



## Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per l'amplificazione real time del cDNA

REF RTS160ING



### INDICE

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 4
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 4
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 5
PROCEDURA	pag. 6
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 13
BIBLIOGRAFIA	pag. 17
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 18
RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	pag. 19
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 21
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 22

### USO PREVISTO

Il prodotto «Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit» fa parte di un saggio qualitativo multiplex di amplificazione degli acidi nucleici per la rilevazione e l'identificazione dell'RNA del **virus dell'influenza A (FluA)**, dell'**influenza B (FluB)**, del **virus respiratorio sinciziale (RSV)** e del **metapneumovirus umano (hMPV)** in campioni clinici.

Il saggio è stato validato in associazione con il sistema **ELITE InGenius®** e con i campioni di tampone respiratorio e di lavaggio bronco-alveolare (BAL).

Il prodotto trova impiego come ausilio nella diagnosi delle infezioni respiratorie insieme ai dati clinici del paziente e ai risultati di altri esami di laboratorio.

**Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit**  
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per l'amplificazione real time del cDNA

REF RTS160ING

### PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio consiste in una reazione multiplex di trascrizione inversa e amplificazione real time con (metodo one-step).

A partire dall'RNA estratto da ciascun campione da testare, differenti reazioni di trascrizione inversa e amplificazione vengono eseguite nella PCR Cassette al fine di amplificare i seguenti target:

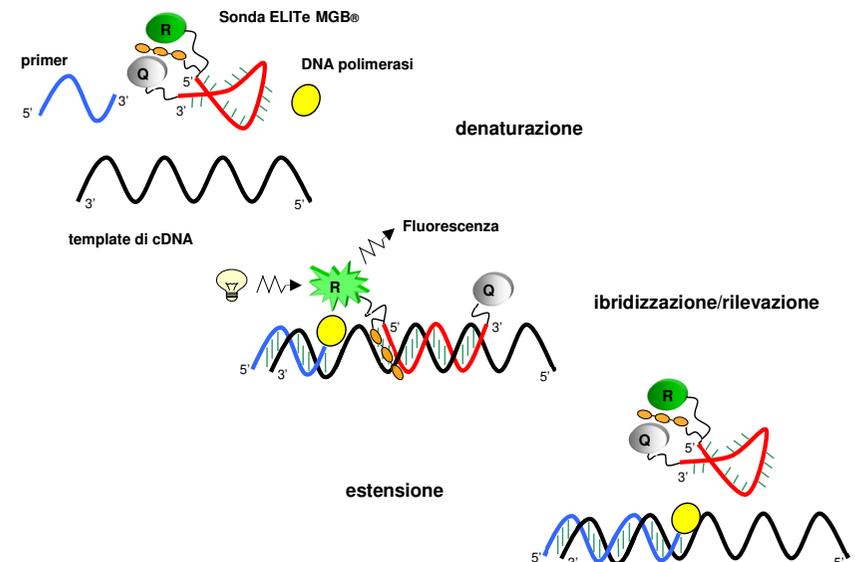
- sequenza del gene che codifica per la proteina di matrice di FluA, rilevata dalla sonda specifica nel canale **FluA** (canale 5),
- sequenza del gene che codifica per la proteina di matrice di FluB, rilevata dalla sonda specifica nel canale **FluB** (canale 1),
- sequenza del gene che codifica per la proteina di matrice di RSV, rilevata dalla sonda specifica nel canale **RSV** (canale 4),
- sequenza del gene che codifica per la proteina di fusione di hMPV, rilevato dalla sonda specifica nel canale **hMPV** (canale 6).

La miscela PCR Mix amplifica anche il controllo interno di estrazione e inibizione su una regione dell'RNA genomico di fago MS2 rilevata dalla sonda specifica nel canale **IC** (canale 2).

Le sonde con tecnologia ELITE MGB® sono attivate quando ibridano con il prodotto specifico della reazione di amplificazione. L'emissione della fluorescenza è misurata e registrata dall'apparecchio. Alla fine del ciclo di amplificazione, si analizzano le curve di fluorescenza allo scopo di identificare i Cicli soglia (Ct). L'interpretazione del risultato consente di rilevare la presenza di patogeni d'interesse nel campione iniziale.

Il saggio è stato validato con **ELITE InGenius**, un sistema integrato automatico per l'estrazione, l'amplificazione, la rilevazione degli acidi nucleici e l'interpretazione dei risultati.

Nella figura seguente è brevemente descritto il meccanismo di attivazione ed emissione della fluorescenza delle sonde con tecnologia ELITE MGB®. Da notare che le sonde non sono idrolizzate durante il ciclo di amplificazione.



### DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto «Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit» fornisce i seguenti componenti:

#### • RV PLUS PCR Mix

Miscela ottimizzata e stabilizzata di oligonucleotidi e reagenti per trascrizione inversa e amplificazione real time, **pre-aliquotata in quattro provette** (tappo BIANCO). Ogni provetta contiene **600 µL** di soluzione, che consentono di effettuare **24 test** (almeno 5 campioni per sessione) in associazione con **ELITE InGenius**.

Il prodotto RV PLUS PCR Mix contiene i primer e la sonda specifici per:

- la sequenza del gene che codifica per la **proteina di matrice** di FluA. La sonda **FluA** è marcata con il fluoroforo AP639, stabilizzata dal gruppo MGB® inattivata da un quencher non fluorescente,
- la sequenza del gene che codifica per la **proteina di matrice** di FluB. La sonda **FluB** è marcata con il fluoroforo FAM, stabilizzata dal gruppo MGB® inattivata da un quencher non fluorescente,
- la sequenza del gene che codifica la **nucleoproteina** di RSV. La sonda **RSV** è marcata con il fluoroforo AP593, stabilizzata dal gruppo MGB® inattivata da un quencher non fluorescente,
- la sequenza del gene che codifica per la **fusion protein** dell'hMPV. La sonda **hMPV** è marcata con il fluoroforo AP690, stabilizzata dal gruppo MGB® inattivata da un quencher non fluorescente,
- la sequenza dell'RNA genomico di **fago MS2** del controllo interno (IC) esogeno. La sonda **IC** è marcata con il fluoroforo AP525, stabilizzata dal gruppo MGB® inattivata da un quencher non fluorescente.

