Istruzioni per l'uso

CMV RNA ELITe MGB® Kit

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

ELITechGroup
A BRUKER COMPANY

REF RTS115ING

UDI 08033891487324

CE 0123

IVD

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

<table>
<tr><th>Rev.</th><th>Notifiche dei cambiamenti</th><th>Data (dd/mm/yy)</th></tr>
<tr><td>05</td><td>Aggiornamento del paragrafo: “Altri prodotti richiesti”
Aggiornamento del paragrafo “Avvertenze per l’ utilizzatore”
Aggiornamento del paragrafo “Bibliografia”</td><td>04/09/25</td></tr>
<tr><td>04</td><td>Estensione dell'uso del prodotto per un periodo di 60 giorni dalla prima apertura.
Sostituzione di tubi e tappi per il miglioramento del processo.</td><td>03/06/25</td></tr>
<tr><td>03</td><td>Espansione dell'uso del prodotto in associazione con lo strumento ELITe BeGenius®
Nuovo formato grafico e nuova impostazione dei contenuti dell’IFU</td><td>29/11/24</td></tr>
<tr><td>02</td><td>Marcatura CE secondo il nuovo Regolamento Europeo 2017/746 (IVDR).
NOTA
I lotti di prodotto sotto elencati, con marcatura RUO (Research Use Only) rimarranno presenti sul mercato fino alla data di scadenza. Se in possesso di questi lotti, si prega di utilizzarli secondo l’uso previsto descritto nelle IFU RUO e soltanto in associazione ai relativi prodotti STD115ING e CTR115ING in formato RUO. Contattare il personale di ELITechGroup per richiedere la relativa precedente versione delle IFUs relative ai prodotti RUO
<table>
<tr><th>Numero di catalogo</th><th>Numero di lotto</th><th>Data di scadenza</th></tr>
<tr><td>RTS115ING</td><td>U0524-001</td><td>31/03/2025</td></tr>
<tr><td>RTS115ING</td><td>U1123-075</td><td>31/01/2025</td></tr>
</table>
Non utilizzare il nuovo prodotto RTS115ING commercializzato come CE-IVDR in associazione con i rispettivi standard STD115ING e controlli positivi CTR115ING in versione RUO.
L'uso del nuovo prodotto RTS115ING commercializzato come CE-IVDR richiede l'utilizzo dei relativi Assay Protocols CE-IVD. Si prega di contattare il personale di ELITechGroup per ulteriori informazioni</td><td>03/06/24</td></tr>
<tr><td>00 — 01</td><td>Nuovo sviluppo di prodotto e cambiamenti successivi</td><td>—</td></tr>
</table>

INDICE

1 USO PREVISTO 4
2 PRINCIPIO DEL SAGGIO 4
3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO 5
4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO 5
5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO 5
6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI 5
7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI 7
8 CAMPIONI E CONTROLLI 8
9 PROCEDURA ELITe InGenius 10
10 PROCEDURA ELITe BeGenius 17
11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI 22
12 BIBLIOGRAFIA 32
13 LIMITI DELLA PROCEDURA 33
14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI 34
15 LEGENDA DEI SIMBOLI 37
16 AVVISO PER L'UTILIZZATORE 37
17 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA 38
Appendix A QUICK START GUIDE 39

1 USO PREVISTO

Il prodotto **CMV RNA 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'**mRNA virionico del Citomegalovirus umano (CMV RNA)** estratto da campioni clinici non cellulari.

Il saggio è validato in associazione agli strumenti **ELITe InGenius®** ed **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 raccolto in EDTA.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nel monitoraggio di infezioni da CMV in pazienti infetti da CMV sottoposti a terapia antivirale con inibitori del complesso delle terminasi di CMV.

