



AVVERTENZA del 01/08/2025

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

« HIV1 ELITe MGB® Kit » Ref. RTK600ING

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Sostituzione della provetta da 2 ml 953-217 e del tappo bianco 953-223 con la provetta da 2 ml 953-065 relativa alle provette dei componenti del mix PCR.*

Composizione, utilizzo e prestazioni del prodotto restano del tutto invariate.

NOTA BENE

I lotti di prodotto sotto elencati, con marcatura CE secondo la Direttiva IVDD, rimarranno presenti sul mercato fino alla data di scadenza, in accordo all' Articolo 110 dell' IVDR. Se in possesso di questi lotti, si prega di contattare il personale di ELITechGroup per richiedere la relativa precedente revisione delle IFUs.

NUMERO DI CATALOGO	Numero di Lotto	Data di scadenza
RTK600ING	C0724-001	31/10/2025
RTK600ING	C0125-008	31/08/2026

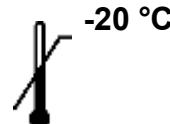
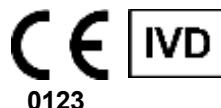


HIV1 ELITe MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e la Real-Time
PCR

REF

RTK600ING



-20 °C

UDI

08033891487126

INDICE

USO PREVISTO

pagina 1

PRINCIPIO DEL SAGGIO

pagina 2

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

pagina 2

MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

pagina 3

MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

pagina 3

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

pagina 4

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

pagina 4

CAMPIONI E CONTROLLI

pagina 5

PROCEDURA ELITe InGenius

pagina 7

PROCEDURA ELITe BeGenius

pagina 13

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

pagina 17

BIBLIOGRAFIA

pagina 28

LIMITI DELLA PROCEDURA

pagina 29

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

pagina 31

LEGENDA DEI SIMBOLI

pagina 34

AVVISO PER L'UTILIZZATORE

pagina 34

AVVISO PER L'ACQUIRENTI: LICENZA LIMITATA

pagina 35

ANNEX: QUICK GUIDE

pagina A

USO PREVISTO

Il prodotto **HIV1 ELITe MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico *in vitro* destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come test di trascrizione inversa e real-time PCR quantitativa degli acidi nucleici per la rilevazione e la quantificazione dell'RNA del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV1), estratto da campioni clinici.

Il saggio è validato in associazione agli strumenti **ELITe InGenius®** e **ELITe BeGenius®**, sistemi integrati e automatizzati per l'estrazione, la trascrizione inversa, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati a partire da campioni di plasma umano raccolto in EDTA o ACD.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella gestione di pazienti HIV1-positivi sottoposti a terapia antivirale.

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

Il prodotto non è destinato all'uso come test di screening o per rilevare la presenza o l'esposizione ad agenti trasmissibili nel sangue, negli emoderivati, nelle cellule, nei tessuti, negli organi o in qualsiasi dei loro derivati al fine di valutarne l'idoneità per la trasfusione, il trapianto o la terapia cellulare. Il prodotto non è destinato all'uso come test diagnostico per confermare la presenza di infezione da HIV1.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è una reazione di trascrizione inversa e Real-Time PCR (metodica one step) quantitativa per l'estrazione, la trascrizione inversa, l'amplificazione e la rilevazione dell'RNA di HIV1 isolato dai campioni clinici, utilizzando una miscela di reazione completa che contiene primer e sonde con tecnologia ELITe MGB® e TaqMan™ MGB®.

Le sonde ELITe MGB e TaqMan MGB sono attivate mediante ibridazione con i prodotti specifici della PCR. **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** monitorano l'incremento di fluorescenza emessa e calcolano i "cicli soglia" (Ct) e le temperature di melting (Tm). La quantità di HIV1 è calcolata sulla base di 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.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

L'**HIV1 ELITe MGB Kit** fornisce i seguenti componenti:

- **HIV1 ELITe MGB Mix**

Questo componente fornisce i seguenti due componenti secondari:

- **HIV1 PCR Mix**, miscela per PCR ottimizzata e stabilizzata, che contiene:

- primer e sonde specifici per l'**HIV1**, il gene codificante la polimerasi (regione dell'integrasi), rilevato dal canale **HIV1**; le sonde sono stabilizzate da MGB®, inattivate dall'Eclipse Dark Quencher® e marcate con il fluoroforo FAM;
- primer e sonde specifici per il **controllo interno (IC)**, per una regione di RNA genomico di fago **MS2**, rilevati dal canale **IC**; la sonda è stabilizzata dall' MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher e marcate con il fluoroforo AquaPhluor® AP525;
- buffer, cloruro di magnesio, nucleotidi trifosfato e DNA polimerasi ad attivazione termica ("hot-start").
- Ogni provetta contiene **600 µL** di soluzione ed è sufficiente per **24 test**, se si processano almeno 5 campioni per sessione.

- **RT EnzymeMix**, una miscela ottimizzata e stabilizzata di enzimi per trascrizione inversa. Ogni provetta contiene **20 µL** di soluzione ed è sufficiente per **48 test**, se si processano almeno 5 campioni per sessione.

HIV1 ELITe MGB Mix contiene reagenti sufficienti per **96 test** su **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius**, usando 20 µL di **HIV1 PCR Mix** e 0,3 µL di **RT EnzymeMix** per reazione.

- **HIV1 ELITe Standard**

Questo componente fornisce i sub-componenti **HIV1 Q-PCR Standard**, quattro soluzioni stabilizzate di DNA plasmidico con la regione amplificata del gene codificante la polimerasi dell'HIV1 a **titolo noto**. **HIV1 ELITe Standard** deve essere utilizzato con la miscela **HIV1 ELITe MGB Mix** su **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** per calcolare la curva di calibrazione del sistema (lotto del prodotto e strumento) per la quantificazione dell'HIV1.

La concentrazione del DNA plasmidico in copie/mL è stata determinata mediante misurazione con uno spettrofotometro UV, ed è stata messa in correlazione con lo standard internazionale "WHO International Standard 4th HIV-1 International Standard" (NIBSC, UK, codice 16/194) con l'ausilio di un fattore di conversione che consente di esprimere la quantificazione dell'HIV1 in unità internazionali/mL (IU/mL).

HIV1 ELITe Standard contiene reagenti sufficienti per eseguire **2 sessioni** su **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius**, usando 20 µL per reazione.

- **HIV1 - ELITe Positive Control**

Questo componente contiene il sub-componente **HIV1 Positive Control**, una soluzione stabilizzata di DNA plasmidico con la regione amplificata del gene codificante la polimerasi dell'HIV1 a **titolo noto**. **HIV1 Positive Control** deve essere utilizzato con la miscela **HIV1 ELITe MGB Mix** su **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** per creare i tracciati dei controlli per la verifica del sistema (lotto del prodotto e strumento).

HIV1 ELITe MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e la Real-Time PCR

REF RTK600ING

L'HIV1 Positive Control contiene reagenti sufficienti per eseguire **8 sessioni su ELITe InGenius e ELITe BeGenius (4 sessioni per provetta)**, usando 20 µL per reazione.

- **HIV1 Internal Control**

Questo componente contiene il sub-componente **HIV1 CPE** (controllo interno esogeno), una soluzione stabilizzata di RNA genomico di fago MS2. L'**HIV1 CPE** viene aggiunto ai reagenti di estrazione per validare i risultati di campioni HIV1 negativi.

HIV1 Internal Control contiene reagenti sufficienti per eseguire **96 test su ELITe InGenius e ELITe BeGenius (12 sessioni per provetta)**, usando 10 µL per reazione.

HIV1 ELITe MGB Kit può essere utilizzato anche in associazione con strumenti equivalenti.

MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Componente	Componente secondario	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
HIV1 ELITe MGB Mix rif. RTS600ING	HIV1 PCR Mix rif. RTS600ING	Miscela di reagenti per trascrizione inversa e real-time PCR in provetta con tappo NATURALE	4 x 600 µL	-
	RT EnzymeMix rif. RTS003-RT	Enzimi per trascrittasi inversa in provetta con tappo con inserto NERO	2 x 20 µL	-
HIV1 ELITe Standard rif. STD600ING	HIV1 Q-PCR Standard 10^5 rif. STD600ING-5	Soluzione di plasmide in provetta con tappo ROSSO	1 x 160 µL	-
	HIV1 Q-PCR Standard 10^4 rif. STD600ING-4	Soluzione di plasmide in provetta con tappo BLU	1 x 160 µL	
	HIV1 Q-PCR Standard 10^3 rif. STD600ING-3	Soluzione di plasmide in provetta con tappo VERDE	1 x 160 µL	
	HIV1 Q-PCR Standard 10^2 rif. STD600ING-2	Soluzione di plasmide in provetta con tappo GIALLO	1 x 160 µL	
HIV1 - ELITe Positive Control rif. CTR600ING	HIV1 Positive Control rif. CTR600ING	Soluzione di plasmide in provetta con tappo NERO	2 x 160 µL	-
HIV1 Internal Control rif. CPE600ING	HIV1 CPE rif. CPE600ING	Soluzione di DNA plasmidici e RNA genomico di fago MS2 in provetta con tappo NATURALE	8 x 160 µL	-

Nota: La concentrazione dei quattro prodotti **Q – PCR Standard** è espressa in copie/reazione (10^5 copie/rxn, 10^4 copie/rxn, 10^3 copie/rxn, 10^2 copie/rxn).

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 (~3.000 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, Germania, rif. 72.694.005).
- Acqua per biologia molecolare.

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione dell'RNA dai campioni e i materiali di consumo **non** sono inclusi in questo prodotto. Per l'estrazione automatica degli acidi nucleici, la trascrizione inversa, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati dei campioni, sono richiesti i seguenti prodotti.

Strumenti e software	Prodotti e reagenti
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, rif. INT030) ELITe InGenius Software versione 1.3.0.17 (o successiva) HIV1 ELITe_STD , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei Calibratori HIV1 ELITe_PC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo HIV1 ELITe_NC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo HIV1 ELITe_PL_600_50 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di Plasma	ELITe InGenius SP 1000 (EG SpA, rif. INT033SP1000) ELITe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, rif. INT032CS) ELITe InGenius PCR Cassette (EG SpA, rif. INT035PCR), 300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., rif. TF-350-L-R-S) solo con ELITe InGenius 1000 µL Filter Tips Tican (Tican, Svizzera, rif. 30180118) solo con ELITe BeGenius ELITe InGenius® Waste Box (EG SpA, rif. F2102-000)

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

Avvertenze e precauzioni generali

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

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 smaltirli. 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.

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

Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.

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

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

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 prodotti di estrazione in modo tale da ridurne al minimo la dispersione nell'ambiente per prevenire il rischio di contaminazione.

Manipolare con attenzione e non aprire mai la PCR Cassette in modo tale da evitare la diffusione dei prodotti della PCR nell'ambiente e la contaminazione dei campioni e dei reagenti.

