditioltreitolo (es. Sputasol, Oxoid, Thermo Fisher Scientific) secondo le linee guida del laboratorio.

I campioni di espettorato devono essere liquefatti con reagenti a base di ditioltreitolo (es. Sputasol, Oxoid, Thermo Fisher Scientific) secondo le linee guida del laboratorio.

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti. Quando si utilizzano campioni congelati scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Per eseguire l'analisi dei campioni su **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius**, è necessario utilizzare gli Assay Protocols di seguito indicati. Questi protocolli di saggio IVD sono stati validati per l'uso specifico con i kit ELITE MGB e **ELITe InGenius** o **ELITe BeGenius** con le matrici indicate.

Tabella 4

Assay Protocols per Pneumocystis ELITe MGB Kit				
Campione	Strumento	Nome Assay Protocol	Report	Caratteristiche
Lavaggi bronco-alveolari / bronco aspirati (BAL/BA)	ELITe InGenius	PJ ELITe_BAL_200_100	copie/mL	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITe BeGenius	PJ ELITe_Be_BAL_200_100		
Espettorato (SP)	ELITe InGenius	PJ ELITe_SP_200_100	copie/mL	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITe BeGenius	PJ ELITe_Be_SP_200_100		

Per tutti i protocolli, è richiesto il trasferimento di 200 µL di campione in un Extraction tube (per ELITe InGenius) o in una provetta Sarstedt da 2 mL (per ELITe BeGenius).

NOTA

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

Gli acidi nucleici purificati possono essere lasciati a temperatura ambiente per 16 ore e conservati a -20 °C o temperatura inferiore per periodi non più lunghi di un mese.

I dati disponibili relativi all'inibizione indotta da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo "Sostanze potenzialmente interferenti" al capitolo "Caratteristiche delle prestazioni".

Quantità di DNA genomico umano maggiori di 1 µg per reazione potrebbe inibire la reazione di amplificazione real-time.

Gli acidi nucleici purificati possono essere lasciati a temperatura ambiente per 16 ore e conservati a -20 °C o temperatura inferiore per periodi non più lunghi di un mese.

I dati disponibili relativi all'inibizione indotta da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo [11.4 Organismi potenzialmente interferenti: cross-reattività](#) pagina 25 al capitolo [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI](#) pagina 21.

Quantità di DNA genomico umano maggiori di 1 µg per reazione potrebbe inibire la reazione di amplificazione real-time.

8.2 Calibratori e Controlli di PCR

Prima di analizzare ogni campione, è obbligatorio generare e approvare la curva di calibrazione per ogni lotto di reagente di PCR:

- come Curva di Calibrazione, utilizzare il prodotto **Pneumocystis ELITe Standard** (non fornito in questo kit), in associazione con gli Assay Protocols **PJ ELITe_STD** o **PJ ELITe_Be_STD**

Prima di analizzare ogni campione, è assolutamente obbligatorio generare e approvare i controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione:

- come Controllo Positivo di PCR, utilizzare il prodotto **Pneumocystis - ELITe Positive Control** (non fornito in questo kit), in associazione con gli Assay Protocols **PJ ELITe_PC** o **PJ ELITe_Be_PC**
- come Controllo Negativo di PCR, utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita in questo kit) in associazione con gli Assay Protocols **PJ ELITe_NC** o **PJ ELITe_Be_NC**.

NOTA

ELITe InGenius ed **ELITe BeGenius** richiedono la generazione e l'approvazione della curva di calibrazione e risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di PCR.

Le curve di calibrazione scadono dopo **60 giorni** e la validazione dei risultati dei controlli di PCR, approvati e memorizzati nel database scade dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente la curva di calibrazione e l'analisi dei controlli positivi e negativi.

Inoltre, i calibratori e i controlli di amplificazione devono essere ritestati nei seguenti casi:

- quando si utilizza un nuovo lotto di reagenti di PCR,
- quando i risultati delle analisi di controllo qualità (vedi 8.3 Controlli di qualità pagina 10) non rientrano nelle specifiche,
- quando **ELITe InGenius** o **ELITe BeGenius** deve essere sottoposto ad un intervento di manutenzione principale.

8.3 Controlli di qualità

Si consiglia la verifica programmata della procedura di estrazione e amplificazione. Si possono utilizzare campioni testati o materiale di riferimento certificato. Quando disponibili, utilizzare i controlli esterni in conformità a leggi locali, statali, organizzazioni di accreditamento federali.

9 PROCEDURA ELITe InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **Pneumocystis ELITe MGB Kit** con **ELITe InGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 5

FASE 1	Verifica che il sistema sia pronto			
FASE 2	Impostazione della sessione	A) Corsa dei campioni (Extract + PCR)		
		B) Corsa dei campioni estratti (PCR Only)		
		C) Corsa di Calibrazione (PCR Only)		
		D) Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)		
FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	A) Validazione della curva di calibrazione		
		B) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo		
		C) Validazione dei risultati dei campioni		
		D) Refertazione dei risultati dei campioni		

9.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITe InGenius** e selezionare la modalità “**CLOSED**”,
- nella sezione “Calibration” della schermata Home, verificare che i calibratori (**Q - PCR Standard**) siano processati, approvati e validi (Status) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili Calibratori validi, eseguire la sessione dei calibratori come descritto di seguito
- nella sezione “Controls” della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**Positive Control, Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili Controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito, selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo **8 CAMPIONI E CONTROLLI** pagina 8).

Se l'Assay Protocol d'interesse non è presente nel sistema, rivolgersi al Servizio Clienti ELITechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

9.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **Pneumocystis ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con **ELITe InGenius** per eseguire:

- A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)
- B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
- C. Corsa di Calibrazione (PCR Only),
- D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

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

NOTA

ELITe InGenius può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile scaricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Prima di impostare una sessione:

-Scongelare le provette necessarie di **PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **12 test** in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

La miscela **PCR Mix** è fotosensibile per cui non va esposta alla luce diretta.

Per l'impostazione dei quattro tipi di sessione procedere con i seguenti passaggi seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI).

Tabella 6

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Scongelare le provette necessarie di controllo interno CPE a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 12 reazioni.	Scongelare a temperatura ambiente gli Elution tube con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.
2	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".
3	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL.
4	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
5	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").
6	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" selezionare "PCR Only".
7	Selezionare "Extraction tube" nella colonna "Sample Position". Verificare che il " Dilution factor " sia "1".	Nella colonna "Sample Position" selezionare "Elution Tube" (bottom row) come posizione in cui caricare il campione. Verificare che il " Dilution factor " sia "1".

Tabella 6 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Caricare il CPE e la PCR Mix nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi	Caricare la PCR Mix nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i Tip Rack .	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i Tip Rack .
12	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
13	Caricare le PCR cassette , le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200", tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre.	Caricare le PCR cassette e gli Elution tube con i campioni da analizzare.
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
15	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
16	Premere "Start".	Premere "Start".

Tabella 7

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	Scongelare le provette di Q-PCR Standard (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. (Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 4 reazioni).	Scongelare le provette di Controllo Positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. (Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 4 reazioni). Preparare il Controllo Negativo trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un Elution tube, fornito con il prodotto ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".
3	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL
4	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli") e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del Q-PCR Standard.	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli") e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del Positive Control e dell'acqua per biologia molecolare.
5	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "PCR Only".	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "PCR Only".
6	Verificare nella colonna "Sample Position" che la posizione sia "Elution Tube".	Verificare nella colonna "Sample Position" che la posizione sia "Elution Tube".
7	Caricare la PCR Mix nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.	Caricare la PCR Mix nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
8	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i Tip Rack .	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i Tip Rack .