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

Questo prodotto non è destinato ad essere utilizzato per rilevare la presenza o l'esposizione o per lo screening di agenti trasmissibili nel sangue, in componenti del sangue, in cellule, nei tessuti, negli organi o in qualsiasi dei loro derivati al fine di valutarne l'idoneità alla trasfusione, al trapianto o somministrazione cellulare. Questo prodotto non è destinato ad essere utilizzato per lo screening del CMV nelle donne in gravidanza.

2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio consiste in una trascrizione inversa e Real-Time PCR (metodica one step) quantitativa per la rilevazione dell'RNA di CMV isolato dai campioni, retro-trascritto e amplificato utilizzando una miscela completa di reazione che contiene primers e sonde con tecnologia ELITe MGB.

Le sonde ELITe MGB sono attivate quando ibridano con il prodotto specifico della PCR. **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** monitorano l'incremento di fluorescenza emessa e calcolano i "cicli soglia" (Ct) e le temperature di melting (Tm). La quantità di RNA di CMV 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.

3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **CMV RNA ELITe MGB Kit** fornisce i seguenti componenti:

- **CMV RNA PCR Mix,** una miscela ottimizzata e stabilizzata per PCR che contiene i primers e le sonde specifici per:
- lo spliced mRNA del gene UL21.5 di CMV, rilevato nel canale **CMV RNA**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher®, e marcata con il fluoroforo FAM
- una regione di RNA genomico del fago MS2 del Controllo Interno (**IC)**, rilevato nel canale **IC**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 525 (AP525).

CMV RNA PCR Mix contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfato e la DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start). Ciascuna provetta contiene **600 µL** di soluzione, sufficiente per **24 tests**, se si processano almeno 5 campioni per sessione.

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

Il prodotto **CMV RNA ELITe MGB Kit** consente di effettuare **96 test** in associazione con **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius**, utilizzando rispettivamente 20 µL di **CMV RNA PCR Mix e** 0.3 µL di **RT EnzymeMix** per reazione.

4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Tabella 1

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
CMV RNA PCR Mix cod. RTS115ING	Miscela di reagenti per la trascrizione inversa e Real-Time PCR in provetta con **tappo NEUTRO**	**4 x 600 µL**	-
RT EnzymeMix cod. RTS003-RT	Trascrittasi inversa in provetta con **tappo con inserto NERO**	**2 x 20 µL**	-

5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o materiale analogo.
- Agitatore Vortex.
- Centrifuga da banco (~5,000 giri/minuto).
- Microcentrifuga da banco (~13,000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a spostamento positivo (intervallo di volume: 0,5-1000 µL).
- Provette sterili da 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005).
- Provette sterili da 0,5 mL con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.730.005)
- Acqua per biologia molecolare.

6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

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

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

Tabella 2

Strumenti e Software	Prodotti e Reagenti
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA cod. INT030) **ELITe InGenius Software** versione 1.3.0.19 (o successiva) **CMVRNA ELITe_STD**, Assay Protocol (Protocollo di Saggio) con i parametri per l'analisi dei Calibratori **CMVRNA ELITe_PC**, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo **CMVRNA ELITe_NC**, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo **CMVRNA ELITe_PL_600_50**, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di plasma	**CMV RNA ELITe Standard** (EG SpA, cod. STD115ING) **CMV RNA - ELITe Positive Control** (EG SpA, cod. CTR115ING) **CPE - Internal Control** (EG SpA, cod. CTRCPE) **ELITe InGenius SP 1000** (EG SpA, cod. INT033SP1000) Materiali di consumo per **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** (vedere i Manuali di Istruzioni per l'uso di ELITe InGenius ed ELITe BeGenius)
ELITe BeGenius (EG SpA cod. INT040) **ELITe BeGenius Software** versione 2.3.0 (o successiva) **CMVRNA ELITe_Be_STD**, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei Calibratori **CMVRNA ELITe_Be_PC**, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo **CMVRNA ELITe_Be_NC**, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo **CMVRNA ELITe_Be_PL_600_50**, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di plasma	