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Componente (Sub-componente)	Temperatura di conservazione	Uso dopo la prima apertura	Cicli di congelamento/scongelamento	Stabilità sullo strumento (ELITe InGenius e ELITe BeGenius)
HIV1 ELITe MGB Mix (HIV1 PCR Mix)	-20 °C o inferiore (a riparo dalla luce)	60 giorni	Fino a cinque	Non applicabile
HIV1 ELITe MGB Mix (RT EnzymeMix)	-20 °C o inferiore	60 giorni	Fino a dieci cicli, fino a dieci minuti a 2/8 °C	Non applicabile
HIV1 ELITe Standard (HIV1 Q-PCR Standard)	-20 °C o inferiore	60 giorni	Fino a due	2 sessioni separate di 2 ore ciascuna
HIV1 - ELITe Positive Control (HIV1 Positive Control)	-20 °C o inferiore	60 giorni	Fino a quattro	4 sessioni separate di 3 ore ciascuna
HIV1 Internal Control (HIV1 CPE)	-20 °C o inferiore	60 giorni	Fino a sei	6 sessioni separate di 3 ore ciascuna

CAMPIONI E CONTROLLI**Campioni**

Questo prodotto deve essere utilizzato su **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** con i seguenti campioni clinici, identificati e manipolati secondo le linee guida del laboratorio e raccolti, trasportati e conservati nelle condizioni indicate di seguito.

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto/conservazione			
		16/26 °C (temperatura ambiente)	2/8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Plasma	EDTA o ACD	≤2 giorni	≤3 giorni	≤1 mese	≤6 mesi

Si raccomanda di suddividere i campioni in aliquote prima di congelarli, per evitare di ripetere più cicli di congelamento e scongelamento. Se si usano campioni congelati, scongelarli immediatamente prima dell'estrazione in modo da evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

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

Assay Protocol HIV1 ELITe MGB Kit				
Campione	Strumento	Nome Assay Protocol	Report	Caratteristiche
Plasma	ELITe InGenius	HIV1 ELITe_PL_600_50	Positivo / copie/mL / IU/mL / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 600 µL Volume eluizione estratto: 50 µL Controllo interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1,7 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
Plasma	ELITe BeGenius	HIV1 ELITe_Be_PL_600_50	Positivo / copie/mL / IU/mL / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 600 µL Volume eluizione estratto: 50 µL Controllo interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume miscela per PCR: 20 µL Volume campione trattato per PCR: 20 µL

Per tutti i protocolli, si devono trasferire 600 µL di campione in un Extraction tube (per **ELITe InGenius**) o in una provetta Sarstedt da 2 mL (per **ELITe BeGenius**).

Nota: Il trasferimento dei campioni nell' **Extraction Tube** o nella **provetta Sarstedt da 2 mL** potrebbe generare **contaminazione**. Utilizzare lepette appropriate e seguire tutte le raccomandazioni contenute nella sezione "Avvertenze e Precauzioni".

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

Per controllare i dati relativi alle sostanze interferenti, fare riferimento a "Sostanze potenzialmente interferenti" nella sezione Caratteristiche delle prestazioni.

Non utilizzare plasma raccolto in eparina, che è un noto inibitore di trascrizione inversa e PCR.

Calibratori e controlli per PCR

La curva di calibrazione deve essere generata e approvata per ogni lotto di reagente per PCR.

- Per la curva di calibrazione, usare i quattro livelli del prodotto **HIV1 ELITe Standard**, fornito in dotazione con questo kit, con gli Assay Protocol **HIV1 ELITe_STD** o **HIV1 ELITe_Be_STD**.

I risultati dei controlli per PCR devono essere generati e approvati per ogni lotto di reagente per PCR.

- Per il controllo positivo, usare il prodotto **HIV1 - ELITe Positive Control**, fornito in dotazione con questo kit, con gli Assay Protocol **HIV1 ELITe_PC** o **HIV1 ELITe_Be_PC**.
- Per il controllo negativo, usare acqua per biologia molecolare (non fornita in dotazione con questo kit) con gli Assay Protocol **HIV1 ELITe_NC** o **HIV1 ELITe_Be_NC**.

Nota: Gli strumenti **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** consentono di generare e memorizzare la curva di calibrazione e la convalida dei controlli della PCR per ogni lotto di reagente per PCR. Le curve di calibrazione scadono dopo **60 giorni**; trascorso questo termine, è necessario ripetere la calibrazione. I risultati dei controlli per PCR scadono dopo **15 giorni**; trascorso questo termine, è necessario rianalizzare i controlli positivo e negativo.

I calibratori e i controlli per PCR devono essere rianalizzati ogni volta che si verifica uno degli eventi seguenti:

- si utilizza un nuovo lotto di reagenti;
- i risultati delle analisi di controllo della qualità (vedere paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche;
- lo strumento **ELITe InGenius** o **ELITe BeGenius** viene sottoposto a un importante intervento di manutenzione o assistenza.

Controlli di qualità

Si raccomanda la verifica della procedura di estrazione e della PCR. Si possono utilizzare campioni archiviati o materiale di riferimento certificato. Quando disponibili, utilizzare i controlli esterni in conformità con le linee guida delle organizzazioni di accreditamento locali, statali e federali.

PROCEDURA ELITe InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **HIV1 ELITe MGB Kit** con lo strumento **ELITe InGenius** si articola in tre fasi:

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 del campione
		D) Refertazione dei risultati del campione

FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITe InGenius** e selezionare la modalità “**CLOSED**”;
- nel menu “Calibration” nella home page, verificare che i calibratori (**HIV1 Q-PCR Standard**) siano approvati e validi (Status) per il lotto di **HIV1 PCR Mix** da utilizzare. Se non ci sono calibratori validi disponibili per il lotto di **HIV1 PCR Mix**, eseguire la calibrazione come descritto nelle sezioni seguenti;
- nel menu “Controls” nella home page, verificare che i controlli per PCR (**HIV1 Positive Control**, **HIV1 Negative Control**) siano approvati e validi (Status) per il lotto di **HIV1 PCR Mix** da utilizzare. Se non ci sono controlli per PCR validi disponibili per il lotto di **HIV1 PCR Mix**, eseguire i controlli per PCR come descritto nelle sezioni seguenti;
- scegliere il tipo di sessione analitica, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia utente grafica (GUI) per l'allestimento della sessione e utilizzando gli Assay Protocol forniti da EG SpA (vedere “Campioni e controlli”).

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.

FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **HIV1 ELITe MGB Kit** può essere utilizzato su **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 negli Assay Protocol disponibili sullo strumento e vengono richiamati automaticamente nel momento in cui li si seleziona.

Nota: Lo strumento **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:

1. Scongelare le provette di **HIV1 PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (5 o più test per sessione). Mescolare con vortex a bassa velocità la provetta per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o su un blocco freddo.

Nota: Proteggere la miscela **PCR Mix** dalla luce durante lo scongelamento perché questo reagente è fotosensibile.

2. Prelevare le provette di **RT EnzymeMix** necessarie. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **48 test** in condizioni ottimali (5 o più test per sessione). Agitare delicatamente la provetta,

centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o su un blocco freddo.

Nota: Non esporre il prodotto **RT EnzymeMix** a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

3. Preparare una provetta da 2 mL (Sarstedt rif. 72.694.005, non fornita in dotazione con il kit) per la **miscela di reazione completa** ed etichettarla utilizzando un pennarello indelebile.
4. Calcolare i volumi necessari di **HIV1 PCR Mix** e **RT EnzymeMix** per preparare la **miscela di reazione completa** in funzione del numero di campioni (N) da analizzare, come descritto nella tabella sottostante.

Numero di campioni (N)	HIV1 PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0,3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0,3 µL
N = 12	290 µL	4,4 µL

5. Preparare la **miscela di reazione completa** trasferendo nella provetta da 2 mL etichettata i volumi calcolati dei due componenti. Mescolare con vortex a bassa velocità la provetta per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o blocco freddo.

Nota: La **miscela di reazione completa** può essere utilizzata entro 7 ore se mantenuta in un blocco freddo (per 2 sessioni di 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare la terza sessione). La miscela di reazione completa **non** può essere conservata per essere riutilizzata.

Nota: La **miscela di reazione completa** è fotosensibile per cui non esporla alla luce diretta.

Per impostare uno dei quattro tipi di sessione, procedere come segue facendo riferimento alle istruzioni visualizzate sulla GUI :

	A. Sessione con il campione (Estrazione + PCR)	B. Sessione con il campione eluito (Solo PCR)
1	<p>Identificare i campioni e, se necessario, scongelare a temperatura ambiente, agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere su ghiaccio o su un blocco freddo.</p> <p>Per questo test trasferire 600 µL di campione in un Extraction tube precedentemente etichettato. ELITe InGenius lascerà il volume eccedente nella provetta di estrazione.</p> <p>Scongelare le provette contenenti CPE necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerle su ghiaccio o su blocco freddo.</p>	<p>Scongelare a temperatura ambiente la provetta di eluizione contenente gli acidi nucleici estratti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o su blocco freddo.</p>
2	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
3	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 1000 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 50 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 1000 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 50 µL.
4	Per ogni campione, assegnare un "Track" e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un "Track" e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
5	Nella colonna "Assay" selezionare l' Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare l' Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").
6	Verificare che il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" (protocollo) selezionare "PCR Only".
7	Nella colonna "Sample Position" selezionare "Extraction tube" come posizione da cui caricare il campione. Verificare che "Dilution factor" sia "1.7".	Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)". Verificare che "Dilution factor" sia "1.7".
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.

	A. Sessione con il campione (Estrazione + PCR)	B. Sessione con il campione eluito (Solo PCR)
9	Caricare il CPE e la miscela di reazione completa nell'“Inventory Block” facendo riferimento alla “Load List” e inserire il numero di lotto di CPE e PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.	Caricare la miscela di reazione completa nell'“Inventory Block” facendo riferimento alla “Load List” e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Controllare i puntali negli appositi “Tip Racks” dell’“Inventory Area” e sostituire i rack dei puntali se necessario.	Controllare i puntali negli appositi “Tip Racks” dell’“Inventory Area” e sostituire i rack dei puntali se necessario.
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	Caricare la PCR Cassette, le cartucce per estrazione ELITe InGenius SP 1000 e tutti i materiali di consumo richiesti e i campioni <u>da estrarre</u> .	Caricare la PCR Cassette e la provetta di eluizione con i campioni estratti.
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”.

	C. Sessione di calibrazione (Solo PCR)	D. Sessione con il controllo positivo e il controllo negativo (Solo PCR)
1	Scongelare le provette di Q-PCR Standard necessarie (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. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o su blocco freddo.	Scongelare le provette di controllo positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o su blocco freddo. Preparare il controllo negativo trasferendo almeno 50 μ L di acqua per biologia molecolare in una provetta di eluizione, fornita in dotazione con l'ELITe InGenius SP 1000 Consumable Set.
2	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
3	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 1000 μ L e che "Extracted Elute Volume" sia 50 μ L.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 1000 μ L e che "Extracted Elute Volume" sia 50 μ L.
4	Per il Q-PCR Standard, assegnare il "Track", selezionare l'Assay Protocol (vedere "Campioni e controlli") nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto reagente e la data di scadenza.	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli). Inserire il numero di lotto e la data di scadenza del controllo positivo e dell'acqua per biologia molecolare.
5	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) sia selezionato "PCR Only".	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) sia selezionato "PCR Only".
6	Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)".	Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)".
7	Caricare la miscela di reazione completa nell' "Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.	Caricare la miscela di reazione completa nell' "Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell' "Inventory Area" e sostituire i rack dei puntali se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell' "Inventory Area" e sostituire i rack dei puntali se necessario.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Caricare la PCR Cassette e le provette di Q-PCR Standard.	Caricare la PCR Cassette, il controllo positivo e 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".