Tabella 7 (segue)

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
10	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
11	Caricare le PCR cassette e le provette per il Q-PCR Standard	Caricare le PCR cassette e le provette per il Controllo Positivo ed il Controllo Negativo.
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
14	Premere "Start".	Premere "Start".

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

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a -20 ± 10 °C al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

NOTA

Alla fine della corsa la **PCR Mix** può essere rimossa dallo strumento, tappata e conservata a -20 °C o temperatura inferiore, o può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 7 ore (2 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna e il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro), mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

NOTA

Alla fine della corsa prelevare dallo strumento le provette di **Q - PCR Standard**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Q - PCR Standards.

NOTA

I **Q-PCR Standard** possono essere utilizzati per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 2 ore ciascuna.

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

Alla fine della corsa, rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo e smaltrirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

9.3 FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

ELITe InGenius monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri dell'Assay Protocol per generare curve di PCR e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display" nella quale sono riportati i risultati e le informazioni riguardanti la sessione. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

NOTA

ELITe InGenius può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile inviare i risultati della sessione di lavoro al centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

ELITe InGenius genera i risultati del prodotto **Pneumocystis ELITe MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

- A. Validazione della Curva di Calibrazione,
- B. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
- C. Validazione dei risultati dei campioni,
- D. Refertazione dei risultati dei campioni.

9.3.1 A. Validazione della Curva di Calibrazione

L' **ELITe InGenius software** interpreta i risultati di PCR per il target dei calibratori con i parametri inclusi nell' Assay Protocol **PJ ELITe_STD**. Il Ct risultante rispetto alla concentrazione genera la curva di calibrazione.

Le curve di calibrazione, specifiche per il lotto di reagente di PCR, vengono registrate nel database (Calibration). Esse possono essere consultate e approvate da personale avente qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

La curva di calibrazione scade **dopo 60 giorni**.

NOTA

Se la curva di calibrazione non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Calibration" si visualizza il messaggio "Failed" che ne impedisce l'approvazione. Le reazioni di amplificazione del calibratore devono essere ripetute. Se la curva di calibrazione viene processata insieme ai campioni da testare e il risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

9.3.2 B. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo

Il **software ELITe InGenius** interpreta i risultati di PCR dei target del Controllo Positivo e del Controllo Negativo con i parametri inclusi negli Assay Protocol **PJ ELITe_PC** e **PJ ELITe_NC**. I valori di Ct e Tm ottenuti sono utilizzati per validare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati del **Controllo Positivo** e **Controllo Negativo**, specifici per il lotto del reagente di PCR, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere consultati e approvati da personale avente la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo scadono **dopo 15 giorni**. I risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo vengono utilizzati dal **software ELITe InGenius** per impostare i grafici di controllo che monitorano le prestazioni delle fasi di amplificazione. Per maggiori dettagli, consultare il manuale dello strumento

NOTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Controls" appare il messaggio "Failed" che ne impedisce l'approvazione. In tal caso, ripetere la reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo.

NOTA

Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo sono amplificati insieme ai campioni da analizzare e il risultato non è valido, i campioni possono essere approvati, ma i risultati non sono validati. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

9.3.3 C. Validazione dei risultati dei campioni

Il software **ELITe InGenius** interpreta i risultati di amplificazione del target (Canale **PJ**) e del controllo interno (Canale **IC**) con i parametri inclusi negli Assay Protocol **PJ ELITe_BAL_200_100** e **PJ ELITe_SP_200_100**. I valori dei Ct ottenuti sono convertiti in valori di concentrazione.

I risultati vengono mostrati nella schermata "Results Display".

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

Tabella 8

1) Curva di Calibrazione	Stato
PJ Q-PCR Standard	APPROVATO
2) Controllo Positivo	Stato
PJ Positive Control	APPROVATO
3) Controllo Negativo	Stato
PJ Negative Control	APPROVATO

I risultati del campione vengono interpretati automaticamente dal software **ELITe InGenius** utilizzando i parametri dell'Assay Protocol. La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato ottenuto.

Per ogni campione il sistema riporta una combinazione dei seguenti messaggi specificando se il DNA dei patogeni è stato rilevato o non rilevato.

Tabella 9

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
PJ: DNA rilevato, quantità pari a "XXX" copie / mL	Il DNA di PJ è stato rilevato nel campione nell'intervallo di misurazione del saggio, nella quantità mostrata.
PJ: DNA rilevato, quantità inferiore a "LLOQ" copie/mL	Il DNA di PJ è stato rilevato nel campione al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLOQ) del saggio
PJ: DNA rilevato, quantità oltre "ULoQ" copie/mL	Il DNA di PJ è stato rilevato nel campione oltre il limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio.
PJ: DNA non rilevato o inferiore a "LoD" copie/ mL	Il DNA di PJ non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per il DNA di PJ oppure la sua concentrazione è inferiore al Limite di Rilevazione (LoD) del saggio.
Non Valido-Ripeti test su campione	Risultato del saggio non valido per un errore del controllo interno (es: estrazione errata, presenza di un inibitore). Il test deve essere ripetuto.

Campioni che riportano il risultato " Non Valido-Ripeti test su campione": in questo caso il DNA del Controllo Interno non è stato rilevato in maniera efficace per problemi nella fase di campionamento, estrazione o amplificazione (e.g. errato campionamento, degradazione o perdita di DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono generare risultati errati

Quando il volume è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato, tal quale oppure diluito, mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only".

In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota in modalità "Extract + PCR" (vedi [14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI](#) pagina 31).

I campioni segnalati come "PJ:DNA non rilevato o inferiore a "LoD" copie/mL sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA di PJ". In tal caso non si può escludere che il DNA di PJ sia presente ad una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedi [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI](#) pagina 21).

I campioni positivi per il DNA di PJ ad una concentrazione inferiore al limite di rilevazione (e al limite inferiore di quantificazione), quando sono rilevati dal saggio, sono identificati nel report come "PJ: DNA Rilevato, quantità inferiore a LLoQ" (vedi [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 21](#)).

I campioni positivi per il DNA di PJ ad una concentrazione all'interno del Range di misurazione lineare sono identificati nel report come "PJ: DNA rilevato, quantità pari a "XXX" copie / mL" (vedi [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 21](#)).).

I campioni positivi per il DNA di PJ ad una concentrazione oltre il limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio sono identificati nel report come "PJ:DNA rilevato, quantità oltre "ULoQ" copie / mL" e non sono validi ai fini della quantificazione (vedi [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 21](#)).). Se necessario, il campione può essere diluito prima dell'estrazione o la PCR e ritestato al fine di ottenere risultati all'interno del range di misurazione lineare del saggio.

NOTA

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e degli altri esiti di laboratorio riguardanti il paziente.

I risultati della sessione analitica sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Results Display) da personale avente la qualifica di "Administrator" o "Analyst" seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Dalla finestra "Results Display" è possibile stampare e salvare i risultati della sessione analitica sotto forma di "Sample Report" e "Track Report".

9.3.4 D. Refertazione dei risultati dei campioni

I risultati della sessione analitica sono memorizzati nel database e possono essere visualizzati o esportati sotto forma di "Sample Report" e "Track Report".

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

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

Il "Sample Report" e il "Track Report" possono essere stampati e firmati da personale autorizzato.