7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

7.1 Avvertenze e precauzioni generali

- Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare provette, puntali, e gli altri materiali che vengono a contatto con i campioni biologici per almeno 30 minuti con ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o in autoclave a 121 °C per un'ora prima di smaltirlo.
- 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 fornite con il prodotto.
- Durante l'esecuzione del saggio attenersi alle istruzioni fornite con il prodotto.
- Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.
- Utilizzare solo i reagenti in dotazione con il prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.
- Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

7.2 Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

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

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

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

Manipolare i campioni estratti in modo tale da prevenire la dispersione nell'ambiente e per evitare la contaminazione dell'area di lavoro dello strumento.

Manipolare attentamente le cassette di PCR (PCR Cassette) e non aprirle in modo da prevenire la diffusione dei prodotti di PCR e la contaminazione dei campioni e dei reagenti.

7.3 Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Tabella 3

Componente	Temperatura di conservazione	Utilizzo dalla prima apertura	Cicli di congelamento/ scongelamento
CMV RNA PCR Mix	-20 °C o inferiore (protetta dalla luce)	entro 60 giorni	fino a cinque
RT EnzymeMix	-20 °C o inferiore	entro 60 giorni	fino a dieci volte, per un massimo di dieci minuti, a +2 / +8 °C

8 CAMPIONI E CONTROLLI

8.1 Campioni

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

Tabella 4

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto e conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	**+2 / +8 °C**	**-20 ± 10 °C**	**-70 ± 15 °C**
Plasma	EDTA	≤ 24 ore	≤ 24 ore	≤ 1 mese	non testato

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

NOTA

I campioni di sangue intero per la preparazione del Plasma devono essere raccolti in EDTA, trasportati e conservati a temperatura ambiente o a +2 / +8 °C per un massimo di 24 ore prima della centrifugazione.

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

Tabella 5 Assay Protocols per CMV RNA ELITe MGB Kit

Campione	Strumento	Nome Assay Protocol	Report	Caratteristiche
Plasma EDTA	**ELITe InGenius**	**CMVRNA ELITe_PL_600_50**	copie / mL	Volume estrazione in ingresso: 600 µL Volume eluizione: 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
	ELITe BeGenius	**CMVRNA ELITe_Be_PL_600_50**		Volume estrazione in ingresso: 600 µL Volume eluizione: 50 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di diluizione: 1,0 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL

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

NOTA

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

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

Non usare plasma raccolto in eparina, che è un noto inibitore di retrotrascrizione e PCR.

I dati disponibili relativi all'inibizione indotta da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo 11.7 Sostanze potenzialmente interferenti: Cross-reattività pagina 27 al capitolo 11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22.

8.2 Calibratori e Controlli di PCR

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

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

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

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

NOTA

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

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

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

- quando si utilizza un nuovo lotto di reagenti di PCR,
- quando i risultati delle analisi di controllo qualità (vedi paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche,
- quando **ELITe InGenius** o **ELITe BeGenius** è stato sottoposto ad un importante intervento di manutenzione.

8.3 Controlli di qualità

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

9 PROCEDURA ELITe InGenius

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

Tabella 6

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	1) Validazione della curva di calibrazione
		2) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		3) Validazione dei risultati dei campioni
		4) Refertazione dei risultati dei campioni

9.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

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

9.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

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

A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)

B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only),

C. Corsa di Calibrazione (PCR Only),

D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

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

NOTA

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

Prima di impostare una sessione:

1. Scongelare le provette necessarie di **PCR Mix** 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 agitatore le provette per 10 secondi, ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

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

2. Prelevare le provette contenenti **RT EnzymeMix** necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **48 test** in condizioni ottimali (5 o più test per sessione). Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi, per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio o in 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 con tappo a vite (Sarstedt, cod. 72.694.005, non fornito con il kit) per la miscela completa di reazione e contrassegnarla con un pennarello a inchiostro permanente.