Una volta completata la sessione, **ELITe InGenius** consente all'operatore di visualizzare, approvare, salvare i risultati, stampare e salvare il report.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il campione estratto residuo presente nella **provetta di eluizione**, tapparlo, identificarlo e conservarlo a -20 ± 10 °C per non più di un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota: La **miscela di reazione completa** può essere conservata a bordo nel blocco freddo per un massimo di 7 ore (per 2 sessioni di 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione). Mescolare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione. La miscela di reazione completa **non** può essere conservata per essere riutilizzata.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il **Q-PCR Standard** residuo, tapparlo e conservarlo a -20° C o a temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita del **Q - PCR Standard**.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il **controllo positivo** residuo, tapparlo e conservarlo a -20° C o a temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita del **controllo positivo**. Il controllo negativo residuo deve essere gettato via.

Nota: Alla fine della sessione, smaltire la **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo secondo le disposizioni legali e ambientali vigenti. Attenzione a non provocare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

STEP 3 - Lettura e approvazione dei risultati

Lo strumento **ELITe InGenius** monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri del Protocol Assay per generare le curve della PCR che vengono poi interpretate ed espresse nei risultati.

Al termine della sessione, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata, sono mostrati i risultati e i dati relativi alla sessione analitica. Da questa schermata è possibile approvare i risultati, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Nota: Lo strumento **ELITe InGenius** può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) che consente di caricare i risultati della sessione nel centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Lo strumento **ELITe InGenius** utilizza il prodotto **HIV1 ELITe MGB Kit** per generare i risultati tramite la seguente procedura:

- A. Validazione della curva di calibrazione
- B. Validazione dei risultati del controllo positivo e del controllo negativo
- C. Validazione dei risultati del campione
- D. Refertazione dei risultati del campione

A. Validazione della curva di calibrazione

L' **ELITe InGenius software** interpreta i risultati della PCR per il target del calibratore con i parametri dell'Assay Protocol **HIV1 ELITe_STD**. Il rapporto tra il Ct risultante e la concentrazione genera la curva di calibrazione.

La curva di calibrazione, specifica per il lotto del reagente di amplificazione, viene registrata nel database ("Calibration") e può essere consultata e approvata da personale avente la 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" appare il messaggio "Failed". In questo caso, i risultati non possono essere approvati e si devono ripetere le reazioni di amplificazione dei calibratori. Inoltre, se inclusi nella sessione, i campioni non vengono quantificati e devono essere ripetuti per generare risultati quantitativi.

B. Validazione dei risultati dell'amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo

L' **ELITe InGenius software** interpreta i risultati della PCR per il target delle reazioni del controllo positivo e del controllo negativo con i parametri degli Assay Protocol **HIV1 ELITe_PC** e **HIV1 ELITe_NC**. I valori di Ct risultanti sono convertiti in concentrazione e devono essere usati per verificare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati del controllo positivo e del controllo negativo, specifici per il lotto dei reagenti per 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 dei controlli positivo e negativo scadono **dopo 15 giorni**.

L' **ELITe InGenius software** elabora i risultati del controllo positivo e del controllo negativo e genera

i grafici dei controlli. Per impostare il grafico dei controlli iniziali si utilizzano quattro risultati approvati del controllo positivo e del controllo negativo. Per i controlli successivi, il software analizza i risultati al fine di assicurare che le prestazioni del sistema rientrino nei criteri di accettazione, mostrati nei tracciati dei grafici dei controlli. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Nota: Se il risultato del controllo positivo o del controllo negativo non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Controls" (Controlli) appare il messaggio "Failed" (Fallito). In tal caso, i risultati non possono essere approvati e si devono ripetere le sessioni del controllo positivo e del controllo negativo.

Nota: Se il risultato del controllo positivo e del controllo negativo non è valido e i campioni erano inclusi nella medesima sessione, i campioni possono essere approvati ma i loro risultati non sono validati. In tal caso, il(i) controllo(i) fallito(i) e i campioni devono essere ripetuti.

C. Validazione dei risultati del campione

Il programma **ELITe InGenius software** interpreta i risultati della PCR per il target (Canale **HIV1**) e per il controllo interno (Canale **IC**) con i parametri dell'Assay Protocol **HIV1 ELITe_PL_600_50**. I valori di Ct risultanti vengono convertiti in concentrazione.

I risultati sono mostrati sulla schermata "Results Display".

I risultati del campione possono essere approvati quando sono vere le tre condizioni riportate nella tabella sottostante.

1) Curva di calibrazione	Stato
HIV1 Q-PCR Standard	APPROVATO
2) Controllo positivo	Stato
HIV1 Positive Control	APPROVATO
3) Controllo negativo	Stato
HIV1 Negative Control	APPROVATO

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

Per ogni campione il sistema indica una combinazione dei seguenti messaggi specificando se l'RNA del patogeno è stato rilevato..

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
HIV1:RNA Rilevato, quantità pari a "XXX" copie/mL o IU/mL	L' HIV1 RNA è stato rilevato nel campione nell'intervallo di misurazione del saggio, nella concentrazione indicata.
HIV1:RNA Rilevato, quantità inferiore a "LLOQ" copie/mL o IU/mL	L' HIV1 RNA è stato rilevato nel campione, al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLOQ) del saggio.
HIV1:RNA Rilevato, quantità oltre a "ULQ" copie/mL o IU/mL	L' HIV1 RNA è stato rilevato nel campione, oltre il limite superiore di quantificazione (ULQ) del saggio.
HIV1:RNA Non rilevato o inferiore a "LoD" copie/mL o IU/mL	L' HIV1 RNA non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per l'RNA target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione (LoD) del saggio.
Non valido - Ripetere test campione	Risultato del saggio non valido per un errore del controllo interno (dovuto ad es. a errata estrazione o effetto carryover degli inibitori). Il test deve essere ripetuto.

Campioni segnalati come "Non valido - Ripetere test campione": in questo caso, l'RNA del controllo interno non è stato rilevato in maniera efficace, probabilmente per problemi nella fase di campionamento, estrazione, trascrizione inversa o PCR (ad es. campionamento sbagliato, degradazione o perdita di RNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono essere all'origine di risultati errati.

Quando il volume è sufficiente, l'eluato 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 partendo dall'estrazione di un nuovo campione in modalità "Extract + PCR" (vedere "Risoluzione dei problemi").

I campioni segnalati come "HIV1: RNA Non rilevato o inferiore a "LoD" copie/mL o IU/mL" sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare l'RNA di HIV1. In questo caso, il campione può essere negativo per l'RNA di HIV1 oppure l'RNA di HIV1 è presente in una concentrazione inferiore al limite di rilevazione del saggio (vedere "Caratteristiche delle prestazioni").

I campioni positivi per l'RNA di HIV1 ad una concentrazione inferiore al limite di rilevazione (e al

limite di quantificazione inferiore) del saggio sono identificati nel report come "HIV1: RNA Rilevato, quantità inferiore a "LLoQ" copie/mL o IU/mL" (vedere "Caratteristiche delle prestazioni").

I campioni positivi per l'RNA di HIV1 all'interno dell'intervallo di misurazione lineare (vedere "Caratteristiche delle prestazioni") sono rilevati e segnalati come "HIV1: RNA Rilevato, quantità pari a "XXX" copie/mL o IU/mL".

I campioni positivi per l'RNA di HIV1 in quantità maggiore del limite superiore di quantificazione sono segnalati come "HIV1: RNA Rilevato, quantità oltre a "ULoQ" copie/mL o IU/mL" e non sono idonei per la quantificazione. Se necessario, il campione può essere diluito prima dell'estrazione o della PCR e ritestato per ottenere risultati all'interno dell'intervallo di misurazione lineare del saggio.

Nota: I risultati ottenuti con questo dosaggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e degli altri esiti di laboratorio.

I risultati del campione 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".

D. Refertazione dei risultati del campione

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

Il "Sample Report" mostra i dettagli dei risultati per campione selezionato (SID).

Il "Track Report" mostra i dettagli dei risultati per track selezionato.

Entrambi i rapporti possono essere stampati e firmati da personale autorizzato.

PROCEDURA ELITe BeGenius

La procedura per l'uso del prodotto **HIV1 ELITe MGB Kit** con lo strumento **ELITe BeGenius** si articola in tre fasi:

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 del campione		
		D) Refertazione dei risultati del campione		

FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITe BeGenius** e selezionare la modalità "CLOSED";
- nel menu "Calibration" nella home page, verificare che i calibratori (**HIV1 Q-PCR Standard**) siano approvati e validi (Status) per il lotto di **HIV1 PCR Mix** da utilizzare. Se non ci sono calibratori validi disponibili per il lotto di **HIV1 PCR Mix**, eseguire la calibrazione come descritto nelle sezioni seguenti;

nel menu "Controls" nella home page, verificare che i controlli per PCR (**HIV1 Positive Control**, **HIV1 Negative Control**) siano approvati e validi (Status) per il lotto di **HIV1 PCR Mix** da utilizzare. Se non ci sono controlli per PCR validi disponibili per il lotto di **HIV1 PCR Mix**, eseguire i controlli per PCR come descritto nelle sezioni seguenti;

- scegliere il tipo di sessione analitica, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia utente grafica (GUI) per l'allestimento della sessione e utilizzando gli Assay Protocol forniti da EG SpA (vedere "Campioni e controlli").

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.

FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **HIV1 ELITe MGB Kit** può essere utilizzato su **ELITe BeGenius** per eseguire:
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 vengono richiamati automaticamente nel momento in cui li si seleziona.

Nota: Lo strumento **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:

1. Scongelare le provette di **HIV1 PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (5 o più test per sessione). Mescolare con vortex a bassa velocità la provetta per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o su blocco freddo .

Nota: Proteggere la miscela **PCR Mix** dalla luce durante lo scongelamento perché questo reagente è fotosensibile.

2. Prelevare le provette di **RT EnzymeMix** necessarie. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **48 test** in condizioni ottimali (5 o più test per sessione). Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o su blocco freddo .

Nota: Non esporre il prodotto **RT EnzymeMix** a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

3. Preparare una provetta da 2 mL (Sarstedt rif. 72.694.005, non fornita in dotazione con il kit) per la **miscela di reazione completa** ed etichettarla utilizzando un pennarello indelebile.
4. Calcolare i volumi necessari di **HIV1 PCR Mix** e **RT EnzymeMix** per preparare la **miscela di reazione completa** in funzione del numero di campioni (N) da analizzare, come descritto nella tabella sottostante.

Numero di campioni (N)	HIV1 PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0,3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0,3 µL
N = 12	290 µL	4,4 µL
13 ≤ N ≤ 18	(N + 3) x 20 µL	(N + 3) x 0,3 µL
19 ≤ N ≤ 23	(N + 4) x 20 µL	(N + 4) x 0,3 µL
N = 24	580 µL	8,7 µL

5. Preparare la **miscela di reazione completa** trasferendo nella provetta da 2 mL etichettata i volumi calcolati dei due componenti. Mescolare con vortex a bassa velocità la provetta per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o blocco freddo .

Nota: La **miscela di reazione completa** può essere utilizzata entro **7 ore** se mantenuta in blocco freddo (per 2 sessioni di 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare la terza sessione). La miscela di reazione completa **non** può essere conservata per essere riutilizzata.

Nota: La **miscela di reazione completa** è fotosensibile per cui non esporla alla luce diretta.