10 PROCEDURA ELITe BeGenius

La procedura per l'utilizzo del prodotto **Pneumocystis ELITe MGB Kit** con **ELITe BeGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 10

FASE 1	Verifica che il sistema sia pronto	
FASE 2	Impostazione della sessione	A) Corsa dei campioni (Extract + PCR)
		B) Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
		C) Corsa di Calibrazione (PCR Only)
		D) Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	A) Validazione della curva di calibrazione
		B) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		C) Validazione dei risultati dei campioni
		D) Refertazione dei risultati dei campioni

10.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITe BeGenius** e selezionare la modalità “CLOSED”,
- nella sezione “Calibration” della schermata Home, verificare che i Calibratori (**Q - PCR Standard**) siano processati, approvati e validi (Status) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili Calibratori validi, eseguire la sessione dei calibratori come descritto di seguito
- nella sezione “Controls” della schermata Home, verificare che i Controlli di PCR (**Positive Control, Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili Controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito, selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull’interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo **8 CAMPIONI E CONTROLLI** pagina 8).

Se l’Assay Protocol d’interesse non è presente nel sistema, rivolgersi al Servizio Clienti ELITechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

10.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **Pneumocystis ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con **ELITe BeGenius** per eseguire:

- Corsa dei campioni (Extract + PCR)
- Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
- Corsa di Calibrazione (PCR Only),
- Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi nell’Assay Protocol disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l’Assay Protocol.

NOTA

ELITe BeGenius può essere collegato al “Laboratory Information System” (LIS) tramite il quale è possibile scaricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d’istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Prima di impostare una sessione:

-Scongelare le provette necessarie di **PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **12 test** in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

La miscela **PCR Mix** è fotosensibile per cui non va esposta alla luce diretta.

Per l’impostazione dei quattro tipi di sessione procedere con i seguenti passaggi seguendo le istruzioni visualizzate sull’interfaccia grafica (GUI).

Tabella 11

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Scongelare le provette necessarie di controllo interno CPE a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 12 reazioni.	Scongelare a temperatura ambiente gli “ Elution tube ” con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.
2	Nella schermata Home, selezionare “ Perform Run ”.	Nella schermata Home, selezionare “ Perform Run ”.
3	Rimuovere tutti i Racks dalla “Cooler Unit” e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i Racks dalla “Lane 1, 2 e 3” (L1, L2, L3) della “Cooler Unit” e posizionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il “Run mode”: “ Extract + PCR ”.	Selezionare il “Run mode”: “ PCR Only ”.

Tabella 11 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
5	Caricare i campioni nel “Sample Rack”. (Nota: quando si utilizzano tubi secondari “2 mL Tube” utilizzare gli adattatori blu per il “Sample Rack”).	Caricare gli eluati dei campioni estratti nell’“Elution Rack”.
6	Inserire il “ Sample Rack ” nella “Cooler Unit” partendo dalla “Lane 5” (L5). Se necessario, per ogni “Position” d’interesse inserire il “SampleID” (SID). (Se si utilizzano tubi secondari, selezionare “2 mL Tube”. Se il tubo secondario non ha etichetta o barcode, digitare manualmente il SID).	Inserire l’“ Elution Rack ” nella “Cooler Unit” partendo dalla “Lane 3” (L3). Se necessario, per ogni “Position” d’interesse compilare il “SampleID” (SID), “Sample Matrix”, “Extraction Kit”, “Extracted Eluate Vol.”.
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che “Extraction Input Volume” sia impostato a 200 µL e che l’“Extracted Elute Volume” sia impostato a 100 µL.	Verificare che “Extraction Input Volume” sia impostato a 200 µL e che l’“Extracted Elute Volume” sia impostato a 100 µL.
9	Nella colonna “Assay” selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.	Nella colonna “Assay” selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Quando devono essere analizzati più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.	Quando devono essere analizzati più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.
12	Caricare gli “ Elution tube ” nell’“ Elution Rack ”.	Non applicabile
13	Inserire l’“ Elution Rack ” nella “Cooler Unit” partendo dalla “Lane 3” (L3). In caso di un numero di campioni maggiore di 12, ripetere usando “Lane 2” (L2).	Non applicabile
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile
15	Caricare il CPE e la PCR Mix nel “Reagent/Elution Rack”.	Caricare la PCR Mix nel “Reagent/Elution Rack”.
16	Inserire il “Reagent/Elution Rack” nella “Cooler Unit” nella “Lane 2” (L2) se disponibile o nella “Lane 1” (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix e / o CPE inserire “S/N”, “Lot No.”, “Exp. Date”, “T/R” (numero reazioni del tubo).	Inserire il “Reagent/Elution Rack” nella “Cooler Unit” nella “Lane 2” (L2) se disponibile o nella “Lane 1” (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix inserire “S/N”, “Lot No.”, “Exp. Date”, “T/R” (numero reazioni del tubo).
17	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
18	Nell’“Inventory Area” controllare / caricare i “ Tip Rack ”.	Nell’“Inventory Area” controllare / caricare i “ Tip Rack ”.
19	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
20	Caricare il “ PCR Rack ” con le “ PCR Cassette ” nell’Inventory Area.	Caricare il “ PCR Rack ” con le “ PCR Cassette ” nell’Inventory Area.
21	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
22	Caricare l’“ Extraction Rack ” con le cartucce di estrazione “ELITe InGenius SP 200” e i consumabili richiesti.	Non applicabile
23	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
24	Premere “Start”.	Premere “Start”.

Tabella 12

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	Scongelare le provette di Q-PCR Standard (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. (Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 4 reazioni).	Scongelare le provette di Controllo Positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. (Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 4 reazioni). Preparare il Controllo Negativo trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un " Elution tube ", fornito con il prodotto ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".
3	Rimuovere i Racks dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i Racks dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "Run mode": " PCR Only ".	Selezionare il "Run mode": " PCR Only ".
5	Caricare le provette di Q-PCR Standard nell' " Elution Rack ".	Caricare le provette di Controllo Positivo e di Controllo Negativo nell' " Elution Rack ".
6	Inserire l'" Elution Rack " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol.".	Inserire l'" Elution Rack " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol.".
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
9	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.
10	Click "Next" to continue.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".
12	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2). Se necessario, per ogni PCR Mix inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).
13	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
14	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i " Tip Rack ".	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i " Tip Rack ".
15	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
16	Caricare il " PCR Rack " con le " PCR Cassette " nell' Inventory Area.	Caricare il "PCR Rack" con le "PCR Cassette" nell' Inventory Area.
17	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
18	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
19	Premere "Start".	Premere "Start".

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

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a $-20 \pm 10^{\circ}\text{C}$ al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

NOTA

Alla fine della corsa la **PCR Mix** può essere rimossa dallo strumento, tappata e conservata a -20°C o temperatura inferiore, o può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 7 ore (2 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna e il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro), mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

NOTA

Alla fine della corsa prelevare dallo strumento le provette di **Q - PCR Standard**, chiuderle e conservarle a -20°C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Q - PCR Standards.

NOTA

I **Q-PCR Standard** possono essere utilizzati per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 2 ore ciascuna.

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

Alla fine della corsa, rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

10.3 FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

ELITe BeGenius monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri dell'Assay Protocol per generare curve di PCR e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display", nella quale sono riportati i risultati e le informazioni riguardanti la sessione. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

NOTA

ELITe BeGenius può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile inviare i risultati della sessione di lavoro al centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

ELITe BeGenius genera i risultati del prodotto **Pneumocystis ELITe MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

- A. Validazione della Curva di Calibrazione
- B. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
- C. Validazione dei risultati dei campioni

D. Refertazione dei risultati dei campioni

NOTA

Per i dettagli fare riferimento agli stessi paragrafi della "Procedura" dello strumento **ELITe InGenius**.

11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

11.1 Sensibilità analitica: Limite di rilevazione (LoD)

La sensibilità analitica di **Pneumocystis ELITe MGB Kit**, come limite di rilevazione (LoD), è stato definito in associazione con campioni di BAL/BA ed **ELITe InGenius**.