Il prodotto RV PLUS PCR Mix contiene anche il tampone, il magnesio cloruro, i nucleosidi trifosfati, gli stabilizzatori e l'enzima Taq DNA polimerasi con attivazione termica (hot start).

#### • RT EnzymeMix

Miscela ottimizzata e stabilizzata di enzimi per trascrizione inversa, **pre-aliquotata in due provette** (tappo con inserto NERO). Ogni provetta contiene **20 µL** di soluzione, che consentono di effettuare **48 test** in associazione con **ELITE InGenius**.

Il prodotto contiene un volume sufficiente per preparare **96 test in associazione con il sistema ELITE InGenius**, compresi i controlli.

### MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
RV PLUS PCR Mix	miscela di reagenti per trascrizione inversa e amplificazione real time <b>tappo BIANCO</b>	4 x 600 µL	-
RT EnzymeMix	Trascrittasi inversa <b>tappo con inserto NERO</b>	2 x 20 µL	-

### MATERIALE RICHIESTO MA NON IN DOTAZIONE

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o simili.
- Agitatore Vortex.
- Microcentrifuga da banco (12.000-14.000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a dispensazione positiva (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Provetta di Sarstedt da 2,0 ml, fondo conico con base e tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005).
- Acqua per biologia molecolare.

### ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del RNA dai campioni da analizzare, il controllo interno di estrazione e inibizione, il controllo positivo di amplificazione e i materiali di consumo **non** sono in dotazione con questo prodotto.

Per l'estrazione automatica dell'RNA, la trascrizione inversa, l'amplificazione real time e l'interpretazione dei risultati, è richiesto l'impiego dello strumento «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., cod. INT030) e dei seguenti Assay Protocol specifici per il prodotto (ELITechGroup S.p.A.):

- parametri per il controllo positivo di amplificazione «**RV PLUS ELITE\_PC**»,
- parametri per il controllo negativo di amplificazione «**RV PLUS ELITE\_NC**»,
- parametri per i campioni dei tamponi respiratori da analizzare «**RV PLUS ELITE\_RsS\_200\_100**»,
- parametri per i campioni di BAL da analizzare «**RV PLUS ELITE\_BAL\_200\_100**».

Con lo strumento «**ELITE InGenius**» è richiesto l'impiego dei seguenti prodotti generici:

- cartucce di estrazione «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., cod. INT032SP200),
- materiali di consumo per l'estrazione «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A, cod. INT032CS),
- cartucce di amplificazione «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A, cod. INT035PCR),
- puntali «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, cod. TF-350-L-R-S),
- raccogliitore «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A, cod. F2102-000).

Come template del controllo interno di estrazione e inibizione, è richiesto l'impiego del prodotto generico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., cod. CTRCPE), una soluzione stabilizzata contenente DNA plasmidici e RNA genomico di fago.

Come controllo positivo di amplificazione, è richiesto il prodotto specifico «**Respiratory Viral PLUS - ELITE Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., cod. CTR160ING), una soluzione stabilizzata contenente DNA plasmidico.

Come dispositivo per il prelievo dei tamponi respiratori, è richiesto il prodotto generico «**UTM® kit**» (COPAN Italia S.p.A., cod. 360C o 305C) o dispositivo equivalente.

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

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

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi / la faccia.

Non pipettare a bocca alcuna soluzione.

Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree di lavoro.

Lavarsi bene le mani dopo avere maneggiato i campioni e i reagenti.

Eliminare i rifiuti avanzati ed i rifiuti secondo le norme vigenti.

Leggere attentamente tutte le istruzioni fornite nel prodotto prima di eseguire il saggio.

Attenersi alle istruzioni fornite nel prodotto durante l'esecuzione del saggio.

Rispettare la data di scadenza del prodotto.

Utilizzare solo i reagenti presenti nel 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 contenuti nei campioni o della contaminazione dei campioni stessi da parte di prodotti di amplificazione.

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

È indispensabile disporre di locali separati per i test di biologia molecolare e per le colture microbiologiche. Non manipolare mai le colture liquide o solide nei locali adibiti allo svolgimento delle reazioni di estrazione/amplificazione.

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. Preparare i reagenti necessari per la trascrittasi inversa e l'amplificazione in modo che il volume sia sufficiente per un'unica sessione. 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.

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

#### Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

La **RV PLUSD PCR Mix** deve essere conservata al buio a -20 °C.

La **RV PLUSD PCR Mix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **cinque volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

#### RT EnzymeMix

La **RT EnzymeMix** deve essere conservata a -20 °C.

La **RT EnzymeMix** non può essere esposta a temperature superiori a -20 °C per oltre 10 minuti. Congelare e scongelare la miscela per un massimo di **dieci volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

### CAMPIONI E CONTROLLI

#### Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

#### Tampone respiratorio

I campioni in forma di tamponi respiratori destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere prelevati tramite un terreno UTM attenendosi alle linee guida del laboratorio, trasportati e conservati a temperatura ambiente (+18/+25 °C) per un massimo di 24 ore o a +2/+8 °C per un massimo di cinque giorni, altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un mese oppure a -70 °C per periodi più lunghi. Trasferire i 200 µL di terreno nel "Sonication tube" fornito con l'«ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

Si consiglia di ripartire i campioni da congelare in aliquote 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.

**Nota bene:** Il pipettaggio per trasferire i campioni dalla provetta primaria alla provetta di estrazione potrebbe causare contaminazione. Utilizzare le apposite pipette e seguire tutte le raccomandazioni contenute nel capitolo "Avvertenze e precauzioni".