Per impostare uno dei quattro tipi di sessione, procedere come segue facendo riferimento alle istruzioni visualizzate sulla GUI:

	A. Sessione con il campione (Estrazione + PCR)	B. Sessione con il campione eluito (Solo PCR)
1	<p>Identificare i campioni e, se necessario, scongelare a temperatura ambiente, agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere su ghiaccio o su un blocco freddo.</p> <p>Per questo test trasferire 600 µL di campione in una provetta Sarstedt da 2 mL (non fornita) precedentemente etichettata. ELITe BeGenius lascerà il volume eccedente nella provetta Sarstedt da 2 mL.</p> <p>Scongelare le provette contenenti CPE necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerle su ghiaccio o su blocco freddo.</p>	<p>Se necessario, scongelare a temperatura ambiente le provette di eluizione contenenti gli acidi nucleici estratti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o su blocco freddo.</p>
2	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
3	Rimuovere tutti i Rack dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i "Rack" dalle "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".
5	Caricare i campioni nel "Sample Rack". (Nota: quando si caricano tubi secondari "2 mL Tubes", utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack").	Caricare i campioni nell"Elution Rack".
6	<p>Inserire il "Sample Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 5" (L5).</p> <p>Inserire il "Sample ID" (SID) per ogni "Position" utilizzata. (Se si caricano tubi secondari, contrassegnare "2 mL Tube". Se i tubi secondari non hanno codice a barre, digitare manualmente il "Sample ID").</p>	<p>Inserire l"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3).</p> <p>Per ogni "Position" inserire il "Sample ID", la "Sample matrix", l"Extraction kit" e l"Extracted eluate vol." (volume eluato).</p>
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 600 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 50 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 600 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 50 µL.
9	Nella colonna "Assay" selezionare l' Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare l' Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.	Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.
12	Caricare le "Elution tubes" nell"Elution Rack" (le provette di eluizione possono essere etichettate con il codice a barre per migliorarne la tracciabilità).	Non applicabile.
13	Inserire l"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura utilizzando la "Lane 2" (L2).	Non applicabile.
15	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile.
16	Caricare il CPE e la miscela di reazione completa nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la miscela di reazione completa nel "Reagent/Elution Rack".
17	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Per ogni PCR Mix e/o CPE, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Per ogni PCR Mix, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).
18	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
19	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell"Inventory Area" e sostituire i rack se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell"Inventory Area" e sostituire i rack se necessario.
20	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
21	Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" nell'Inventory Area.	Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" nell'Inventory Area.
22	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
23	Caricare l"Extraction Rack " con le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 1000" e i materiali di consumo per l'estrazione richiesti.	Non applicabile.
24	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
25	Premere "Start".	Premere "Start".

	C. Sessione di calibrazione (Solo PCR)	D. Sessione con il controllo positivo e il controllo negativo (Solo PCR)
1	Scongelare le provette di Q-PCR Standard necessarie (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) per 30 minuti a temperatura ambiente. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o su blocco freddo.	Scongelare le provette di controllo positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o su blocco freddo. Preparare il controllo negativo trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in una provetta di eluizione, fornita in dotazione con l'ELITe InGenius SP 1000 Consumable Set.
2	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
3	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i "Rack" dalle "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 controllo negativo nell'"Elution Rack".
6	Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" inserire "Reagent name" e "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).	Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" inserire "Reagent name" e "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare l'"Extraction Input Volume" (600 µL) e l'"Extracted Elute Volume" (50 µL).	Verificare l'"Extraction Input Volume" (600 µL) e l'"Extracted Elute Volume" (50 µL).
9	Nella colonna "Assay" selezionare l' Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare l' Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Caricare la miscela di reazione completa nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la miscela di reazione completa nel "Reagent/Elution Rack".
12	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 2" (L2). Per ogni PCR Mix, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 2" (L2). Per ogni PCR Mix, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).
13	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
14	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" (area reagenti) e sostituire i rack se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" (area reagenti) e sostituire i rack se necessario.
15	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
16	Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" nell'Inventory Area.	Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" nell'Inventory Area.
	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
17	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
18	Premere "Start".	Premere "Start".

Una volta completata la sessione, **ELITe BeGenius** consente all'operatore di visualizzare, approvare, salvare i risultati, stampare e salvare il report.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il campione estratto residuo presente nella **provetta di eluizione**, tapparlo, identificarlo e conservarlo a -20 ± 10 °C per non più di un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota: La **miscela di reazione completa** può essere conservata a bordo nel blocco freddo per un massimo di 7 ore (per 2 sessioni di 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione). Agitare

delicatamente la provetta, quindi centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo prima di cominciare la successiva sessione. La miscela di reazione completa **non** può essere conservata per essere riutilizzata.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il **Q-PCR Standard** residuo, tapparlo e conservarlo a -20° C o a temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita del **Q - PCR Standard**.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il **controllo positivo** residuo, tapparlo e conservarlo a -20° C o a temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita del controllo positivo. Smaltire il controllo negativo residuo.

Nota: Alla fine della sessione, smaltire la **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo secondo le disposizioni legali e ambientali vigenti. Attenzione a non provocare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

STEP 3 - Lettura e approvazione dei risultati

Lo strumento **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 le curve della PCR che vengono poi interpretate ed espresse nei risultati.

Al termine della sessione, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata, sono mostrati i risultati e i dati relativi alla sessione analitica. Da questa schermata è possibile approvare i risultati, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Nota: Lo strumento **ELITe BeGenius** può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) che consente di caricare i risultati della sessione nel centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Lo strumento **ELITe BeGenius** utilizza il prodotto **HIV1 ELITe MGB Kit** per generare i risultati tramite la seguente procedura:

- A. Validazione della curva di calibrazione
- B. Validazione dei risultati del controllo positivo e del controllo negativo
- C. Validazione dei risultati del campione
- D. Refertazione dei risultati del campione

Nota: Per i dettagli, fare riferimento allo stesso paragrafo della **Procedura ELITe InGenius**.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Limite di rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) del saggio è stato determinato sullo strumento **ELITe InGenius** mediante analisi di un pannello di campioni di plasma negativo per HIV1 raccolto in ACD, positivizzato con un materiale di riferimento per HIV1 (4th WHO International Standard, NIBSC). È stata eseguita l'analisi di regressione con modello Probit sui risultati ed è stato stimato il LoD come la concentrazione del campione che ha una probabilità del 95% di risultare positivo.

I risultati sono illustrati nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione (IU/mL) per campioni di plasma raccolto in ACD ed ELITe InGenius			
Target	LoD	Intervallo di confidenza 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
HIV1	60	40	122

Il LoD inteso come copie/mL per campioni di plasma raccolti in ACD è stato calcolato applicando lo specifico fattore di conversione indicato (2,3 IU/copie). Si riporta di seguito la sensibilità analitica espressa in copie/mL.

Limite di rilevazione (copie/mL) per campioni di plasma raccolto in ACD ed ELITe InGenius			
Target	LoD	Intervallo di confidenza 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
HIV1	26	17	53

Il valore calcolato di LoD è stato verificato mediante analisi su **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** di un pool di plasma raccolto in ACD e di un pool di plasma raccolto in EDTA positivizzati con materiale di riferimento certificato per HIV1 alla concentrazione dichiarata.

I risultati ottenuti hanno confermato la concentrazione dichiarata per il target di HIV1 ELITe MGB Kit su entrambi gli strumenti **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius**.

Equivalenza delle matrici: Plasma raccolto in EDTA e Plasma raccolto in ACD

L'equivalenza delle matrici del saggio è stata verificata utilizzando campioni appaiati (stesso donatore) di plasma raccolti in ACD e in EDTA su **ELITe InGenius**.

Per 30 campioni testati negativi per HIV con un saggio immunoenzimatico CE IVD, è stata valutata la percentuale di concordanza negativa (NPA) e il coefficiente di variabilità (%CV) dei valori di Ct del controllo interno.

I risultati sono illustrati nelle tabelle seguenti.

Campione	N	Positivi	Negativi	NPA	%CV Ct IC	%CV totale Ct IC
Plasma in EDTA	30	1	29	96,7%	1,80	1,81
Plasma in ACD		0	30		1,81	
Campione	N	Positivi	Negativi	PPA	%CV Ct HIV1	%CV totale Ct HIV1
Plasma in EDTA	30	30	0	100%	1,81	1,53
Plasma in ACD		0	30		1,81	

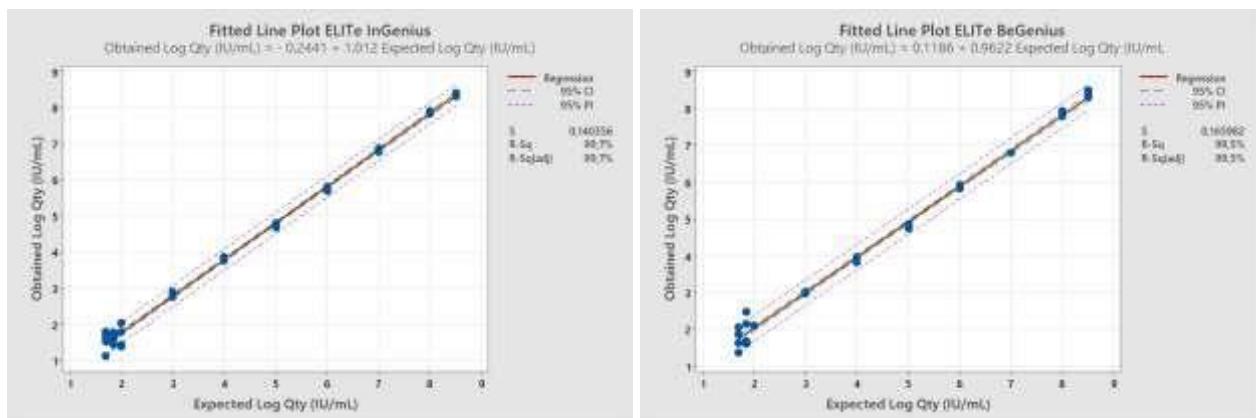
In queste analisi, 30 campioni appaiati di plasma raccolti in EDTA e in ACD hanno evidenziato prestazioni equivalenti quando processati con il prodotto HIV1 ELITe MGB® Kit in associazione con il ELITe InGenius.

Ulteriori analisi sull'equivalenza delle matrici sono state eseguite nell'ambito dello studio riguardante l'intervallo di misurazione lineare riportato nella sezione seguente.

Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare del dosaggio è stato determinato in associazione a campioni di plasma su **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** utilizzando un pannello di diluizioni del materiale di riferimento di HIV1 Gruppo M Sottotipo B (ZeptoMetrix) in campioni negativi di plasma in EDTA.

I risultati sono illustrati nella figura seguente.



L'intervallo di misurazione lineare in copie/mL per campioni di plasma in EDTA è stato calcolato applicando lo specifico fattore di conversione riportato nella sezione seguente.