Il limite di rilevazione è stato calcolato testando un pannello di campioni di BAL/BA negativi e positivizzati con un materiale di riferimento per *Pneumocystis jiroveci* (PJ) a titolo noto (Qnóstics). Il valore di LoD è stato calcolato mediante analisi dei dati con regressione Probit come la concentrazione che ha una probabilità del 95% di risultare positiva.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 13 Limite di rilevazione in campioni di BAL/BA con ELITe InGenius

LoD	Intervallo di confidenza 95%	
	limite inferiore	limite superiore
97 copie / mL	60 copie / mL	275 copie / mL

Il limite di rilevazione calcolato è stato verificato per ciascuna matrice in associazione a **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** mediante campioni di ciascuna matrice positivizzati con materiale di riferimento per PJ alla concentrazione dichiarata.

I risultati ottenuti hanno confermato la concentrazione dichiarata per LoD per il target di *Pneumocystis ELITe MGB Kit* sia su **ELITe InGenius** che su **ELITe BeGenius** con entrambe le matrici.

11.2 Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare del saggio è stato testato in associazione a **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** utilizzando un pannello di diluizioni del DNA target di PJ (positivizzato con una quantità nota di DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione mtLSU) in matrice negativa per il DNA di PJ.

I risultati, per ciascuna matrice, sono riportati nei paragrafi seguenti

Espettorato:

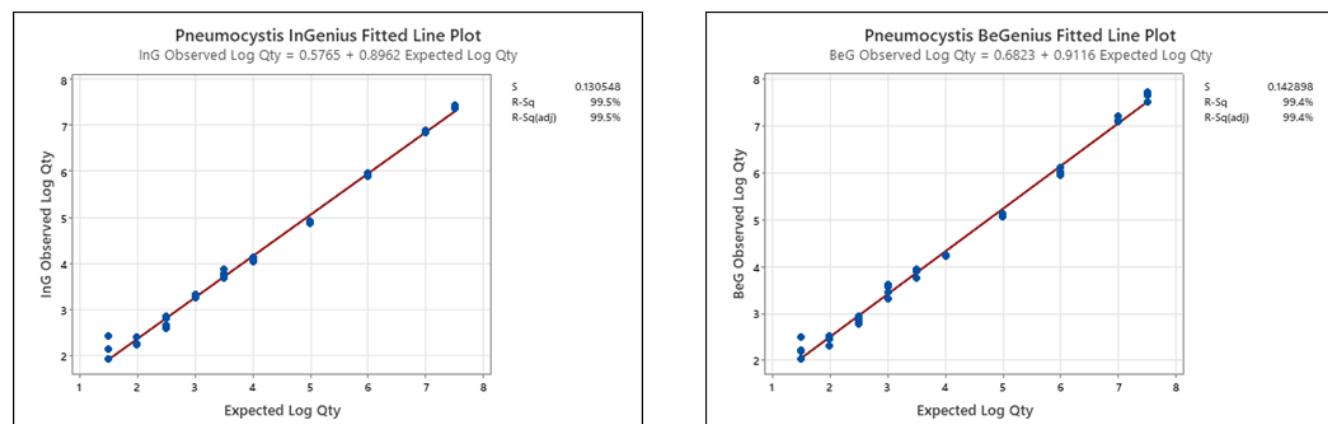


Fig. 1

I risultati ottenuti con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius sono stati analizzati tramite regressione ortogonale e lineare al fine di valutarne la correlazione

I risultati sono riportati nella seguente figura.

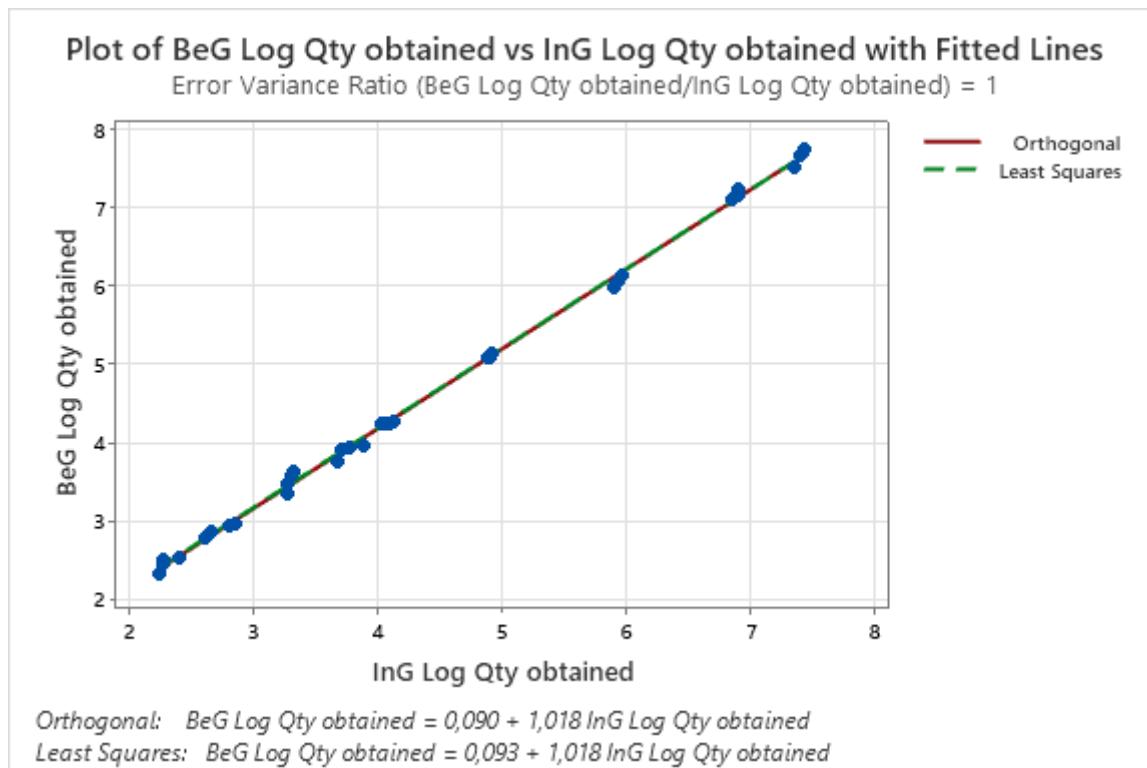


Fig. 2

L'analisi della regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a 0.090 (95% CI: 0.0291; 0.1509) e una pendenza pari a 1.018 (95% CI: 1.0059; 1.0308).

BAL/BA:

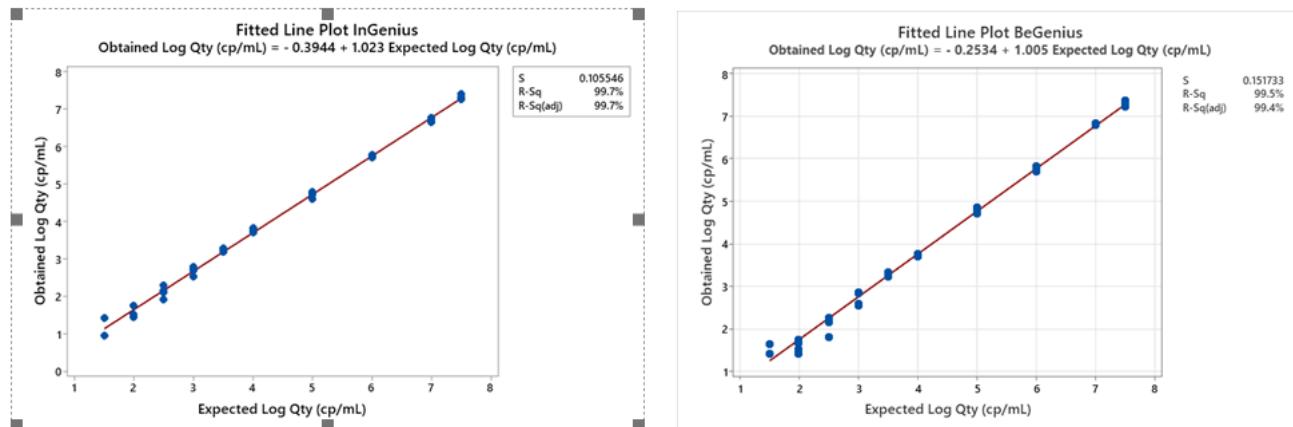
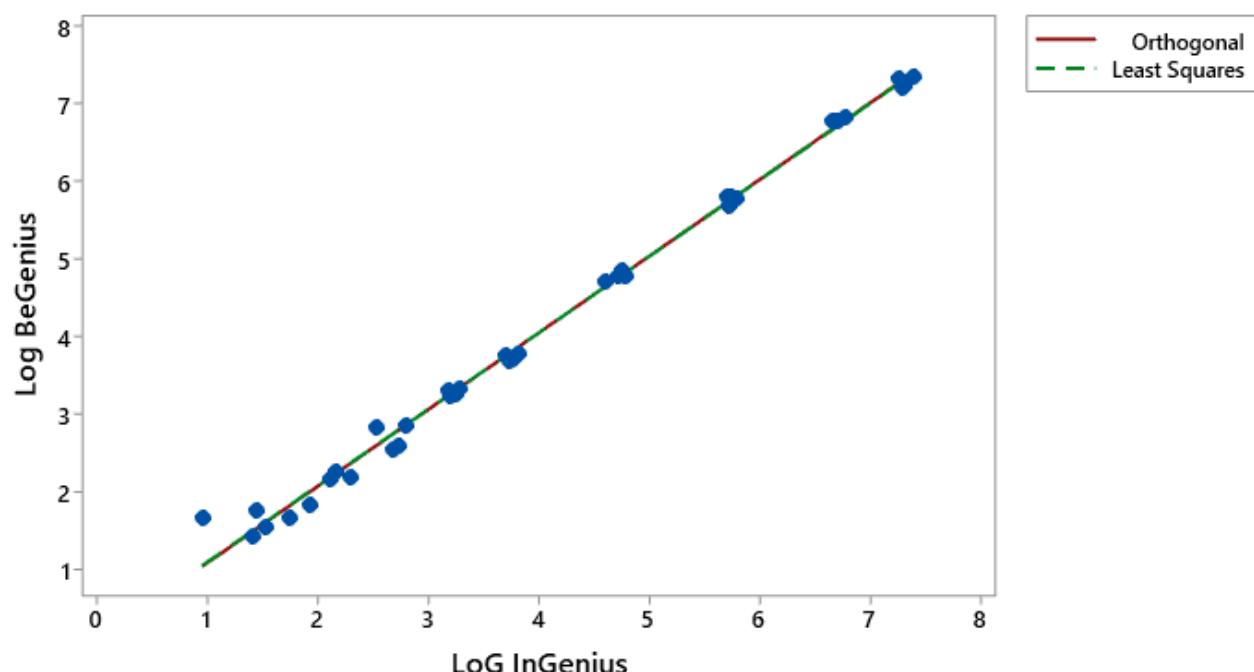


Fig. 3

I risultati ottenuti con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius sono stati analizzati tramite regressione ortogonale e lineare al fine di valutarne la correlazione.

I risultati sono riportati nella seguente figura.

Plot of Log BeGenius vs LoG InGenius with Fitted Lines
 Error Variance Ratio (Log BeGenius/LoG InGenius) = 1



Orthogonal: $\text{Log BeGenius} = 0.098 + 0.989 \text{ LoG InGenius}$

Least Squares: $\text{Log BeGenius} = 0.109 + 0.986 \text{ LoG InGenius}$

Fig. 4

L'analisi della regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a 0.098 (95% CI -0.0134; 0.2099) una pendenza pari a 0.989 (95% CI: 0.9647, 1.0137).

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente

Tabella 14 Intervallo di misurazione lineare con espettato e BAL/BA con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

Limite Inferiore	Limite Superiore
97 copie / mL	31,622,777 copie / mL

11.3 Efficienza di rilevazione (inclusività)

L'efficienza di rilevazione di diversi genotipi è stata valutata mediante confronto di sequenze disponibili nel database EBI ENA.

Le regioni scelte per l'ibridizzazione dei primer e delle sonde fluorescenti sono state verificate rispetto all'allineamento delle sequenze della regione del gene mtLSU di isolati di PJ.

L'inclusività del saggio, come efficienza di rilevazione di differenti isolati di Pneumocystis è stata valutata testando il pannello QCMD 2018 *Pneumocystis jirovecii pneumonia* EQA Panel (Qnistics) composto da 6 diversi isolati clinici.

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 15

Materiale di riferimento				Risultati con Pneumocystis ELITe MGB Kit	
Campioni	Descrizione del campione	Frequenza di rilevazione	Stato del campione	PJ Ct	PJ copie/mL
PCPDNA18S-01	P. jirovecii (Clinical)	Rilevato	Core	33,60	1.771
				33,69	2.704
PCPDNA18S-02	P. jirovecii (j888023)	Frequentemente rilevato	Core	32,19	4.805
				32,56	5.706
PCPDNA18S-03	P. jirovecii (j888023)	Frequentemente rilevato	Core	30,11	20.904
				30,28	25.449
PCPDNA18S-04	P. jirovecii (Type A1)	Frequentemente rilevato	Core	33,83	1.507
				33,57	2.933
PCPDNA18S-05	P. jirovecii (Clinical)	Rilevato	Core	34,06	1.280
				34,81	1.298
PCPDNA18S-06	P. jirovecii (g885652)	Frequentemente rilevato	Core	35,60	432
				37,69	196
PCPDNA18S-07	P. jirovecii (j888023)	Rilevato	Educational	37,55	109
				37,14	280
PCPDNA18S-08	P. jirovecii Negative	Negativo	Core	Non det	Non det
				Non det	Non det
PCPDNA18S-09	P. jirovecii (Type A1)	Rilevato	Educational	37,11	149
				36,91	326
PCPDNA18S-10	P. jirovecii (j888023)	Frequentemente rilevato	Core	31,75	6.547
				33,27	3.565

Tutti e 9 i campioni positivi sono stati correttamente rilevati dal prodotto Pneumocystis ELITe MGB Kit in associazione con lo strumento ELITe InGenius.

L'inclusività del saggio, come efficienze di rilevazione di diversi isolati di Pneumocystis è stata inoltre valutata analizzando dei campioni clinici positivi di BAL/BA e di espettorato testati con un metodo CE IVD di riferimento.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 16

Campioni	N	positivo	negativo	non valido
BAL/BA positivo per PJ	15	15	0	0
Espettorato positivo per PJ	8	8	0	0

Tutti e 23 i campioni clinici positivi sono stati confermati positivi dal prodotto Pneumocystis ELITe MGB Kit in associazione con lo strumento ELITe InGenius.

11.4 Organismi potenzialmente interferenti: cross-reattività

La potenziale cross-reattività con altri target del prodotto Pneumocystis ELITe MGB Kit è stata valutata mediante analisi *in silico* di sequenze disponibili nel database EBI ENA. L'analisi ha mostrato nessuna significativa omologia con altri organismi (virus, fungi, batteri).