4. Calcolare i volumi di **PCR Mix** e **RT EnzymeMix** necessari per preparare la **miscela completa di reazione** in funzione del numero di campioni (N) da analizzare, come descritto nella tabella sottostante

Tabella 7

Numero di campioni (N)	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 completa di reazione** aggiungendo nella provetta da 2 mL i volumi calcolati dei due componenti. Mescolare mediante **agitatore a bassa velocità** la provetta per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte. Centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio o blocco freddo.

NOTA

La **miscela completa di reazione** deve essere utilizzata entro 7 ore se conservata nel blocco refrigerato (per 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione). La **miscela completa di reazione** non può essere conservata per essere riutilizzata.

NOTA

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

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

Tabella 8

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
1	**Identificare i campioni** e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo Trasferire 600 µL di campione in un Extraction tube precedentemente etichettato.**Scongelare** le provette necessarie di controllo interno **CPE** a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 12 reazioni.	**Scongelare** a temperatura ambiente gli **Elution tube** con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.
2	Nella schermata Home, selezionare "**Perform Run**".	Nella schermata Home, selezionare "**Perform Run**".
3	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 1000 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 50 µL.	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 1000 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 50 µL.
4	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
5	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").
6	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" selezionare "PCR Only".
7	Selezionare "Primary tube" o "Extraction tube" nella colonna "Sample Position". Verificare che il "**Dilution factor**" sia "**1.7**".	Nella colonna "Sample Position" selezionare "Elution Tube" (bottom row) come posizione in cui caricare il campione. Verificare che il "**Dilution factor**" sia "**1.7**".
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	**Caricare il CPE e la miscela completa di reazione** nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi	**Caricare la miscela completa di reazione** nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i **Tip Rack**.	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i **Tip Rack**.
12	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
13	Caricare le **PCR cassette**, le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 1000", tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre.	Caricare le **PCR cassette** e gli Elution tube con i campioni da analizzare.
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.

Tabella 8 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
15	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
16	Premere “Start”.	Premere “Start”.

Tabella 9

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	**Scongelare** le provette di **Q-PCR Standard** (Cal1: Q-PCR Standard 10^2, Cal2: Q-PCR Standard 10^3, Cal3: Q-PCR Standard 10^4, Cal4: Q-PCR Standard 10^5) a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	**Scongelare** le provette di **Controllo Positivo** a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. **Preparare il Controllo Negativo** trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un Elution tube, fornito con il prodotto ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata Home, selezionare "**Perform Run**”.	Nella schermata Home, selezionare "**Perform Run**”.
3	Verificare che l’“Extraction Input Volume” sia 1000 µL e che l’”Extracted Elute Volume” sia 50 µL	Verificare che l’“Extraction Input Volume” sia 1000 µL e che l’”Extracted Elute Volume” sia 50 µL
4	Nella colonna “Assay” selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo “Campioni e Controlli”) e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del Q-PCR Standard.	Nella colonna “Assay” selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo “Campioni e Controlli”) e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del Positive Control e dell’acqua per biologia molecolare.
5	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "PCR Only".	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "PCR Only".
6	Verificare nella colonna “Sample Position” che la posizione sia “Eluition Tube”.	Verificare nella colonna “Sample Position” che la posizione sia “Eluition Tube”.
7	**Caricare la miscela completa di reazione** nell’ “Inventory Block” selezionato e digitare il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.	**Caricare la miscela completa di reazione** nell’ “Inventory Block” selezionato e digitare il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
8	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Nell’"Inventory Area" controllare/caricare i **Tip Rack**.	Nell’"Inventory Area" controllare/caricare i **Tip Rack**.
10	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
11	Caricare le **PCR cassette** e le provette per il Q-PCR Standard	Caricare le **PCR cassette** e le provette per il Controllo Positivo ed il Controllo Negativo.
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
14	Premere “Start”.	Premere “Start”.