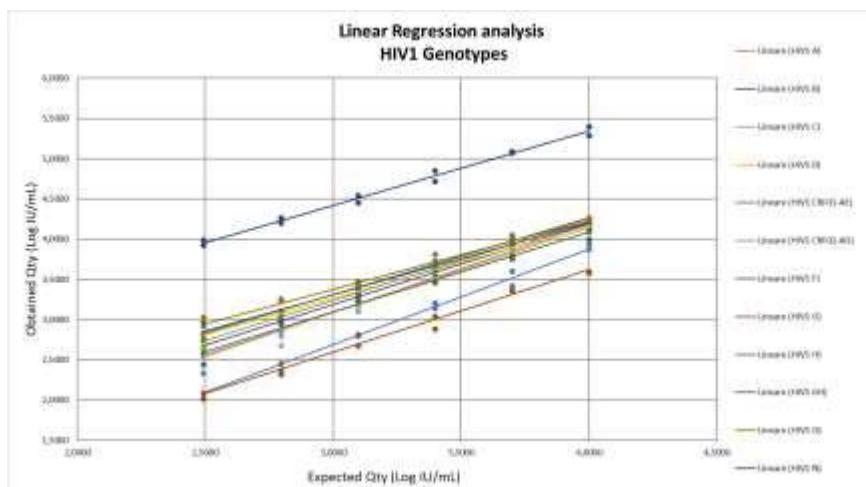
I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare per campioni di plasma in EDTA ed ELITe InGenius

Limite inferiore	Limite superiore
60 IU/mL	319.300.795 IU/mL
26 copie/ml	138.826.433 copie/ml

Per i genotipi principali di HIV (gruppo M sottotipo A, C, D, CRF01-AE, F, G, GH, H, CRF02-AG, gruppo O e gruppo N), l'intervallo di misurazione lineare è stato verificato analizzando campioni negativi di plasma in EDTA positivizzati con materiale di riferimento per HIV (pannello di sottotipi di HIV-1, Istituto di Virologia, Ospedale Universitario di Erlangen).

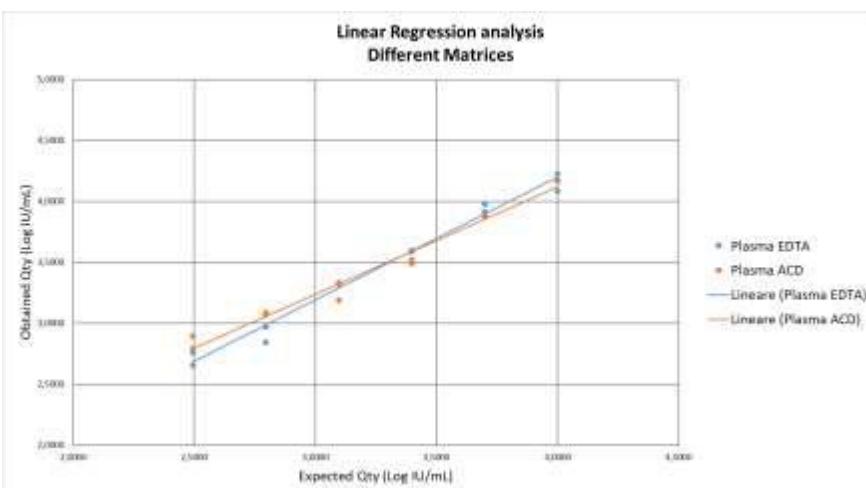
I risultati sono illustrati nella figura seguente.



La linearità del saggio è stata confermata per i genotipi principali di HIV1 (gruppo M sottotipo A, C, D, CRF01-AE, F, G, GH, H, CRF02-AG, gruppo O e gruppo N): il valore R2 è compreso tra 0,972 e 0,999 e i risultati quantitativi sono risultati compresi entro $\pm 0,5$ Log IU/mL, ad eccezione del gruppo N di HIV1 che è stato sovrastimato di circa 1,5 Log IU/mL rispetto al valore teorico. Tuttavia, questo campione è stato sovrastimato anche da "cobas® HIV-1 for use on the 6800 Systems" (Roche Diagnostics).

L'intervallo di misurazione lineare è stato verificato mediante analisi di campioni negativi di plasma raccolti in EDTA e in ACD positivizzati con materiale di riferimento per HIV1 gruppo M sottotipo B (Zeptometrix). I risultati corrispondenti al test con plasma raccolto in EDTA sono stati riportati a titolo di riferimento.

I risultati sono illustrati nella figura seguente.



La linearità del saggio è stata confermata per i campioni di plasma raccolti in EDTA e in ACD dando risultati quantitativi entro $\pm 0,5$ Log IU/mL e R2 rispettivamente di 0,984 e 0,980.

Incertezza della curva dello standard

HIV1 ELITe MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e la Real-Time PCR

REF RTK600ING

Il valore di incertezza della curva dello standard è stato calcolato combinando gli errori casuali (SD) delle quantificazioni di tutti i livelli e moltiplicando per il fattore di copertura $k = 2$ (incertezza combinata estesa) ed è pari a 0,1348 Log copie/reazione.

Livelli della curva dello standard	Teorico	SD	Incertezza combinata estesa
	Log c/rxn		
HIV1 Standard 10^5	5,0000	0,0535	
HIV1 Standard 10^4	4,0000	0,0602	
HIV1 Standard 10^3	3,0000	0,0600	
HIV1 Standard 10^2	2,0000	0,0899	0,1348

HIV1 ELITe MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e la Real-Time PCR

REF RTK600ING

Inclusività: Efficienza della rilevazione e della quantificazione su differenti genotipi

L'inclusività del saggio, come efficienza della rilevazione per differenti genotipi di HIV1, è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nei database dei nucleotidi. L'analisi ha dimostrato la conservazione della sequenza e l'assenza di mutazioni significative. Pertanto, si prevede la rilevazione efficiente di differenti ceppi o isolati.

L'inclusività del saggio è stata verificata testando due pannelli di materiali di riferimento per HIV (WHO ed Erlangen) a 3x LoD.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

1° Pannello di riferimento internazionale dell'OMS per CRF di HIV-1			
Sottotipo/gruppo	Ceppo	Pos./Rep.	Esito
Gruppo O	BCF01	3 / 3	HIV1 rilevato
CRF11 GJ	MP1307	3 / 3	HIV1 rilevato
CRF02-AG	P1261	3 / 3	HIV1 rilevato
CRF01-AE	CM244	3 / 3	HIV1 rilevato
CRF01 A,G,J,U	96CM1849	3 / 3	HIV1 rilevato
CRF BG 24	X2456	3 / 3	HIV1 rilevato
Sottotipo J	SE9173	3 / 3	HIV1 rilevato
Sottotipo C	X1936	3 / 3	HIV1 rilevato
Sottotipo G	P962	3 / 3	HIV1 rilevato
CRF ADG	24203	3 / 3	HIV1 rilevato

Pannello sottotipo HIV-1 di Erlangen			
ID campione	Ceppo	Pos./Rep.	Esito
HIV1 A1	92UG029	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 A2	00KE_KER2018	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 B1	92TH026	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 B2	90TH_BK132	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 C1	92BR025	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 C2	99ET_14	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 D1	92UG021	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 D2	92UG035	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 D3	92UG024	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 E1	92TH022	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 F1	93BR029	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 F2	93BR020	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 G	RU570	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 H	VI525	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 GH	VI557	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 AG1	01CM.0005BBY	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 AG2	01CM.0008BBY	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 N	YBF30	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 O1	MVP5180	3/3	HIV1 rilevato
HIV1 O2	CA-9	3/3	HIV1 rilevato

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati come positivi e quantificati entro $\pm 0,5$ Log utilizzando HIV1 ELITe MGB® Kit.

Marcatori potenzialmente interferenti: Crossreattività

La potenziale crossreattività con altri microrganismi che si possono rilevare nei campioni clinici di plasma è stata valutata mediante analisi *in silico*. L'analisi non ha evidenziato omologie significative con altri organismi diversi da quello di interesse (virus, batteri, protozoi e funghi), a eccezione di HIV2, il microrganismo più simile a HIV1, che ha un'omologia pari a circa l'80%. Pertanto, si deve prevedere la crossreattività.

La mancata crossreattività con organismi potenzialmente interferenti è stata verificata anche mediante l'analisi di un pannello di organismi diversi da quello di interesse (ATCC, NIBSC, ZeptoMetrix) ad alto titolo.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

ID campione	HIV1 Pos./Rep.	Esito
HIV2	3 / 3	Crossreattività
HTLV1	0 / 6	Nessuna crossreattività
HTLV2	0 / 6	Nessuna crossreattività
CMV	0 / 3	Nessuna crossreattività
EBV	0 / 3	Nessuna crossreattività
EBV	0 / 3	Nessuna crossreattività
HBV	0 / 3	Nessuna crossreattività
HCV	0 / 3	Nessuna crossreattività
HEV	0 / 3	Nessuna crossreattività
HSV1	0 / 3	Nessuna crossreattività
HSV2	0 / 3	Nessuna crossreattività
HHV6	0 / 3	Nessuna crossreattività
VZV	0 / 3	Nessuna crossreattività
Flu A	0 / 3	Nessuna crossreattività
Flu B	0 / 3	Nessuna crossreattività
Flu A	0 / 3	Nessuna crossreattività
Flu B	0 / 3	Nessuna crossreattività
RSV	0 / 3	Nessuna crossreattività
DV3	0 / 3	Nessuna crossreattività
DV3	0 / 3	Nessuna crossreattività
PVB19	0 / 3	Nessuna crossreattività
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 / 3	Nessuna crossreattività
<i>Candida albicans</i>	0 / 3	Nessuna crossreattività

Tutti i marcatori potenzialmente interferenti analizzati non hanno evidenziato alcuna crossreattività per l'amplificazione del target HIV1 utilizzando HIV1 ELITe MGB Kit, eccetto HIV2 che può dare risultati positivi con una quantificazione 2.000 volte inferiore al titolo teorico di HIV2.

Marcatori potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione di organismi diversi da quello di interesse che si possono rilevare nei campioni clinici è stata valutata per il saggio mediante l'analisi di un pannello di organismi diversi da quello di interesse di vari fornitori (ATCC, NIBSC, ZeptoMetrix).

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

ID campione	HIV1 Pos./Rep.	Esito
HIV2	3 / 3	Nessuna interferenza
HTLV1	3 / 3	Nessuna interferenza
HTLV2	3 / 3	Nessuna interferenza
CMV	3 / 3	Nessuna interferenza
EBV	3 / 3	Nessuna interferenza
EBV	3 / 3	Nessuna interferenza
HBV	3 / 3	Nessuna interferenza
HCV	3 / 3	Nessuna interferenza
HEV	3 / 3	Nessuna interferenza
HSV1	3 / 3	Nessuna interferenza
HSV2	3 / 3	Nessuna interferenza
HHV6	3 / 3	Nessuna interferenza
VZV	3 / 3	Nessuna interferenza
Flu A	3 / 3	Nessuna interferenza
Flu B	3 / 3	Nessuna interferenza
Flu A	3 / 3	Nessuna interferenza
Flu B	3 / 3	Nessuna interferenza
RSV	3 / 3	Nessuna interferenza
DV3	3 / 3	Nessuna interferenza
DV3	3 / 3	Nessuna interferenza
PVB19	3 / 3	Nessuna interferenza
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 / 3	Nessuna interferenza
<i>Candida albicans</i>	3 / 3	Nessuna interferenza

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti analizzati non hanno evidenziato alcuna inibizione dell'amplificazione del target HIV1 quando analizzati con HIV1 ELITe MGB Kit.

Nota: Sebbene non inibisca la rilevazione di HIV1, la presenza di HIV2 potrebbe causare l'over-quantificazione di HIV1 in campioni provenienti da individui con doppia infezione da HIV1 e HIV2 a causa della crossreattività di HIV2.