L'assenza di cross-reattività con altri potenziali organismi interferenti che possono essere presenti nei campioni clinici di BAL/BA è stata verificata anche mediante l'analisi di un pannello di materiale di riferimento certificato (ATCC) ad alto titolo.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 17 Marcatori potenzialmente cross-reattivi

Organismo	Ceppo	Risultato
<i>Aspergillus fumigatus</i>	118	No cross-reattività
<i>Candida albicans</i>	3147	No cross-reattività
<i>Staphylococcus aureus</i>	Rosenbach	No cross-reattività
<i>Escherichia coli</i>	H10407	No cross-reattività
<i>Bordetella pertussis</i>	-	No cross-reattività
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	No cross-reattività
<i>Haemophilus influenzae</i>	Rd	No cross-reattività
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6	No cross-reattività
<i>Legionella pneumophila</i>	Philadelphia-1	No cross-reattività
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FH	No cross-reattività
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	AR-39	No cross-reattività
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	No cross-reattività
CMV	AD-169	No cross-reattività
Enterovirus	Enterovirus 71	No cross-reattività
Adenovirus	Adenoid 6	No cross-reattività
Influenza A virus	A/PR/8/34	No cross-reattività
Influenza B virus	B/Florida/4/2006	No cross-reattività
RSV	A2	No cross-reattività

Tutti gli organismi potenzialmente cross-reattivi sono risultati negativi quando testati con il Pneumocystis ELITe MGB Kit.

11.5 Organismi potenzialmente interferenti: inibizione.

L'assenza di interferenza con altri organismi che possono essere presenti nei campioni clinici di BAL/BA è stata verificata anche mediante l'analisi di un pannello di materiale di riferimento certificato.

DNA genomico o RNA di diversi organismi potenzialmente interferenti (ATCC) è stato positivizzato con DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione mtLSU a bassa concentrazione (circa 10 copie / reazione).

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 18 Marcatori potenzialmente interferenti

Organismo	Ceppo	Risultato
<i>Aspergillus fumigatus</i>	118	Nessuna interferenza
<i>Candida albicans</i>	3147	Nessuna interferenza
<i>Staphylococcus aureus</i>	Rosenbach	Nessuna interferenza
<i>Escherichia coli</i>	H10407	Nessuna interferenza
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Nessuna interferenza
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Nessuna interferenza
<i>Haemophilus influenzae</i>	Rd	Nessuna interferenza
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6	Nessuna interferenza
<i>Legionella pneumophila</i>	Philadelphia-1	Nessuna interferenza
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FH	Nessuna interferenza
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	AR-39	Nessuna interferenza
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	Nessuna interferenza
CMV	AD-169	Nessuna interferenza
Enterovirus	Enterovirus 71	Nessuna interferenza
Adenovirus	Adenoid 6	Nessuna interferenza
Influenza A virus	A/PR/8/34	Nessuna interferenza
Influenza B virus	B/Florida/4/2006	Nessuna interferenza
RSV	A2	Nessuna interferenza

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti non hanno interferito con l'amplificazione del target quando testato con Pneumocystis ELITe MGB Kit.

11.6 Sostanze potenzialmente interferenti

Il possibile effetto di sostanze interferenti è stato valutato con campioni contenenti le seguenti sostanze endogene: sangue intero, mucina, antibiotici, steroidi ed antistaminici.

I campioni di BAL/BA sono stati positivizzati con materiale di riferimento per PJ (Qnistics) ad una concentrazione pari a 3 x LoD e con le sostanze potenzialmente interferenti.

I valori di Ct del target e del Controllo Interno (campioni da testare e campioni di riferimento) sono stati utilizzati per calcolare il Coefficiente di variazione percentuale (%CV) per valutare la possibile interferenza.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 19 Sostanze potenzialmente interferenti

Campione	Pos. / Rep.	%CV PJ Ct	%CV IC Ct
5% sangue intero	3 / 3	1,41	0,94
1% Mucina	3 / 3	0,29	0,91
6 µg / mL Ambroxol Hydrochloride	3 / 3	0,60	0,53

Tabella 19 Sostanze potenzialmente interferenti (segue)

160 µg / mL Sulfametossazolo + 32 µg / mL Trimethoprim	3 / 3	1,35	0,54
200 µg / mL Ampicillina	3 / 3	1,72	0,60
40 ng / mL Beclometasone	3 / 3	1,28	0,71
4 µg / mL Ebastina	3 / 3	0,64	0,81

Tutti i campioni sono risultati positivi per il target di interesse come previsto. La percentuale %CV dei valori di Ct è risultata minore del 2%. Nessuna delle sostanze testate alle concentrazioni testate ha mostrato di interferire con la rilevazione del target con il Pneumocystis ELITe MGB Kit.

11.7 Ripetibilità

La ripetibilità del saggio è stata valutata su **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** mediante analisi di un pannello di campioni di BAL/BA, includendo un campione negativo e due campioni positivizzati con PJ DNA.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 20 Ripetibilità Intra - Sessione su ELITe InGenius

Campione	N	PJ			
		Ct medio	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	8	NA	NA	NA	100%
3X LoD	8	37,08	0,42	1,13	100%
10X LoD	8	35,04	0,48	1,37	100%

Tabella 21 Ripetibilità Inter - Sessione su ELITe InGenius

Campione	N	PJ			
		Ct medio	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	16	NA	NA	NA	100%
3X LoD	16	37,23	0,72	1,93	100%
10X LoD	16	35,28	0,46	1,30	100%

Tabella 22 Ripetibilità Intra - Sessione su ELITe BeGenius

Campione	N	PJ			
		Ct medio	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	8	NA	NA	NA	100%
3X LoD	8	37,45	0,32	0,86	100%
10X LoD	8	35,37	0,44	1,25	100%

Tabella 23 Ripetibilità Inter – Sessione su ELITe BeGenius

Campione	N	PJ			
		Ct medio	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	16	NA	NA	NA	100%
3X LoD	16	37,98	1,05	2,76	100%
10X LoD	16	35,79	0,63	1,76	100%

Nel test di ripetibilità, Pneumocystis ELITe MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato un CV % dei valori di Ct inferiore al 5 %.

11.8 Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata valutata su **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** mediante analisi di un pannello di campioni di BAL/BA, includendo un campione negativo e due campioni positivizzati con PJ DNA.

I risultati sono riportati nelle tabelle seguente.

Tabella 24 Riproducibilità Inter - Strumento su ELITe InGenius

Campione	N	PJ			
		Ct medio	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	8	NA	NA	NA	100%
3X LoD	8	36,63	0,63	1,72	100%
10X LoD	8	34,42	0,48	1,39	100%

Tabella 25 Riproducibilità Inter - Strumento su ELITe BeGenius

Campione	N	PJ			
		Ct medio	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	8	NA	NA	NA	100%
3X LoD	8	37,26	0,41	1,11	100%
10X LoD	8	34,92	0,40	1,16	100%

Tabella 26 Riproducibilità Inter - Lotto su ELITe InGenius

Campione	N	PJ			
		Ct medio	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	8	NA	NA	NA	100%
3X LoD	8	36,99	0,48	1,29	100%
10X LoD	8	35,03	0,44	1,25	100%

Tabella 27 Riproducibilità Inter - Lotto su ELITe BeGenius

Campione	N	PJ			
		Ct medio	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	8	NA	NA	NA	100%
3X LoD	8	37,59	0,38	1,02	100%
10X LoD	8	35,70	0,59	1,65	100%

Nel test di Riproducibilità, Pneumocystis ELITe MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato un CV% dei valori di Ct inferiore al 5 %.