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

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderli, identificarli e conservarli a -20 C o temperatura inferiore al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

NOTA

La **miscela completa di reazione** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 7 ore (per 2 sessioni di lavoro da 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 la sessione successiva. La **miscela completa di reazione non può** essere conservata per essere riutilizzata.

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

9.3 FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

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

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

NOTA

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

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

1. Validazione della Curva di Calibrazione,
2. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
3. Validazione dei risultati dei campioni,
4. Refertazione dei risultati dei campioni.

9.3.1 Validazione della Curva di Calibrazione

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

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

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

NOTA

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

9.3.2 Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo

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

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

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo scadono **dopo 15 giorni.**

I risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo vengono utilizzati dal **software ELITe InGenius** per impostare la carta di controllo. Nel caso del Controllo Positivo, quattro risultati approvati vengono utilizzati per definire la carta di controllo iniziale. Per maggiori dettagli, consultare il manuale dello strumento.

NOTA

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

NOTA

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

9.3.3 Validazione dei risultati dei campioni

Il **software ELITe InGenius** interpreta i risultati di amplificazione del target (Canale **CMV RNA**) e del controllo Interno (Canale **IC**) con i parametri inclusi nell'Assay Protocol **CMV RNA ELITe_PL_600_50**. I valori dei Ct ottenuti sono convertiti in valori di concentrazione. I risultati vengono mostrati nella schermata "Results Display".

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

Tabella 10

1) Curva di Calibrazione	**Stato**
CMV RNA Q-PCR Standard	APPROVATO
2) Controllo Positivo	**Stato**
CMV RNA Positive Control	APPROVATO

Tabella 10 (segue)

3) Controllo Negativo	Stato
CMV RNA Negative Control	APPROVATO

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

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

Tabella 11

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

NOTA

La quantificazione di CMV RNA è espressa solamente in copie / mL e non può essere correlata alle unità dello Standard Internazionale WHO poiché questo standard è riferito al DNA genomico del CMV.

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

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

In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota in modalità "Extract + PCR" (vedi 14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 34).

I campioni segnalati come "CMV RNA:RNA non rilevato o inferiore a LoD copie/mL", sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il CMV RNA. In tal caso non si può escludere che il CMV RNA sia presente ad una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedi 11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22).

I campioni positivi per il CMV RNA ad una concentrazione inferiore al limite di rilevazione, quando sono rilevati dal saggio, sono identificati nel report come "CMV RNA: RNA rilevato, quantità inferiore a LLoQ copie/mL" (vedi 11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22).

I campioni positivi per il CMV RNA ad una concentrazione all'interno del Range di misurazione lineare sono rilevati e sono identificati nel report come "CMV RNA: RNA rilevato, quantità pari a XXX copie/mL" (vedi 11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22).).

I campioni positivi per il CMV RNA ad una concentrazione oltre il limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio sono identificati nel report come “CMV RNA:RNA rilevato, quantità oltre ULoQ copie/mL” e non sono validi ai fini della quantificazione (vedi 11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22). Se necessario, il campione può essere diluito prima dell’estrazione o la PCR e ritestato al fine di ottenere risultati all’interno del range di misurazione lineare del saggio.

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

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

9.3.4 Refertazione dei risultati dei campioni

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

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

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

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

10 PROCEDURA ELITe BeGenius

La procedura per l’utilizzo del prodotto **CMV RNA ELITe MGB Kit** con **ELITe BeGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 12

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	1) Validazione della curva di calibrazione
		2) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		3) Validazione dei risultati dei campioni
		4) Refertazione dei risultati dei campioni

10.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITe BeGenius** e selezionare la modalità “**CLOSED**”,
- nella sezione “Calibration” della schermata Home, verificare che i Calibratori (**Q - PCR Standard**) siano processati, approvati e validi (Status) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili Calibratori validi, eseguire la sessione dei calibratori come descritto di seguito.
- nella sezione “Controls” della schermata Home, verificare che i Controlli di PCR (**Positive Control, Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili Controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito, selezionare il tipo di

corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo “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.