**Nota bene:** Per estrarre l'RNA dai tamponi respiratori mediante il sistema ELITE InGenius e ELITE il programma InGenius Software versione 1.3 (o successiva), utilizzare il protocollo analitico **RV PLUS ELITE\_RsS\_200\_100**. Questo consente di trattare 200 µL di campione, aggiunge il **CPE** (controllo interno) a 10 µL/estrazione ed eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

#### Lavaggio bronco-alveolare (BAL)

I campioni di lavaggio bronco-alveolare (BAL) devono essere raccolti in soluzione fisiologica sterile o PBS attenendosi alle linee guida del laboratorio, trasportati e conservati a temperatura ambiente (+18/+25 °C) per un massimo di 24 ore o a +2/+8 °C per un massimo di cinque giorni, altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un mese oppure a -70 °C per periodi più lunghi. Trasferire i 200 µL di terreno nel "Sonication tube" fornito con l'«ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

Si raccomanda di ripartire 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.

**Nota:** Il pipettaggio per trasferire i campioni dalla provetta primaria alla provetta di sonicazione potrebbe causare contaminazione. Utilizzare le apposite pipette e seguire tutte le raccomandazioni contenute nel capitolo "Avvertenze e precauzioni".

**Nota bene:** Per estrarre l'RNA dal BAL mediante il sistema **ELITE InGenius** e con il programma **ELITE InGenius** versione 1.3 (o successiva equivalente), utilizzare il protocollo analitico **RV PLUS ELITE\_BAL\_200\_100**. Questo consente di trattare 200 µL di campione, aggiunge il **CPE** (controllo interno) a 10 µL/estrazione ed eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

#### Sostanze interferenti

Quantità di DNA e/o RNA genomico umano maggiori di 1 µg per reazione potrebbero inibire la reazione di trascrizione inversa e l'amplificazione real time.

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

#### Controlli di amplificazione

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

- come controllo positivo utilizzare il prodotto **Respiratory Viral PLUS – ELITE Positive Control** (non in dotazione con questo kit) in associazione con il protocollo **RV PLUS ELITE\_PC**, come controllo negativo utilizzare acqua per biologia molecolare (non inclusa in questo kit) in associazione con il protocollo **RV PLUS ELITE\_NC**.

**Nota bene:** il sistema **ELITE InGenius** richiede la presenza di risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione che è memorizzato nel suo database. I risultati dei controlli di amplificazione, approvati e memorizzati nel database, scadono **dopo 15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente l'analisi dei controlli positivi e negativi con il lotto in uso di reagente di amplificazione.

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

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

#### Controlli di qualità

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

### PROCEDURA

La procedura di utilizzo del prodotto **Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit** con il sistema **ELITE InGenius** si compone di tre fasi:

comprende tre fasi:

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

**Verifica che il sistema sia pronto**

Prima di iniziare la sessione, come descritto nella documentazione dello strumento, è necessario:

- accendere lo strumento **ELITE InGenius** e selezionare la modalità **"CLOSED"**,
- verificare che i controlli di amplificazione (RV PLUS Positive Control, RV PLUS Negative Control) siano stati eseguiti, in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto, e che i risultati siano approvati e non scaduti (Status). In assenza di risultati dei controlli di amplificazione approvati o scaduti, generarli come descritto nei paragrafi seguenti,
- scegliere il tipo di sessione, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per la preparazione e utilizzando gli Assay Protocol forniti da ELITechGroup S.p.A. Questi protocolli IVD sono stati specificamente validati con i prodotti ELITE MGB® Kit, le matrici e lo strumento ELITE InGenius.

I protocolli dei saggi disponibili per **Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit** sono descritti nella tabella seguente.

Assay Protocol per il prodotto Respiratory Viral ELITE MGB® Kit			
Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
RV PLUS ELITE_RsS_200_100	Tampone respiratorio	Positivo / Negativo	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume di Eluizione dell'estratto: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
RV PLUS ELITE_BAL_200_100	BAL	Positivo / Negativo	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume di Eluizione dell'estratto: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL

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

**Impostazione della sessione**

Il prodotto **Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit** in associazione al sistema **ELITE InGenius** può essere utilizzato per eseguire:

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

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

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

Prima di iniziare la sessione, è obbligatorio procedere come segue:

- Se necessario, scongelare a temperatura ambiente (+18/25° C) le provette contenenti i campioni da analizzare. Mescolare mediante agitatore a bassa velocità le provette per 10 secondi, centrifugarle per 5 secondi per favorire la separazione del precipitato e collocarle su un ghiaccio,
- Scongelare per 30 minuti a temperatura ambiente (+18/25° C) le provette di **RV PLUS PCR Mix** (tappo BIANCO) necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **24 reazioni**. Mescolare le provette mediante vortex a bassa velocità per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e collocarle quindi su un blocchetto refrigerante.
- Prelevare le provette contenenti **RT EnzymeMix** (tappo NERO) necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **48 reazioni**. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per favorire la separazione del precipitato e collocarle su un blocchetto refrigerante.

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

- Preparare una provetta da 2 ml con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005, non in dotazione con il kit) per la **miscela completa di reazione** e contrassegnarla in maniera riconoscibile con un pennarello indelebile;
- Calcolare i volumi dei due componenti in dotazione con il kit necessari per preparare la **miscela completa di reazione** in funzione del numero di campioni da analizzare, come descritto nella tabella sottostante.

**Nota bene:** Per calcolare i volumi dei due componenti da preparare la **miscela di reazione completa**, è necessario definire il numero di campioni (N) da analizzare nell'ambito della sessione e seguire le indicazioni riportate nella tabella sottostante.

Numero di campioni (N)	RV PLUS PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0,3 µL
6 ≤ N ≤ 12	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0,3 µL

- Preparare la **miscela di reazione completa** aggiungendo all'apposita provetta da 2 ml i volumi calcolati dei due componenti.
- Mescolare mediante **vortex a bassa velocità** la provetta per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarla per 5 secondi per favorire la separazione del precipitato e collocarla quindi su ghiaccio.