Sostanze potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione di sostanze interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero essere presenti nei campioni clinici è stata valutata per il saggio mediante l'analisi di un pannello di sostanze a concentrazioni rilevanti in campioni di plasma positivi per il target.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	HIV1 Pos./Rep.	Esito
EDTA	3 / 3	Nessuna interferenza
Eparina	0 / 3	Interferenza
Sangue emolitico elevato	3 / 3	Nessuna interferenza
Plasma lipemico	3 / 3	Nessuna interferenza
Plasma itterico	3 / 3	Nessuna interferenza
Ganciclovir	3 / 3	Nessuna interferenza
Azitromicina	3 / 3	Nessuna interferenza
Abacavir	3 / 3	Nessuna interferenza
Emtricitabina	3 / 3	Nessuna interferenza
Lamivudina	3 / 3	Nessuna interferenza
Tenofovir	3 / 3	Nessuna interferenza
Doravirina	3 / 3	Nessuna interferenza
Efavirenz	3 / 3	Nessuna interferenza
Rilpivirina	3 / 3	Nessuna interferenza
Atazanavir	3 / 3	Nessuna interferenza
Darunavir	3 / 3	Nessuna interferenza
Bictegravir	3 / 3	Nessuna interferenza
Elvitegravir	3 / 3	Nessuna interferenza
Maraviroc	3 / 3	Nessuna interferenza

La maggior parte delle sostanze testate non interferisce con l'amplificazione del target HIV1 o del controllo interno.

È stato confermato che l'eparina è in grado di inibire l'amplificazione di HIV1, tuttavia grazie al limite di Ct per il controllo interno (Ct IC <33), si sono ottenuti risultati del campione "non validi" e non "falsi negativi".

Contaminazione crociata

La possibile contaminazione crociata durante l'analisi è stata valutata analizzando 30 campioni di plasma negativi per l'RNA di HIV1 alternati a 30 campioni di plasma positivizzati con materiale di riferimento certificato per HIV1 (Zeptometrix) ad alto titolo.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campioni	N	Negativi	Positivi
Plasma in ACD positivizzato a 1×10^6 HIV1 IU/mL	30	0	30
Plasma in ACD negativo per HIV1	30	30	0

In questo test con HIV1 ELITe MGB Kit, non sono state rilevate crosscontaminazioni tra le sessioni, né al loro interno.

Tasso totale di errore di sistema

Il tasso totale di errore di sistema per il saggio è stato valutato sugli strumenti ELITe InGenius e ELITe BeGenius analizzando un pannello di campioni positivizzati con un materiale di riferimento certificato (PEI) alla concentrazione di 3 x LOD (circa 180 IU/mL).

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

ELITe InGenius - Tasso totale di errore di sistema					
Campioni	N	Teorico UI/mL	Negativi	Positivi	Tasso totale di errore di sistema
Plasma raccolto in EDTA positivizzato con HIV1	100	180	0	100	0%
Plasma raccolto in ACD positivizzato con HIV1	30	180	0	30	0%

HIV1 ELITe MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e la Real-Time PCR

REF RTK600ING

ELITe BeGenius - Tasso totale di errore di sistema					
Campioni	N	Teorico UI/mL	Negativi	Positivi	Tasso totale di errore di sistema
Plasma raccolto in EDTA positivizzato con HIV1	100	180	0	100	0%

Nel test con HIV1 ELITe MGB Kit, nessuno dei campioni positivi per HIV1 ha fornito risultati falsi negativi. In questo test, il tasso totale di errore di sistema è stato pari allo 0%.

Ripetibilità

La ripetibilità intra-sessione e inter-sessione del saggio è stata valutata sugli strumenti ELITe InGenius e ELITe BeGenius analizzando un pannello di campioni di plasma, inclusi un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento certificato per HIV1 (4th WHO International Standard, NIBSC).

Un esempio dei risultati di ripetibilità intra-sessione (in un giorno) è illustrato nelle tabelle seguenti.

Ripetibilità intra-sessione con ELITe InGenius (Giorno 1)								
Campione	HIV1					Controllo interno		
	N	Ct media	SD	% CV	% Concordanza	Ct media	SD	% CV
Negativi	8	Indet.	-	-	100%	29,15	0,30	1,04
3x LoD	8	35,02	0,40	1,14	100%			
10x LoD	8	33,67	0,46	1,36	100%			

Ripetibilità intra-sessione con ELITe BeGenius (Giorno 1)								
Campione	HIV1					Controllo interno		
	N	Ct media	SD	% CV	% Concordanza	Ct media	SD	% CV
Negativi	8	Indet.	-	-	100%	29,71	0,40	1,34
3x LoD	8	35,90	0,72	2,02	100%			
10x LoD	8	33,94	0,62	1,83	100%			

Un esempio dei risultati di ripetibilità inter-sessione (in due giorni) è illustrato nelle tabelle seguenti.

Ripetibilità inter-sessione con ELITe InGenius (Giorno1 + Giorno2)								
Campione	HIV1					Controllo interno		
	N	Ct media	SD	% CV	% Concordanza	Ct media	SD	% CV
Negativi	16	Indet.	-	-	100%	29,05	0,32	1,10
3x LoD	16	35,09	0,27	0,78	100%			
10x LoD	16	33,68	0,36	1,07	100%			

Ripetibilità inter-sessione con ELITe BeGenius (Giorno1 + Giorno2)								
Campione	HIV1					Controllo interno		
	N	Ct media	SD	% CV	% Concordanza	Ct media	SD	% CV
Negativi	16	Indet.	-	-	100%	29,78	0,32	1,06
3x LoD	16	35,99	0,59	1,64	100%			
10x LoD	16	34,11	0,51	1,49	100%			

Nel test di ripetibilità, HIV1 ELITe MGB Kit ha rilevato e mostrato una variabilità massima dei valori Ct del target espressa come %CV pari a 1,64%.

Riproducibilità

La riproducibilità inter-sito del saggio è stata valutata sullo strumento ELITe InGenius analizzando un pannello di campioni di plasma negativi o positivizzati con HIV1 (4th WHO International Standard, NIBSC).

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi della riproducibilità inter-sito (in tre siti).

Riproducibilità inter-sito con ELITe InGenius								
Campione	HIV1					Controllo interno		
	N	Ct media	SD	% CV	% Concordanza	Ct media	SD	% CV
Negativi	24	Indet.	-	-	100%	29,51	0,40	1,36
3x LoD	24	35,01	0,66	1,88	100%			
10x LoD	24	33,34	0,23	0,68	100%			

Nel test di riproducibilità inter-sito, HIV1 ELITe MGB Kit ha rilevato il target e mostrato una variabilità

HIV1 ELITe MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e la Real-Time PCR

REF RTK600ING

massima dei valori Ct del target espressa come %CV pari a 1,88%.

La riproducibilità del saggio è stata valutata sugli strumenti ELITe BeGenius e ELITe InGenius analizzando un pannello di campioni di plasma negativi o positivizzati con HIV1 (4th WHO International Standard, NIBSC).

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi della riproducibilità inter-strumento (di tre strumenti).

Riproducibilità inter-strumento con ELITe InGenius								
Campione	HIV1					Controllo interno		
	N	Ct media	SD	% CV	% Concordanza	Ct media	SD	% CV
Negativi	24	Indet.	-	-	100%	29,36	0,61	2,09
3x LoD	24	35,17	0,47	1,34	100%			
10x LoD	24	33,76	0,30	0,88	100%			

Riproducibilità inter-strumento con ELITe BeGenius								
Campione	HIV1					Controllo interno		
	N	Ct media	SD	% CV	% Concordanza	Ct media	SD	% CV
Negativi	24	Indet.	-	-	100%	29,97	0,74	2,47
3 x LoD	24	35,86	0,59	1,65	100%			
10 x LoD	24	34,12	0,41	1,19	100%			

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi della riproducibilità inter-lotto (su tre lotti).

Riproducibilità inter-lotto con ELITe InGenius								
Campione	HIV1					Controllo interno		
	N	Ct media	SD	% CV	% Concordanza	Ct media	SD	% CV
Negativi	48	Indet.	-	-	100%	29,17	0,68	2,34
3 x LoD	48	35,14	0,63	1,81	100%			
10 x LoD	48	33,64	0,41	1,22	100%			

Riproducibilità inter-lotto con ELITe BeGenius								
Campione	HIV1					Controllo interno		
	N	Ct media	SD	% CV	% Concordanza	Ct media	SD	% CV
Negativi	48	Indet.	-	-	100%	29,92	0,56	1,87
3 x LoD	48	35,79	0,67	1,87	100%			
10 x LoD	48	34,06	0,33	0,98	100%			

Nel test di riproducibilità inter-strumento e inter-lotto, HIV1 ELITe MGB Kit ha rilevato correttamente tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori Ct del target espressa come %CV pari a 1,87%.

Fattore di conversione alle Unità Internazionali

Il fattore di conversione per riportare i risultati quantitativi in Unità Internazionali/mL a partire da copie/mL è stato calcolato utilizzando il materiale di riferimento calibrato certificato "4th WHO HIV1 International Standard" (NIBSC).

Il fattore di conversione è stato determinato pari a 2,3 IU/copia.

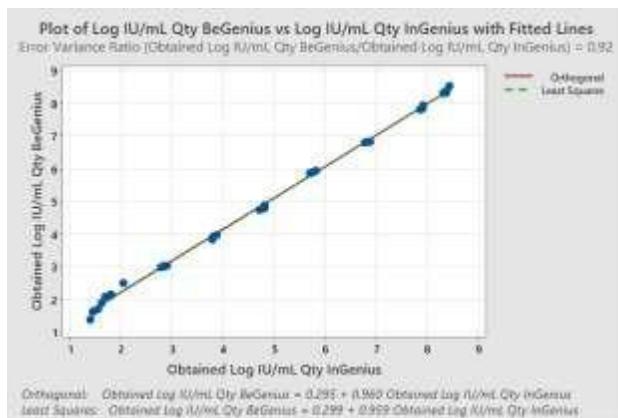
Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

Fattore di conversione in unità internazionali, Fc = 2,3 IU/copia						
Campione		Risultato			Differenza log (rif. - test)	
UI/ml	Log IU/ml	N	C./ml media	UI/ml media	Log UI/ml media	
10.000	4,0000	27	4.052	9.320	3,9623	+0,0377
3.162	3,5000	26	1.379	3.172	3,4913	+0,0087
1.000	3,0000	27	500	1.149	3,0494	-0,0494
316	2,5000	27	156	359	2,5366	-0,0366

Essendo stata precedentemente dimostrata l'equivalenza tra i campioni di plasma raccolti in EDTA e in ACD, il fattore di conversione può essere applicato alle due matrici.

Il fattore di conversione per riportare i risultati quantitativi in Unità Internazionali/mL a partire da copie/mL è stato verificato sugli strumenti ELITe BeGenius ed ELITe InGenius utilizzando il materiale di riferimento calibrato certificato "4th WHO HIV1 International Standard" (NIBSC).

I risultati ottenuti sono stati analizzati tramite regressione ortogonale e lineare allo scopo di calcolare la correlazione.



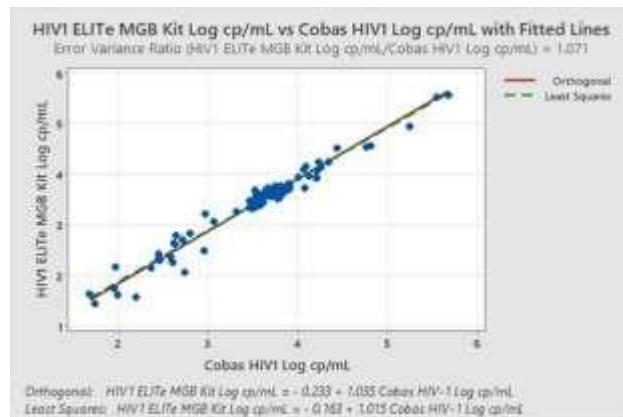
L'analisi di regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a -0,066 (95% IC: -0,194; 0,061) e una pendenza pari a 0,998 (95% CI: 0,953; 1,042). L'analisi di regressione lineare ha generato un R^2 di 0,991.