11.9 Specificità Diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata in associazione a **ELITe InGenius** analizzando campioni di BAL/BA ed espettorato negativi per il DNA di PJ (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Poiché **ELITe BeGenius** ha mostrato prestazioni analitiche equivalenti a **ELITe InGenius**, le prestazioni diagnostiche del saggio su entrambi gli strumenti sono considerate analogamente equivalenti. Per questo motivo, la specificità diagnostica del saggio ottenuta in associazione con lo strumento **ELITe InGenius** può essere applicata anche allo strumento **ELITe BeGenius**.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Campioni	N	Positivi	Negativi	% Specificità Diagnostica
BAL negativo per PJ	58	2	56	96,6
Espettorato negativo per PJ	35	1	34	97,10

Tutti i campioni erano validi per l'analisi.

Per il Controllo Interno è stato definito un cut-off del valore di Ct uguale a 34 con **ELITe InGenius** e a 35 con **ELITe BeGenius** in campioni di BAL/BA.

Per il Controllo Interno è stato definito un cut-off del valore di Ct uguale a 37 con **ELITe InGenius** e con **ELITe BeGenius** in campioni di espettorato.

11.10 Sensibilità Diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi è stata valutata in associazione a **ELITe InGenius**, analizzando campioni clinici di BAL/BA ed espettorato positivi per il DNA di PJ (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time) o positivizzati con materiale di riferimento per PJ. Poiché **ELITe BeGenius** ha mostrato prestazioni analitiche equivalenti a **ELITe InGenius**, le prestazioni diagnostiche del saggio su entrambi gli strumenti sono considerate analogamente equivalenti. Per questo motivo, la sensibilità diagnostica del saggio ottenuta in associazione con lo strumento **ELITe InGenius** può essere applicata anche allo strumento **ELITe BeGenius**.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Campioni	N	Positivi	Negativi	% Sensibilità Diagnostica
BAL/BA positivo per PJ	13	13	0	100
BAL/BA positivizzato per PJ	30	30	0	100
Totale campioni di BAL	43	43	0	100
Espettorato positivo per PJ	8	8	0	100
Espettorato positivizzato per PJ	30	24	6	80
Totale campioni di espettorato	38	32	6	84,2

NOTA

I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche prestazionali del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "di PJ ELITe MGB Kit", FTP 150ING

12 BIBLIOGRAFIA

C. Valero et al. (2016) *Front. Microbiol.* 7:1413

M. Maillet et al. (2014) *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33(3):331-6

E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

K. Linnet et al. (2004) *Clin. Chem.* 50: 732 - 740.

13 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti campioni clinici: BAL, espettorato liquefatto.

Non utilizzare questo prodotto con campioni contenenti troppa mucina: la mucina inibisce la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e può causare risultati non validi.

Al momento, non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con i seguenti campioni clinici: tamponi respiratori.

I risultati ottenuti con questo prodotto dipendono dalla corretta identificazione, raccolta, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni. Per evitare risultati errati è necessario pertanto, procedere con cautela durante queste fasi e seguire attentamente le istruzioni per l'uso riportate nel manuale fornito con il prodotto.

La metodica di amplificazione Real-Time utilizzata in questo prodotto ha un'elevata sensibilità analitica che la rende soggetta a contaminazioni da campioni clinici positivi, da controlli positivi e dagli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le contaminazioni possono produrre risultati falsi positivi. Il formato del prodotto è in grado di limitare le cross-contaminazioni; tuttavia questi fenomeni possono essere evitati solo attenendosi alle buone prassi di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni riportate nel presente manuale.

Questo prodotto deve essere utilizzato da personale qualificato e addestrato alla manipolazione di campioni biologici potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati come pericolosi al fine di evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede l'uso di abbigliamento da lavoro e la disponibilità di aree idonee alla lavorazione di campioni biologici potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati come pericolosi al fine di evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e strumenti dedicati alla preparazione delle sessioni di lavoro per evitare risultati falsi positivi.

Questo prodotto deve essere utilizzato da professionisti qualificati e addestrati all'uso di tecniche di biologia molecolare, quali estrazione, PCR e rilevazione di acidi nucleici, per evitare risultati errati.

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il DNA target non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA target abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (si veda [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 21](#)); in questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi per via di un difetto del controllo interno. In questo caso il campione dovrà essere analizzato di nuovo, a cominciare dall'estrazione, con conseguente possibile ritardo nel conseguimento dei risultati finali. Possibili polimorfismi, inserzioni o delezioni nella regione del DNA target coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione e la quantificazione del DNA target.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati insieme a tutte le osservazioni cliniche rilevanti e agli esiti degli esami di laboratorio.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, vi è un rischio residuo di ottenere con questo prodotto risultati non validi, falsi positivi e falsi negativi. Tale rischio residuo non può essere eliminato né ulteriormente ridotto. In taluni casi, potrebbe indurre decisioni sbagliate con effetti potenzialmente

pericolosi per il paziente. Comunque, questo rischio residuo associato all'uso previsto del prodotto è stato valutato in rapporto ai benefici potenziali per il paziente ed è stato considerato accettabile.

14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Tabella 28

Reazione del Controllo Positivo o dei Q - PCR Standard o della Curva standard non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix, Q-PCR Standard e del Controllo Positivo. Controllare i volumi della PCR Mix, Q-PCR Standard e del Controllo Positivo.
Degradazione della PCR Mix	Non utilizzare la PCR Mix per più di 7 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non utilizzare la PCR Mix per più di tre sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione del Controllo Positivo o dei Q-PCR Standards.	Non utilizzare i Q-PCR Standard per più di 4 sessioni indipendenti (2 ore ciascuna nell'area di estrazione o nel blocco refrigerato). Non utilizzare il Controllo Positivo per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione o nel blocco refrigerato). Utilizzare nuove aliquote di Q-PCR Standard o Controllo Positivo
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 29

Reazione del Controllo Negativo non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix, del Controllo Interno e del Controllo Negativo. Controllare i volumi della PCR Mix, del Controllo Interno e del Controllo Negativo.
Contaminazione del Controllo Negativo.	Non utilizzare il Controllo Negativo per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack e dell'area reagenti o dell'unità refrigerata.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 30

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix e del campione. Controllare i volumi della PCR Mix e del campione.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare il PCR Mix per più di 7 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non utilizzare la PCR Mix per più di tre sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Preparare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione del Controllo Interno.	Utilizzare una nuova aliquota di Controllo Interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR). Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione in una sessione in modalità "Extract + PCR".
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 31

Curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	Soluzioni
Assenza di un picco definito. Picco definito ma Tm differenti da quelle degli altri campioni e da quelle del Controllo Positivo.	Controllare che il Ct del target sia inferiore a 30. Elevate quantità del prodotto di amplificazione alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di dissociazione. Ripetere l'amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Il target nel campione deve essere sequenziato per confermare la mutazione.

Tabella 32

Errore nel calcolo del Ct	
Possibili cause	Soluzioni
Concentrazione troppo elevata del target nel campione o campione con anomala forma del plot.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa selezionare il track relativo al campione e approvare manualmente il risultato come positivo. Se nel PCR plot non appare nessuna amplificazione selezionare il rack relativo al campione e approvare manualmente il risultato come negativo o lasciarlo invalido. Se è richiesto un valore di Ct: - ripetere la reazione di amplificazione del campione eluito con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR)" oppure - ripetere l'estrazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "Extract + PCR" (Estrazione + PCR).