**Nota bene:** La miscela di reazione completa deve essere preparata per ogni sessione di lavoro e **non** può essere riutilizzata né conservata.

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

**A. Corsa integrata**

Per preparare una sessione integrata con estrazione e amplificazione del campione, procedere come segue, come risulta dalla GUI:

- Scongelare le provette di CPE per la sessione. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
- Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
- Assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
- Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
- Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (es. RV PLUS ELITE\_RsS\_200\_100).
- Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
- Nella colonna "Sample Position" selezionare "Sonication Tube" come posizione di caricamento del campione. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Nell'"Inventory Block" selezionato, caricare il CPE e la **miscela completa di reazione** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Nell'"Inventory Area" selezionata caricare e controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Caricare le PCR Cassette, le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200", tutti i consumabili necessari e i campioni da estrarre nelle posizioni specificate al punto 7, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" per avviare la corsa.

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

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

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

**Nota bene:** Alla fine della sessione, **non** riutilizzare né conservare la miscela di reazione completa.

## B. Corsa di amplificazione

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

1. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
2. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
3. Per ogni Track di interesse compilare il SID digitando o scansionando il codice a barre del campione.
4. Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (es. RV PLUS ELITE\_RsS\_200\_100).
5. Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
6. Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
7. Nell'"Inventory Block" selezionato, caricare la **miscela di reazione completa** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
8. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
9. Caricare le PCR Cassette e i campioni di acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Chiudere lo sportello dello strumento.
11. Premere "Start" per avviare la corsa.

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

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

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

**Nota bene:** Alla fine della sessione, **non** riutilizzare né conservare la miscela di reazione completa.

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

Per preparare la sessione di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo procedere come segue, come risulta dalla GUI:

1. Scongela la provetta di **RV PLUS Positive Control** per la sessione. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
2. Trasferire almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in una provetta di eluizione, in dotazione con l'ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
3. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
4. Nelle "Track" di interesse, selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay".
5. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
6. Per il controllo positivo selezionare "RV PLUS ELITE\_PC" nella colonna "Assay" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **RV PLUS Positive Control**,
7. Per il controllo negativo selezionare "RV PLUS ELITE\_NC" nella colonna "Assay" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua per biologia molecolare.
8. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
9. Nell'"Inventory Block" selezionato, caricare la **miscela di reazione completa** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
10. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
11. Caricare le "PCR Cassette", la provetta per **RV PLUS Positive Control** e per il controllo negativo seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
12. Chiudere lo sportello dello strumento.
13. Premere "Start" per avviare la sessione.

Dopo il completamento della sessione, il sistema **ELITE InGenius** permette all'operatore di visualizzare, approvare e salvare i risultati, come anche di stampare e salvare il report.

**Nota:** Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il controllo positivo residuo, tapparlo, identificarlo e conservarlo a -20 °C. Attenzione a non provocare lo spandimento del campione estratto. Smaltire il controllo negativo residuo.

**Nota:** Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento le cassette PCR contenenti i prodotti di reazione e i materiali di consumo e smaltirle facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Attenzione a non provocare lo spandimento dei prodotti di reazione.

**Nota:** Alla fine della sessione, **non** riutilizzare né conservare la miscela completa di reazione.

### Esame ed esportazione dei risultati

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

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

Il sistema **ELITE InGenius** genera i risultati con il prodotto **Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit** tramite la seguente procedura:

- A. validazione dei risultati relativi al controllo positivo e negativo utilizzato per la reazione di amplificazione
- B. validazione dei risultati relativi al campione
- C. refertazione dei risultati del campione.

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

Il segnale di fluorescenza emessi dalle sonde dei geni di interesse (canali **FluA**, **FluB**, **RSV** e **hMPV**) nella reazione di amplificazione con controllo positivo e negativo sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay Protocols "RV PLUS ELITE\_PC" e "RV PLUS ELITE\_NC".

I risultati delle sessioni di amplificazione per il controllo positivo e negativo, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, 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 per il controllo positivo e il controllo negativo di amplificazione, specifici per il lotto di reagente di amplificazione, scadranno **dopo 15 giorni**.

I risultati delle sessioni di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo sono utilizzati dal software dello strumento per calcolare l'impostazione delle "Control Charts" e monitorare le prestazioni della fase di amplificazione. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

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

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

#### B. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde dei geni di interesse (canali **FluA**, **FluB**, **RSV** e **hMPV**) e dalla sonda del controllo interno (canale **IC**) nelle reazioni di amplificazione sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay Protocols "RV PLUS ELITE\_RsS\_200\_100", "RV PLUS ELITE\_BAL\_200\_100".

I risultati sono descritti nei rapporti generati dallo strumento ("Result Display") (schermata dei risultati). La sessione del campione può essere approvata quando sono soddisfatte le due condizioni riportate nella tabella sottostante.

<b>1) Controllo positivo</b>	<b>Status</b>
RV PLUS Positive Control	APPROVATO
<b>2) Controllo negativo</b>	<b>Status</b>
RV PLUS Negative Control	APPROVATO

Per ogni campione, il risultato del saggio viene interpretato automaticamente dal sistema secondo quanto stabilito dall'algoritmo del programma **ELITE InGenius® Software** e dai 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 sono stati rilevati gli RNA dei patogeni.