Sensibilità diagnostica: correlazione metodologica

La sensibilità diagnostica del saggio, valutata mediante analisi di correlazione di diversi metodi, è stata valutata in tre laboratori diversi sullo strumento **ELITe InGenius** analizzando campioni clinici positivi per l'RNA di HIV1 di pazienti sottoposti a terapia antivirale, con carico virale compreso nell'intervallo di misurazione di HIV1 ELITe MBG Kit e dei metodi di riferimento di diagnostica molecolare marcati CE IVD. I risultati ottenuti con HIV1 ELITe MBG Kit e con il metodo di riferimento sono stati sottoposti ad analisi di regressione ortogonale e lineare.

Lo studio di correlazione è stato eseguito in un laboratorio su 87 campioni clinici di plasma raccolti in EDTA positivi per l'RNA di HIV1 utilizzando come metodo riferimento il "cobas® HIV-1 for use on the 6800 System".

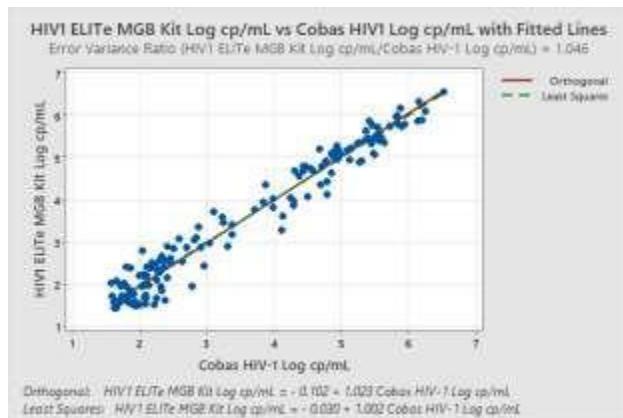
I risultati sono sintetizzati nelle figure sottostanti.



In questo test, l'analisi di regressione ortogonale ha generato una pendenza pari a 1,035 (95% CI: 0,991; 1,078) e un'intercetta pari a -0,233 (95% CI: -0,390; -0,075). L'analisi di regressione lineare ha generato un R^2 di 0,962.

Lo studio di correlazione è stato eseguito in due altri siti su 150 campioni clinici di plasma raccolti in EDTA positivi per l'RNA di HIV1 utilizzando come metodo di riferimento il "cobas® HIV-1 for use on the 4800 System".

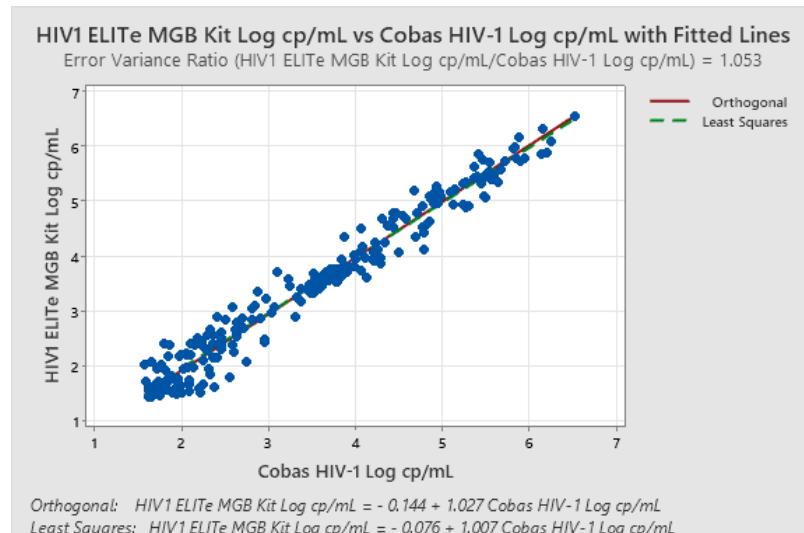
I risultati sono sintetizzati nelle figure sottostanti.



In questo test, l'analisi di regressione ortogonale ha generato una pendenza pari a 1,023 (95% CI: 0,989; 1,056) e un'intercetta pari a -0,102 (95% CI: -0,229; 0,026). L'analisi di regressione lineare ha generato un R^2 di 0,961.

Poiché i due metodi di riferimento ("cobas® HIV-1 for use on the 4800 System" e "cobas® HIV-1 for use on the 6800 System", Roche Diagnostics) hanno prestazioni equivalenti, lo studio di correlazione è stato eseguito anche sui risultati combinati dei tre diversi siti.

I risultati sono sintetizzati nelle figure sottostanti.



In questo test, l'analisi di regressione ortogonale ha generato una pendenza pari a 1,027 (95% CI: 1,001; 1,052) e un'intercetta pari a -0,144 (95% CI: -0,241; -0,047). L'analisi di regressione lineare ha generato un R^2 di 0,963.

Poiché ELITe BeGenius ha prestazioni analitiche equivalenti a ELITe InGenius, anche le prestazioni diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono considerate equivalenti. Pertanto, la sensibilità diagnostica del saggio ottenuta su ELITe InGenius è applicabile anche a ELITe BeGenius.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, valutata mediante percentuale di concordanza negativa, è stata valutata in tre siti differenti su **ELITe InGenius** analizzando campioni clinici negativi per l'RNA di HIV1 testati con metodi di riferimento di diagnostica molecolare marcati CE IVD.

I risultati dello studio di specificità diagnostica, dopo l'analisi di discrepanza, sono sintetizzati nella tabella seguente, entrambi differenziati mediante il metodo di riferimento ("cobas® HIV-1 for use on the 4800 System" e "cobas® HIV-1 for use on the 6800 System", Roche Diagnostics) e combinati, in quanto offrono prestazioni equivalenti.

Campioni di plasma raccolti in EDTA negativi per l'RNA di HIV1	N	Positivi	Negativi	Specificità diagnostica
Riferimento: cobas HIV-1 for use on the 6800 Systems	90	0	90	100%
Riferimento: cobas HIV-1 for use on the 4800 Systems	159	3	156	98,1%
Risultati combinati	249	3	246	98,8%

Questi campioni hanno dato risultati positivi discordanti con un titolo più basso rispetto al LoD di HIV1 ELITe MBG Kit e dei metodi di riferimento. Questi campioni possono casualmente generare risultati positivi.

Poiché ELITe BeGenius ha prestazioni analitiche equivalenti a ELITe InGenius, anche le prestazioni diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono considerate equivalenti. Pertanto, la specificità diagnostica del saggio ottenuta su ELITe InGenius è applicabile anche a ELITe BeGenius.

Nota: I dati e i risultati completi dei test eseguiti per la valutazione delle caratteristiche prestazionali del prodotto con la matrice e lo strumento sono registrati nel Fascicolo Tecnico del prodotto "HIV1 ELITe MGB Kit", FTP 600ING.

BIBLIOGRAFIA

J. Müller et al. (2007) *J. Virol. Methods* 142: 127 - 135.

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

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

DHHS Guidelines 2019: "Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV".

WHO Prequalification of In Vitro Diagnostics Public Report (WHO PQ Public Report), number PQDx 0365-118-00, 10/2020, version 20.

<https://ltd.aruplab.com> (test number 3000867).

B. Amellal et al. (2008) *HIV Medicine*, 9: 790-793.

K. Sebire et al. (1998), *J. Clin. Microbiol.*, 36: 493-498.

C. Ginocchio et al. (1997), *J. Clin. Microbiol.*, 35: 2886-2893.

C. Baleriola et al. (2011), *J. Clin. Microbiol.*, 49: 3163-3167.

LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti campioni clinici: Plasma raccolto in EDTA o ACD.

Il plasma raccolto in EDTA o ACD si può ottenere da sangue intero conservato a temperatura ambiente o a 2/8 °C per un massimo di 24 ore.

Non utilizzare questo prodotto con plasma raccolto in provette contenenti eparina, perché l'eparina inibisce la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e può quindi invalidare i risultati.

Al momento non sono disponibili dati riguardo alle prestazioni del prodotto con i seguenti campioni clinici: sangue intero, siero e liquor cefalorachidiano.

Il prodotto non è inteso per l'uso come test di screening o per rilevare la presenza o l'esposizione ad agenti trasmissibili nel sangue, negli emoderivati, nelle cellule, nei tessuti, negli organi o in qualsiasi dei loro derivati al fine di valutarne l'idoneità per la trasfusione, il trapianto o la terapia cellulare.

Il prodotto non è inteso per l'uso come test diagnostico per confermare la presenza di un'infezione da HIV1.

Questo prodotto mostra crossreattività con HIV2 che può dare risultati positivi con una reazione di quantificazione 2.000 volte inferiore al titolo teorico di HIV2. Ciononostante, tenuto conto l'uso previsto del prodotto, l'epidemiologia dell'HIV2 e l'implementazione di algoritmi diagnostici chiari (es. CDC) mirati a differenziare l'infezione da HIV1 da quella da HIV2, la crossreattività dell'HIV2 non rappresenta un vero problema. Tuttavia, il prodotto HIV1 ELITe MGB Kit non è ideale per il trattamento di individui con doppia infezione da HIV1 e HIV2. In questo caso, la presenza di HIV2 non inibisce la rilevazione di HIV1, ma può causare un'over-quantificazione di HIV1 dovuta alla crossreattività di HIV2.

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 PCR 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 dai prodotti della PCR. Le contaminazioni crociate possono produrre risultati falsi positivi. Il formato del prodotto è progettato per limitare le contaminazioni crociate. Comunque, 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 dispositivi di protezione individuale 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 l'uso di dispositivi di protezione individuale e di 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.

È necessario disporre di aree separate per la preparazione della miscela di reazione completa e dell'estrazione/amplificazione/rilevazione dei prodotti della reazione di amplificazione per prevenire risultati falso-positivi.

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che l'RNA del target non è stato rilevato nell'RNA estratto dal campione, ma non si può escludere che l'RNA del target abbia un titolo più basso del limite di rilevazione del prodotto (vedere "Caratteristiche delle prestazioni"). 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, inserimenti o delezioni nella regione dell'RNA del coperta dai primer e dalle

HIV1 ELITe MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e la Real-Time
PCR

REF**RTK600ING**

sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione e la quantificazione del RNA del target.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati in combinazione con tutte le osservazioni cliniche e i risultati di laboratorio pertinenti.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, vi è un rischio residuo di ottenere con questo prodotto risultati non validi o errati. Tale rischio residuo non può essere eliminato né ulteriormente ridotto. In taluni casi, potrebbe indurre decisioni sbagliate con effetti potenzialmente pericolosi per il paziente. Tuttavia, tale rischio residuo associato all'uso previsto del prodotto è stato ponderato a fronte dei potenziali benefici per il paziente ed è stato ritenuto accettabile.