Tabella 33

Alto tasso anormale di risultati positivi nella stessa sessione (reazioni con valori Ct tardivi simili)	
Possibili cause	Soluzioni
Contaminazione da campione a campione durante le fasi pre-analitiche.	<p>Pulire la micropipetta, con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o un detergente per DNA/RNA, dopo aver pipettato ciascun campione.</p> <p>Non utilizzare pipette Pasteur. Le pipette devono essere del tipo a spostamento positivo o utilizzate con puntali con filtro per aerosol.</p> <p>Introdurre campioni nelle ultime posizioni degli strumenti, come indicato dalla GUI. Seguire la sequenza di caricamento indicata dal software.</p>
Contaminazione ambientale di laboratorio	<p>Pulire tutte le superfici a contatto con l'operatore e i campioni (comprese le pipette) con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o un detergente per DNA/RNA.</p> <p>Eseguire un ciclo di decontaminazione UV.</p> <p>Utilizzare una nuova provetta di PCR Mix e / o CTR CPE</p>

15 LEGENDA DEI SIMBOLI

Numero di catalogo



Limite superiore di temperatura



Codice del lotto.



Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).

Dispositivo medico diagnostico *in vitro*.Conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98/79/EC relativa ai dispositivi medici diagnostici *in vitro*.

Numero Unico Identificativo del dispositivo



Contenuto sufficiente per "N" test.



Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso



Contenuto.



Tenere lontano dalla luce solare.



Fabbricante.

16 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

Questo prodotto contiene reagenti fabbricati da Thermo Fisher Scientific e venduti sulla base di accordi di licenza stipulati tra ELITechGroup S.p.A. e le sue affiliate e Thermo Fisher Scientific. Il prezzo d'acquisto di questo prodotto include diritti non trasferibili, limitati a utilizzare solo questa quantità di prodotto esclusivamente per attività dell'acquirente direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sulla licenza d'acquisto per questo prodotto per fini diversi da quelli dichiarati sopra, rivolgersi a Licensing Department, Thermo Fisher Scientific. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

I reagenti di rilevazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. numero 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, e brevetti EP numero 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161. Sono state poi presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

Le tecnologie ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® sono coperte da brevetti e oggetto di domande di brevetto.

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

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, il logo ELITe MGB®, ELITe InGenius® ed ELITe BeGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup all'interno dell'Unione Europea.

Appendix A Pneumocystis ELITe MGB Kit used in association with Genius series® platforms



CAUTION

This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com

INTENDED USE

The product **Pneumocystis ELITe MGB Kit** is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as a quantitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the **detection and the quantification of the DNA** of *Pneumocystis jirovecii* (PJ) in DNA samples extracted from clinical specimens.

The assay is validated in association with the **ELITe InGenius®** and **ELITe BeGenius®** instruments, automated and integrated systems for extraction, Real-Time PCR and results interpretation, using human Broncho-alveolar lavage (BAL) / bronchial aspirate (BA) and liquefied Sputum specimens

The product is intended for *in vitro* diagnostic use as an aid in diagnosis and monitoring of *Pneumocystis jirovecii* infection.

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

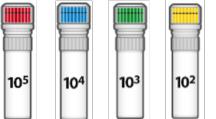
Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target	mtLSU	FAM	PJ
Internal Control	artificial sequence (IC2)	AP525	IC

Validated matrices

- BAL/BA
- Liquefied Sputum samples

Kit content and related products

Pneumocystis ELITe MGB Kit	Pneumocystis ELITe Standard	Pneumocystis - ELITe Positive Control
 X 8	 X 2	 X 3
Ready-to-use PCR Mix 8 tubes of 280 µL 96 reactions per kit 7 freeze-thaw cycles	Ready-to-use 4 levels: 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 2 set of 4 tubes of 200 µL 4 freeze-thaw cycles	Ready-to-use PC 3 tubes of 160 µL 12 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles

Maximum shelf-life: **24 months**

Storage Temperature: **-20 °C**

Other products required not provided in the kit

<ul style="list-style-type: none"> ELITe InGenius instrument: INT030. ELITe BeGenius instrument: INT040. ELITe InGenius SP 200: INT032SP200. ELITe InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS. ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR. ELITe InGenius Waste Box: F2102-000. 	<ul style="list-style-type: none"> CPE - Internal Control: CTRCPE 300 µL Filter Tips Axigen: TF-350-L-R-S. 1000 µL Filter Tips Tecan: 30180118.
--	--

ELITe InGenius and ELITe BeGenius protocol

Table 34

<ul style="list-style-type: none"> Sample volume CPE volume Total elution volume Eluate PCR input volume 	<ul style="list-style-type: none"> 200 µL 10 µL 100 µL 20 µL 	<ul style="list-style-type: none"> R/MG PCR Mix volume Frequency of controls Frequency of calibration Unit of quantitative result 	<ul style="list-style-type: none"> 20 µL 15 days 60 days Copies/mL
--	--	---	--

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Linearity Range	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
BAL	97 cp / mL	97 – 31,622,777	100% 43/43*	96.6% 56/58*
Sputum	97 cp / mL	97 – 31,622,777	84.2% 32/38*	97.1% 34/35*

*confirmed samples/ tested samples

Sample preparation

This product is intended for use on the **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** with the following clinical specimens identified according to laboratory guidelines, and collected, transported, and stored under the following conditions.

Specimen	Collection requirements	Transport/Storage conditions			
		+16 / +26 °C (room temperature)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Bronchoalveolar Lavage / bronchial aspirate (BAL/BA)	in sterile physiological solution or sterile PBS*		≤1 week	≤ 30 days	≤ 1 year
Sputum (SP)			≤1 week	≤ 30 days	> 30 days

*PBS: Phosphate Buffered Saline solution

ELITe InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface of ELITe InGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational modes are available: complete run (Extract + PCR) or PCR Only.

Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius. Log in with username and password. Select the mode “CLOSED”.	2. Verify controls: Positive Control and Negative Control in the “Controls” menu. Note: Both must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the PCR Mix and the CTRCPE tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.
--	--	--

Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)

1. Select “Perform Run” on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: “200 µL”, elution: “100 µL”	3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the “Assay Protocol” of interest: PJ ELITe_BAL_200_100 or PJ ELITe_SP_200_100 or	5. Select the method “Extract + PCR” and the sample position: Primary tube or Extraction Tube	6. Load the PCR Mix and the Internal Control in the Inventory Block
7. Load: PCR Cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks and primary sample racks	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

NOTE

If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user’s manual for procedure.

Procedure 2: PCR Only (e.g., eluates, standards, controls)

1. Select “Perform Run” on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: “200 µL”, elution: “100 µL”	3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the “Assay protocol” of interest: PJ ELITe_PC and PJ ELITe_NC)	5. Select the method “PCR Only” and the sample position “Elution Tube”	6. Load the PCR Mix in the Inventory Block
7. Load: PCR Cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

ELITe BeGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface of ELITe BeGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational modes are available: complete run (Extract + PCR) or PCR Only.

Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius. Log in with username and password. Select the mode “CLOSED”.	2. Verify controls: Positive Control and Negative Control in the “Controls” menu. Note: Both must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the PCR Mix and the CTRCPE tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.
--	--	--

Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extract + PCR»	2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the Cooler Unit. The barcode scan is already active	3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"
4. Select the "Assay protocol" of interest (PJ ELITe_Be_BAL_200_100 or PJ ELITe_Be_SP_200_100 or Note: If a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4	5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load the PCR Mix and the Internal Control in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
7. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette" and the "Extraction Basket" with the "ELITe InGenius SP 200" extraction cartridges and the required extraction consumables	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

NOTE

If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user's manual for procedure.

Procedure 2: PCR Only (e.g., eluates, controls)

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «PCR Only»	2. Load the extracted nucleic acid or controls barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"
4. Select the "Assay protocol" of interest (PJ ELITe_Be_PC and PJ ELITe_Be_NC or PJ ELITe_Be_STD)	5. Load the PCR-Mix in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette"
7. Close the door. Start the run	8. View, approve and store the results	

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