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
FluA: RNA detected.	L'RNA del FluA è stato rilevato nel campione.
FluB: RNA detected.	L'RNA del FluB è stato rilevato nel campione.
RSV: RNA detected.	L'RNA dell'RSV è stato rilevato nel campione.
hMPV: RNA detected.	L'RNA dell'hMPV è stato rilevato nel campione.
FluA: RNA not detected or below LoD.	L'RNA del FluA non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per questo patogeno oppure la concentrazione è inferiore al limite di rilevazione (LoD) del saggio.
FluB: RNA not detected or below LoD.	L'RNA del FluB non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per questo patogeno oppure la concentrazione è inferiore al limite di rilevazione (LoD) del saggio.
RSV: RNA not detected or below LoD.	L'RNA dell'RSV non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per questo patogeno oppure la concentrazione è inferiore al limite di rilevazione (LoD) del saggio.
hMPV: RNA not detected or below LoD.	L'RNA dell'hMPV non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per questo patogeno oppure la concentrazione è inferiore al limite di rilevazione (LoD) del saggio.
Invalid - Retest Sample.	<b>Risultato del saggio non valido</b> per un errore del controllo interno dovuto a errata estrazione o effetto carryover sugli inibitori. Il test deve essere ripetuto.

I campioni segnalati dal programma **ELITE InGenius Software** con "Invalid - Retest Sample" non sono utilizzabili ai fini dell'interpretazione del risultato. In tal caso, l'RNA del controllo interno non è stato rilevato in maniera efficiente per problemi nella fase di amplificazione o estrazione (degradazione dell'RNA, perdita dell'RNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'estratto), che possono causare risultati non corretti.

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

I campioni con risultato "FluA: RNA not detected or below LoD", "FluB: RNA not detected or below LoD", "RSV: RNA not detected or below LoD" e "hMPV: RNA not detected or below LoD" sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare l'RNA target. In tal caso non si può escludere che l'RNA target sia presente in una concentrazione inferiore al limite di rilevazione del saggio (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni").

**Nota:** I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e di altri referti di laboratorio riguardanti il paziente.

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

#### C. Esportazione dei risultati del campione

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

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

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

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

**CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI**

**Sensibilità analitica: Limite di rilevazione (LoD)**

Il limite di rilevazione (LoD) del prodotto Respiratory Viral PLUS ELITE MGB Kit è stato definito in associazione con i tamponi respiratori estratti su UTM, lavaggio bronco-alveolare (BAL) e mediante il sistema ELITE InGenius.

Il LoD è stato definito mediante analisi di un pannello di campioni di tampone respiratori raccolti in UTM (COPAN Italia S.p.A.) positivamente con un materiale di riferimento (Qnostics e Vircell) di virus dell'influenza A (FluA), dell'influenza B (FluB), del virus respiratorio sinciziale (RSV) e del metapneumovirus umano (hMPV) a titolo noto. Sono stati preparati sei livelli di diluizione a partire da una concentrazione più elevata rispetto al valore di LoD atteso. Ciascun livello di diluizione è stato processato in 12 replicati sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR". Il LoD è stato calcolato mediante analisi di regressione dei dati con modello Probit come concentrazione avente una probabilità del 95% di risultare positiva.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Limite di rilevazione (copie/mL) per tampone respiratorio e ELITE InGenius			
Target	LoD	Intervallo di confidenza 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
FluA	433	318	837
FluB	409	317	725
RSV	359	267	688
hMPV	333	288	496

Il valore calcolato del LoD è stato verificato analizzando 20 replicati dei campioni di tamponi respiratori e di BAL inoculati con i materiali di riferimento di FluA, FluB, RSV e hMPV (Qnostics e Vircell) alle concentrazioni dichiarate. I risultati ottenuti confermano le concentrazioni dichiarate per FluA, FluB, RSV e hMPV per i campioni di tampone respiratorio. Per i campioni di BAL, il LoD è stato confermato per FluB, RSV e hMPV, per FluA è stato verificato a 500 copie/ml.

**Efficienza della rilevazione (inclusività)**

L'efficienza di rilevazione di diversi ceppi o isolati di FluA, FluB, RSV e hMPV del prodotto Respiratory Viral PLUS ELITE MGB Kit è stata valutata mediante analisi in silico di sequenze disponibili nelle banche dati nucleotidiche EBI ENA. Le regioni scelte per l'ibridazione dei primer e delle sonde fluorescenti sono state verificate rispetto all'allineamento delle sequenze per il gene che codifica la matrix protein (FluA, FluB e RSV) e per il gene che codifica la nucleoproteina (hMPV). Le regioni di ibridazione hanno evidenziato la conservazione delle sequenze e l'assenza di mutazioni significative, per cui si prevede un'efficiente amplificazione di tutti gli organismi analizzati.

L'efficienza di rilevazione di differenti ceppi o isolati di FluA, FluB, RSV e hMPV è stata valutata anche mediante l'analisi di un pannello di materiali certificati testato a bassa concentrazione (circa 100 copie/reazione).

Campioni certificati di RNA genomico prodotto da ATCC (USA) e Zeptomatrix (USA) sono stati diluiti e analizzati in triplicato in associazione con il sistema ELITE InGenius in modalità "PCR Only".

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Inclusività				
Campioni	Produttore	Pos./Rep.	Ct medio	Esito
FluA H1N1	ATCC	3/3	33,65	Positivo
FluA H3N2	ATCC	3/3	33,49	Positivo
FluA H1N1 (2009)	Zeptomatrix	3/3	30,78	Positivo
FluB Florida (Yamagata)	ATCC	3/3	35,92	Positivo
FluB Wisconsin (Yamagata)	ATCC	3/3	36,22	Positivo
FluB Victoria	Qnostics	3/3	31,07	Positivo
RSVA2	ATCC	3/3	35,84	Positivo
RSVA	Vircell	3/3	36,12	Positivo
RSVB	Vircell	3/3	31,12	Positivo
hMPVA	Zeptomatrix	3/3	33,39	Positivo
hMPVB	Zeptomatrix	3/3	32,46	Positivo

Tutti i campioni analizzati sono risultati positivi per il rispettivo patogeno quando valutati con il prodotto Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit.

**Marcatori potenzialmente interferenti (cross-reattività)**

La potenziale cross-reattività con altri microrganismi diversi da quelli di interesse è stata valutata mediante analisi *in silico* per confronto con le sequenze disponibili nelle banche dati nucleotidiche.