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Reazione con Q-PCR Standard, curva dello standard o reazione con il controllo positivo non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela di reazione completa, di Q-PCR Standard e del controllo positivo. Controllare i volumi della miscela di reazione completa, di Q-PCR standard e del controllo positivo.
Errore di preparazione della miscela di reazione completa.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzata durante la preparazione della miscela di reazione completa.
Degradazione della miscela di reazione completa o dei suoi componenti.	Non utilizzare la miscela di reazione completa per più di 3 sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerante dell'Inventory Area o nella Cooler Unit). Non lasciare il PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Non lasciare il prodotto RT EnzymeMix a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti. Preparare di nuovo la miscela di reazione completa. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Degradazione dei Q-PCR Standard o del controllo positivo.	Non utilizzare il Q-PCR Standard per più di 2 sessioni indipendenti (2 ore ciascuna nell'area di estrazione o nella Cooler Unit). Non utilizzare il controllo positivo per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione o nella Cooler Unit). Utilizzare nuove aliquote dei Q-PCR Standard o del controllo positivo.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Reazione del controllo negativo non valida

Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela di reazione completa e del controllo negativo. Controllare i volumi della miscela di reazione completa 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 miscela di reazione completa o dei suoi componenti.	Preparare di nuovo la miscela di reazione completa. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack, dell'Inventory Block o della Cooler Unit.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire le provette e i puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Reazione del campione non valida

Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela di reazione completa, del controllo interno e del campione. Controllare i volumi della miscela di reazione completa, del controllo interno e del campione.
Errore di preparazione della miscela di reazione completa.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzata durante la preparazione della miscela di reazione completa.
Degradazione della miscela di reazione completa o dei suoi componenti.	Non utilizzare la miscela di reazione completa per più di 3 sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerante dell'Inventory Area o nella Cooler Unit). Non lasciare il PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Non lasciare il prodotto RT EnzymeMix a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti. Preparare di nuovo la miscela di reazione completa. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Degradazione del template di Internal Control.	Utilizzare una nuova aliquota di Internal Control.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti nel campione.	Ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only". Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "Extract + PCR" (estrazione + PCR).
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Curva di dissociazione anomala

Possibili cause	Soluzioni
Assenza di un picco definito. Picco definito, ma Tm differente rispetto a quello di altri campioni e degli standard o del controllo positivo.	Controllare che il valore Ct del target sia inferiore a 30. La grande quantità di prodotti della reazione di amplificazione alla fine della reazione può interferire con l'analisi della curva di melting. Ripetere la reazione di amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Il target nel campione deve essere sequenziato per confermare la mutazione.

Errore nel calcolo di Ct

Possibili cause	Soluzioni
Concentrazione troppo elevata del target nel campione o campione con segnale di fluorescenza anomalo.	Se nel tracciato della PCR appare un'amplificazione significativa, selezionare il tracciato relativo al campione e approvare manualmente il risultato come positivo. Se nel tracciato della PCR non appare nessuna amplificazione, selezionare il tracciato relativo al campione e approvare manualmente il risultato come negativo o lasciarlo come non valido. 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"; - ripetere l'estrazione del campione primario con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "Extract + PCR".

Anomala percentuale elevata di risultati positivi nella stessa sessione (reazioni con valori tardivi di Ct comparabili)

Possibili cause	Soluzioni
Contaminazione tra campioni nei passaggi pre-analitici.	<p>Pulire la micropipetta con soluzione fresca di ipoclorito di sodio (candeggina) al 3% o con un detergente per DNA/RNA dopo aver pipettato ogni campione.</p> <p>Non utilizzare le pipette Pasteur. Utilizzare pipette del tipo a spostamento positivo oppure munirle di puntali con filtro per aerosol.</p> <p>Introdurre i campioni nelle ultime posizioni degli strumenti, come indicato nella GUI. Seguire la sequenza di caricamento indicata dal software.</p>
Contaminazione ambientale del laboratorio.	<p>Pulire tutte le superfici che vengono a contatto con l'operatore e i campioni (incluse le pipette) con soluzione fresca di ipoclorito di sodio (candeggina) al 3% o detergente per DNA/RNA.</p> <p>Eseguire un ciclo di decontaminazione con U.V.</p> <p>Preparare di nuovo la miscela di reazione completa e/o utilizzare una nuova aliquota di CPE.</p>

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 del Regolamento IVDR 2017/746/CE relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*. Certificato rilasciato da TÜV SÜD Product Service GmbH, Germania.



Numero Unico Identificativo del dispositivo



Contenuto sufficiente per "N" test.



Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.



Contenuto.



Tenere lontano dalla luce solare.



Fabbricante.

AVVISO PER L'UTILIZZATORE

Qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato Membro nel quale risiede l'utilizzatore e/o il paziente. Al momento della revisione corrente delle Istruzioni per l'uso, non si è verificato nessun grave incidente né alcun richiamo, aventi un impatto sulle prestazioni del prodotto e la sicurezza del dispositivo.

Verrà resa disponibile al pubblico una "Sintesi della Sicurezza e delle Prestazioni" tramite il database europeo dei dispositivi medici (Eudamed) non appena questo sistema informatico sarà funzionante. Prima che sia pubblicato l'avviso della piena funzionalità di Eudamed, verrà tempestivamente resa disponibile al pubblico la "Sintesi della Sicurezza e delle Prestazioni" richiedendola via email all'indirizzo emd.support@elitechgroup.com.

**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 EG SpA 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. Email: outlicensing@thermofisher.com.

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

Le tecnologie ELITe InGenius® ed ELITe BeGenius® sono coperte da brevetti e da domande di brevetti in attesa di approvazione.

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

TaqMan™ è un marchio registrato di Thermo Fisher Scientific.

cobas® è un marchio registrato di Roche Diagnostics.

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



Caution, this document is a simplified version of the official instruction for use. This document is available only in English. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com

Intended use

The product **HIV1 ELITE MGB® Kit** is an in vitro diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as quantitative nucleic acids reverse transcription and Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the RNA of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV1), extracted from clinical specimens.

The assay is validated in association with ELITe InGenius® and ELITe BeGenius® instruments, automated and integrated systems for extraction, reverse transcription, Real-Time PCR and results interpretation, using human specimens of plasma collected in EDTA or in ACD.

The product is intended for use as an aid in the management of HIV1-infected individuals undergoing antiviral therapy.

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

The product is not intended to be used for screening or to detect the presence or the exposure to transmissible agents in blood, blood components, cells, tissues, organs or any of their derivatives in order to assess their suitability for transfusion, transplantation or cell administration. The product is not intended for use as a diagnostic test to confirm the presence of HIV1 infection.

Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target	HIV1 polymerase gene (integrase region)	FAM	HIV1
Internal Control	MS2	AP525	IC

Validated matrix

› Plasma EDTA

› Plasma ACD

Kit content

HIV1 ELITe MGB Mix		HIV1 ELITe Standard	HIV1 - ELITe Positive Control	HIV1 Internal Control
 X 4	 X 2	 X 1	 X 2	 X 8
HIV PCR Mix 4 tubes of 600 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles	RT EnzymeMix 2 tubes of 20 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles	Ready-to-use Calibrators: 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 1 set of 4 tubes of 160 µL 2 freeze-thaw cycles	Ready-to-use PC 2 tubes of 160 µL 8 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles	Ready-to-use IC 8 tubes of 160 µL 96 extractions per kit 12 freeze-thaw cycles

Maximum shelf-life: **18 months**

Storage Temperature: -20 °C

Material required not provided in the kit

- › ELITe InGenius instrument: INT030
- › ELITe BeGenius instrument: INT040
- › ELITe InGenius SP 1000 Extraction Cartridge: INT033SP1000
- › ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR
- › ELITe InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS
- › ELITe InGenius Waste Box: F2102-000
- › Filter Tips 300 μ L: TF-350-L-R-S (ELITe InGenius only)
- › 1000 μ L Filter Tips Tecan: 30180118 (ELITe BeGenius only)

ELITe InGenius and ELITe BeGenius protocol

› Sample volume	600 µL	› Unit of quantitative result	International Unit: IU/mL
› HIV1 CPE volume	10 µL		Copies: Copies/mL
› Total elution volume	50 µL	› Conversion factor to IU	2.3 IU/copy
› PCR elution input volume	20 µL	› Frequency of controls	15 days
› Complete PCR Mix volume	20 µL	› Frequency of calibration	60 days

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity: Method Correlation	Diagnostic Specificity
Plasma	60 IU / mL 26 copies / mL	R ² = 0.963 237 quantified samples	98.8% 246 confirmed samples / 249 tested samples

reference methods:

“cobas® HIV1 for use on the 4800 Systems” and

"cobas® HIV1 for use on the 6800 Systems", Roche Diagnostics.

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.

Sample type	Transport/Storage conditions			
	+16 / +26 °C (room temperature)	+2 / +8 °C	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
Plasma samples collected in EDTA or ACD	≤ 2 days	≤ 3 days	≤ 1 month	≤ 6 months

Do not use Plasma collected in heparin to prevent inhibition of amplification reaction and frequent invalid results.

ELITe InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITe InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, reverse transcription, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational modes are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius. Log in with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify calibrators: Q-PCR Standard in the "Calibration" menu Verify controls: Positive Control and Negative Control in the "Controls" menu Note: All must have been run, approved and not expired	3. Thaw the PCR Mix and the CPE tubes Vortex gently Spin down 5 sec Keep the RT EnzymeMix in ice
--	---	--

4. Prepare the complete reaction mixture

Sample Number (N)	HIV1 PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0.3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0.3 µL
N = 12	290 µL	4.4 µL

Procedure 1 - Complete run: Extraction +PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "1000 µL", elution: "50 µL"	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay protocol" of interest: HIV1 ELITe_PL_600_50	5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Extraction Tube	6. Load the complete reaction mixture and the Internal Control in the inventory block
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above (select the Assay Protocols: HIV1 ELITe_PC and HIV1 ELITe_NC or HIV1 ELITe_STD)	5. Select the method "PCR only" and set the sample position "Elution Tube"	6. Load the complete reaction mixture 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

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the method "Extraction Only" and set the sample position: Extraction Tube	6. Load the Internal Control in the inventory block
7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, Extraction Tube racks	8. Close the door Start the run	9. Archive the eluate sample

ELITe BeGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITe BeGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

1. Switch on ELITe BeGenius. Log in with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify calibrators: Q-PCR Standard in the "Calibration" menu Verify controls: Positive Control and Negative Control in the "Controls" menu <i>Note: All must have been run, approved and not expired</i>	3. Thaw the PCR Mix and the CPE tubes Vortex gently Spin down 5 sec Keep the RT EnzymeMix on ice
---	--	--

4. Prepare the complete reaction mixture

Sample Number (N)	HIV1 PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0.3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0.3 µL
N = 12	290 µL	4.4 µL
13 ≤ N ≤ 18	(N + 3) x 20 µL	(N + 3) x 0.3 µL
19 ≤ N ≤ 23	(N + 4) x 20 µL	(N + 4) x 0.3 µL
N = 24	580 µL	8.7 µL

5. Vortex gently Spin down 5 sec Keep the complete reaction mixture in ice. Do not expose to direct light.

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extraction and PCR»	2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active	3. Verify the extraction volumes: Input: "600 µL", Eluate: "50 µL"
4. Select the "Assay protocol" of interest: HIV1 ELITe_Be_PL_600_50	5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area	6. Load the complete reaction mixture and the CPE in Reagent Rack and insert it in the cooling area
Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4		
7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»	2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area	3. Select the "Assay protocol" of interest (HIV1 ELITe_Be_PC and HIV1 ELITe_Be_NC or HIV1 ELITe_Be_STD)
4. Load the complete reaction mixture in Reagent Rack and insert it in the cooling area Load filter tips and the PCR rack	5. Close the door. Start the run	6. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "Extraction Only" in the Assay Protocol selection screen.	6. Load the CPE in the Elution Rack and insert it in the cooling area
7. Load : Filter Tips and the Extraction Rack	8. Close the door Start the run	9. Archive the eluate sample