Le regioni scelte per l'ibridazione dei primer e delle sonde fluorescenti sono state verificate rispetto all'allineamento delle sequenze di altri microrganismi. L'analisi delle regioni di ibridazione non ha evidenziato omologie significative né ha indicato potenziale cross-reattività.

L'assenza di cross-reattività con altri microrganismi che possono essere rilevati nei campioni di tampone respiratorio è stata valutata anche mediante analisi di un pannello di materiali di riferimento certificati.

Campioni di DNA o RNA genomico estratto da marcatori potenzialmente interferenti (ATCC, Zeptomatrix) sono stati analizzati in tre replicati in associazione con il sistema ELITE InGenius in modalità "PCR Only". Il DNA e l'RNA di ogni microrganismo sono stati addizionati con 500 ng per reazione di DNA genomico umano (Promega) allo scopo di simulare il campione clinico estratto.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Marcatori potenzialmente interferenti: cross-reattività		
Microrganismi	Ceppo	Esito
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC, 118	Negativo, assenza di cross-reattività
<i>Candida albicans</i>	ATCC, 3147	Negativo, assenza di cross-reattività
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC, Rosenbach	Negativo, assenza di cross-reattività
<i>Escherichia coli</i>	ATCC, H10407	Negativo, assenza di cross-reattività
<i>Bordetella pertussis</i>	Tohama I	Negativo, assenza di cross-reattività
<i>Bordetella parapertussis</i>	12822	Negativo, assenza di cross-reattività
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC, Rd	Negativo, assenza di cross-reattività
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC, R6	Negativo, assenza di cross-reattività
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC, Philadelphia-1	Negativo, assenza di cross-reattività
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC, FH	Negativo, assenza di cross-reattività
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	ATCC, AR-39	Negativo, assenza di cross-reattività
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	clinical isolate (isolato clinico)	Negativo, assenza di cross-reattività
CMV	ATCC, AD-169	Negativo, assenza di cross-reattività
Enterovirus	ATCC, Pesascek	Negativo, assenza di cross-reattività
ADV	ATCC, Adenoid 6	Negativo, assenza di cross-reattività
<i>P. jirovecii</i>	clinical isolate (isolato clinico)	Negativo, assenza di cross-reattività
SARS Coronavirus	Zeptomatrix	Negativo, assenza di cross-reattività
Coronavirus OC43	Zeptomatrix, OC43	Negativo, assenza di cross-reattività
Coronavirus E229	Zeptomatrix, E229	Negativo, assenza di cross-reattività
SARS-CoV-2	Zeptomatrix	Negativo, assenza di cross-reattività
Rhinovirus	Zeptomatrix, 1A	Negativo, assenza di cross-reattività
Virus della parainfluenza 1	Zeptomatrix, tipo 1	Negativo, assenza di cross-reattività
Virus della parainfluenza 2	Zeptomatrix, tipo 2	Negativo, assenza di cross-reattività
Virus della parainfluenza 3	Zeptomatrix, tipo 3	Negativo, assenza di cross-reattività
Coxsackievirus A9	ATCC, A9	Negativo, assenza di cross-reattività

Tutti i campioni analizzati sono risultati positivi per il rispettivo patogeno quando valutati con il Respiratory Viral PLUS ELITE MGB Kit.

**Marcatori potenzialmente interferenti (interferenza)**

L'assenza di inibizione dovuta ad altri microrganismi involontari riscontrati nei campioni di espettorato è stata valutata anche mediante analisi di un pannello di DNA e RNA genomico certificato prodotto da ATCC.

I campioni di DNA e RNA genomico in concentrazione elevata sono stati inoculati con DNA genomico di FluA, FluB, RSV, hMPV in bassa concentrazione (circa 100 copie/reazione) e analizzati in triplicato per ciascun marcatore potenzialmente interferente in associazione con il sistema ELITE InGenius® in modalità "PCR Only".

**Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit**  
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e  
per l'amplificazione real time del cDNA

REF RTS160ING

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Marcatori potenzialmente interferenti: interferenza		
Microorganismi	Ceppo	Esito
SARS Coronavirus	Zeptomatrix	Positivo, assenza di inibizione
Coronavirus OC43	Zeptomatrix, OC43	Positivo, assenza di inibizione
Coronavirus E229	Zeptomatrix, E229	Positivo, assenza di inibizione
SARS-Cov-2	Zeptomatrix, USA-WA1/2020	Positivo, assenza di inibizione
Rhinovirus	Zeptomatrix, 1A	Positivo, assenza di inibizione
Virus della parainfluenza 1	Zeptomatrix, tipo 1	Positivo, assenza di inibizione
Virus della parainfluenza 2	Zeptomatrix, tipo 2	Positivo, assenza di inibizione
Virus della parainfluenza 3	Zeptomatrix, tipo 3	Positivo, assenza di inibizione
Coxsackievirus A9	ATCC, A9	Positivo, assenza di inibizione

Tutti i patogeni di interesse sono stati rilevati correttamente in presenza degli organismi potenzialmente interferenti elencati sopra quando analizzati mediante il prodotto Respiratory Viral PLUS ELITE MGB Kit.

**Sostanze interferenti**

Un pannello di sostanze potenzialmente interferenti a concentrazioni rilevanti è stato testato mediante il prodotto Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit. Sono state analizzate le seguenti sostanze: mucina, sangue intero umano, azitromicina (antibiotico), beclometasone (corticosteroide), ebastina (antistaminico) e ambroxolo cloridrato (mucolitico).

Le sostanze sono state aggiunte singolarmente ai campioni di tampone respiratorio positivamente con i materiali di riferimento di FluA, FluB, RSV e hMPV in concentrazione pari a 3 volte il LoD. I campioni sono stati testati in 3 replicati su sistema ELITE InGenius® in modalità "Extraction + PCR" (estrazione + PCR).

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Test delle sostanze interferenti, %CV per i target						
Sostanza	Concentrazione	Pos./Rep.	FluA	FluB	RSV	hMPV
Sangue intero	10% v/v	3/3	2,56	1,92	1,14	3,88
Mucina	1% p/v (10 mg/ml)	3/3	3,94	0,83	0,76	1,17
Azitromicina	0,2 µg/ml	3/3	2,93	1,29	2,17	1,31
Ambroxolo	0,6 µg/ml	3/3	2,01	0,62	2,17	0,75
Beclometasone	64 ng/ml	3/3	3,85	1,36	2,22	1,46
Ebastina	0,4 µg/ml	3/3	3,96	0,89	3,20	2,92

Tutti i campioni sono risultati positivi per il target d'interesse come previsto. Il coefficiente %CV dei valori di Ct è risultato inferiore al 4%.

**Ripetibilità**

La ripetibilità dei risultati ottenuti mediante il prodotto Respiratory Viral PLUS ELITE MGB Kit in associazione con il sistema ELITE InGenius è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di tampone respiratorio. Il pannello ha incluso campioni positivamente con materiale di riferimento di FluA, FluB, RSV e hMPV (Qnostics e Vircell) in concentrazione pari a circa 3 volte il LoD.

La ripetibilità è stata ottenuta mediante analisi di campioni in tre replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto. Tre lotti di prodotto sono stati utilizzati in tre giorni differenti con lo stesso strumento dallo stesso operatore. I campioni sono stati elaborati su sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR". I valori di Ct dei target e del controllo Interno sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente %CV allo scopo di valutare la ripetibilità come imprecisione.

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

Ripetibilità inter-lotto					
Campione	Pos./Rep.	Ct medio	SD	%CV	% Positivo
3X LoD FluA	18/18	33,22	0,59	1,79	100%
3X LoD FluB	18/18	31,98	0,51	1,60	100%
3X LoD RSV	18/18	32,84	0,60	1,84	100%
3X LoD hMPV	18/18	32,38	0,69	2,12	100%
IC	72/72	29,27	0,34	1,17	100%

Nel test di ripetibilità, il saggio ha rilevato i target secondo le previsioni e ha mostrato un basso coefficiente %CV del valore di Ct inferiore al 3%.

**Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit**  
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e  
per l'amplificazione real time del cDNA

REF RTS160ING

**Riproducibilità**

La riproducibilità dei risultati ottenuti mediante il prodotto Respiratory Viral PLUS ELITE MGB Kit in associazione con il sistema ELITE InGenius è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di tampone respiratorio. Il pannello ha incluso campioni inoculati con materiale di riferimento di FluA, FluB, RSV e hMPV (Qnostics e Vircell) in concentrazione pari a circa 3 volte il LoD.

La riproducibilità è stata ottenuta mediante analisi di campioni in tre replicati, in due sessioni al giorno. Tre differenti lotti di prodotto sono stati utilizzati in tre giorni differenti su tre strumenti differenti e da tre operatori differenti. I campioni sono stati elaborati su sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR". I valori di Ct dei target e del controllo interno sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente %CV allo scopo di valutare la riproducibilità come imprecisione.

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

Riproducibilità					
Campione	Pos./Rep.	Ct medio	SD	%CV	% Positivo
3X LoD FluA	18/18	32,49	1,06	3,26	100%
3X LoD FluB	18/18	31,64	0,56	1,76	100%
3X LoD RSV	18/18	32,11	0,31	0,95	100%
3X LoD hMPV	17/17	33,64	1,06	3,16	100%
IC	72/72	28,83	0,39	1,36	100%

Nella prova di riproducibilità, il saggio ha rilevato i target secondo le previsioni e ha mostrato un basso coefficiente %CV del valore di Ct che non ha superato il 4%.

**Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi**

La specificità diagnostica del saggio come conferma di campioni clinici negativi è stata valutata analizzando campioni clinici di tampone respiratorio raccolti su UTM (COPAN Italia S.p.A.) e di BAL certificati negativi con un saggio CE IVD.

I campioni sono stati analizzati con il saggio in associazione con il sistema ELITE InGenius.

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni	N	Positivo	Negativo	Specificità diagnostica
Tampone respiratorio negativo raccolto su UTM	41	0	41	100%
BAL negativo	40	0	40	100%

**Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi**

La sensibilità diagnostica del saggio come conferma di campioni clinici positivi è stata valutata analizzando campioni clinici di tampone respiratorio raccolti su UTM (COPAN Italia S.p.A.) e di BAL certificati positivi per FluA, FluB, RSV o hMPV da un saggio CE IVD.

La sensibilità diagnostica del saggio è stata valutata analizzando i campioni clinici positivi e negativi inoculati con materiale certificato di FluA, FluB, RSV e hMPV. Campioni artificiali per FluA, FluB, RSV e hMPV sono stati positivamente in concentrazione pari a 3, 5 e 10 volte il LoD.

I campioni sono stati analizzati con il saggio in associazione con il sistema ELITE InGenius.

I risultati sono sintetizzati nelle tabelle seguenti.

Campioni di tampone respiratorio raccolti in UTM	N	Positivo	Negativo	Sensibilità diagnostica
Positivo per FluA	31	28	3	95,6%
Positivizzato con FluA	59	58	1	
Positivo per FluB	30	30	0	100%
Positivizzato con FluB	29	29	0	
Positivo per RSV	34	33	1	98,4%
Positivizzato con RSV	30	30	0	
Positivo per hMPV	17	17	0	100%
Positivizzato con hMPV	27	27	0	

**Respiratory Viral PLUS ELite MGB® Kit**

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per l'amplificazione real time del cDNA

REF RTS160ING

Campioni di BAL	N	Positivo	Negativo	Sensibilità diagnostica
Positivo per FluA	28	28	0	96,5%
Positivizzato con FluA	29	27	2	
Positivo per FluB	13	12	1	97,7%
Positivizzato con FluB	30	30	0	
Positivo per RSV	18	18	0	100%
Positivizzato con RSV	30	30	0	
Positivo per hMPV	3	3	0	100%
Positivizzato con hMPV	28	28	0	

**Nota:** I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche prestazionali del prodotto con la matrice e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto di "Respiratory Viral PLUS ELite MGB Kit", FTP RTS160ING.

**BIBLIOGRAFIA**

- W. Zhang et al. (1991) *J. Virol. Methods* 33: 165 - 189  
 J. Stockton et al. (1998) *J. Clin. Microbiol.* 36: 2990 - 2995  
 E. J. Kuypers et al. (2005) *J. Clin. Virology* 33: 299 -305  
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

**Respiratory Viral PLUS ELite MGB® Kit**

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per l'amplificazione real time del cDNA

REF RTS160ING

**LIMITI DELLA PROCEDURA**

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

Utilizzare questo prodotto soltanto con campioni clinici di tampone respiratorio e BAL.

Al momento, non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con i seguenti campioni clinici: espettorato, gargarizzato, aspirato nasofaringeo, surfattante di colture cellulari.

Non utilizzare questo prodotto con quantità di DNA o RNA maggiori di 1 µg: un'alta quantità di acidi nucleici può inibire la trascrizione inversa e le reazioni di amplificazione, producendo di conseguenza risultati non validi.

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

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

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

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

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

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il RNA target non è stato rilevato nel RNA estratto dal campione, tuttavia non si può escludere che abbia un titolo più basso del limite di rilevazione del prodotto (v. Caratteristiche delle prestazioni). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

In caso di coinfezioni, la sensibilità per un target può essere compromessa dall'amplificazione di un altro target.

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, delezioni o inserzioni nella regione dell'RNA target coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione dell'RNA target.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e di altri esami di laboratorio cui il paziente è stato sottoposto.

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

**RISOLUZIONE DEI PROBLEMI**

<b>Reazione non valida per il controllo positivo</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela di reazione completa e del controllo positivo. Controllare i volumi della miscela di reazione completa e del controllo positivo.
Errore di preparazione della miscela completa di reazione	Controllare i volumi dei reagenti utilizzata durante la preparazione della miscela di reazione completa.
Degradazione della miscela completa di reazione o dei suoi componenti.	Non utilizzare la miscela di reazione completa per più di una sessione (3 ore nell'Inventory Area). Non lasciare la miscela di reazione completa a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Preparare di nuovo la miscela di reazione completa. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Degradazione del controllo positivo.	Utilizzare una nuova aliquota di controllo positivo.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELiTechGroup.

<b>Reazione del controllo negativo non valida</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
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 della miscela di reazione completa o dei suoi componenti.	Preparare di nuovo la miscela di reazione completa. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Contaminazione del controllo negativo	Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack e degli inventory block.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELiTechGroup.

<b>Percentuale anormalmente elevata di risultati positivi nella stessa sessione (reazioni con valori tardivi di Ct comparabili)</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Contaminazione da campione a campione durante le fasi preanalitiche	Evitare il contatto tra micropipetta e parete della provetta. Pulire la micropipetta con soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% o con un detergente per DNA/RNA dopo aver pipettato ogni campione. Non utilizzare le pipette Pasteur. Utilizzare pipette del tipo a spostamento positivo oppure munirle di puntali con filtro per aerosol. Introdurre i campioni nelle ultime posizioni degli strumenti, come indicato nella GUI del sistema ELiTe InGenius. Seguire la sequenza di caricamento indicata dal software
Contaminazione ambientale del laboratorio	Pulire tutte le superfici che vengono a contatto con l'operatore e i campioni (incluse le pipette) con soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% o detergente per DNA/RNA dopo aver pipettato ogni campione. Eseguire un ciclo di decontaminazione con U.V. Utilizzare una nuova provetta di PCR Mix.

<b>Reazione del campione non valida</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Errore nella preparazione della sessione.	Controllare la posizione della miscela di reazione completa e del campione. Controllare i volumi della miscela di reazione completa 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 una sessione. Non lasciare la miscela di reazione completa 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 controllo interno.	Utilizzare nuove aliquote di controllo interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il 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" (solo PCR). Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione primario in una sessione in modalità "Extract + PCR" (estratto + PCR).
Degradazione del campione.	Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione primario in una sessione in modalità "Extract + PCR". Utilizzare una nuova aliquota del campione.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELiTechGroup.

<b>Errore 30103</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Concentrazione troppo elevata del target nel campione.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa: - selezionare la traccia relativa al campione e approvare manualmente il risultato. Se è richiesto un valore di Ct: - ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR) oppure - ripetere l'estrazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione primario in una sessione in modalità "Extract + PCR" (estratto + PCR).

<b>TH Error</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Campione con concentrazione target troppo elevata.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa con basale negativo: - ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR) oppure - ripetere l'estrazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione primario in una sessione in modalità "Extract + PCR" (estratto + PCR).

**LEGENDA DEI SIMBOLI**

	Codice articolo.
	Limite superiore di temperatura.
	Codice lotto.
	Da utilizzarsi entro (ultimo giorno del mese).
	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> .
	Conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medici diagnostici <i>in vitro</i> .
	Contenuto sufficiente per "N" test.
	Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.
	Contenuto.
	Conservare al riparo dalla luce del sole.
	Fabbricante.

**AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA**

Questo prodotto contiene reagenti fabbricati da Life Technologies Corporation e venduti sulla base di accordi di licenza stipulati tra ELITechGroup S.p.A. e le sue affiliate e Life Technologies Corporation. 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, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Tel.: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-mail: [outlicensing@thermofisher.com](mailto:outlicensing@thermofisher.com).

I reagenti di rilevazione ELITE MGB® sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. numero 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800, 9,169,256 e da brevetti EP n. 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939. Sono state poi presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

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