10.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

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

A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)

B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only),

C. Corsa di Calibrazione (PCR Only),

D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

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

NOTA

ELITe 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 necessarie di **PCR Mix** 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 agitatore le provette per 10 secondi, ripetendo l’operazione per tre volte, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

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

2. Prelevare le provette contenenti **RT EnzymeMix** necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **48 test** in condizioni ottimali (5 o più test per sessione). Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi, per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio o in 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 con tappo a vite (Sarstedt, cod. 72.694.005, non fornito con il kit) per la miscela completa di reazione e contrassegnarla con un pennarello a inchiostro permanente.

4. Calcolare i volumi di **PCR Mix** e **RT EnzymeMix** necessari per preparare la **miscela completa di reazione** in funzione del numero di campioni (N) da analizzare, come descritto nella tabella sottostante

Tabella 13

Numero di campioni (N)	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 completa di reazione** aggiungendo nella provetta da 2 mL i volumi calcolati dei due componenti. Mescolare mediante **agitatore a bassa velocità** la provetta per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte. Centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio o blocco freddo.

NOTA

La **miscela completa di reazione** deve essere utilizzata entro 7 ore se conservata nel blocco refrigerato (per 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione). La **miscela completa di reazione** non può essere conservata per essere riutilizzata.

NOTA

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

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

Tabella 14

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
1	**Identificare i campioni** e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo Trasferire 600 µL di campione in un Tubo Sarstedt da 2 mL o in un tubo primario compatibile, precedentemente etichettato. Nel caso di tubo primario, il volume in eccesso verrà lasciato nel tubo da ELITe BeGenius. **Scongelare** le provette necessarie di controllo interno **CPE** a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 12 reazioni.	**Scongelare** a temperatura ambiente gli **"Elution tube"** con i campioni di acidi nucleici estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.
2	Nella schermata Home, selezionare "**Perform Run**".	Nella schermata Home, selezionare "**Perform Run**".
3	Rimuovere tutti i **Racks** dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i **Racks** dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "Run mode": "**Extract + PCR"**.	Selezionare il "Run mode": "**PCR Only**".
5	**Caricare i campioni** nel "**Sample Rack**". (Nota: quando si utilizzano tubi secondari "2 mL Tube" utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack).	**Caricare gli eluati** dei campioni estratti nell'**"Elution Rack"**.
6	Inserire il "**Sample Rack**" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 5" (L5). Per ogni "Position" d'interesse inserire il "SampleID" (SID). (Se si utilizzano tubi secondari, selezionare "2 mL Tube". Se il tubo secondario non ha etichetta o barcode, digitare manualmente il Sample ID, SID).	Inserire l'"**Elution Rack**" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol.".
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 600 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 50 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 600 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 50 µL.
9	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.

Tabella 14 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
11	Quando devono essere analizzati più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.	Quando devono essere analizzati più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.
12	Caricare gli "**Elution tube**" nell'"**Elution Rack**".	Non applicabile
13	Inserire l'"**Elution Rack**" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). In caso di un numero di campioni maggiore di 12, ripetere usando "Lane 2" (L2).	Non applicabile
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile
15	**Caricare il CPE** e **la miscela completa di reazione** nel "Reagent/Elution Rack".	**Caricare la miscela completa di reazione** nel "Reagent/ Elution Rack".
16	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix e / o CPE inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).
17	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
18	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i "**Tip Rack**".	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i "**Tip Rack**".
19	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
20	Caricare il "**PCR Rack**" con le "**PCR Cassette**" nell' Inventory Area.	Caricare il "**PCR Rack**" con le "**PCR Cassette**" nell' Inventory Area.
21	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
22	Caricare l'"**Extraction Rack**" con le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200" e i consumabili richiesti.	Non applicabile
23	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
24	Premere "Start".	Premere "Start".

Tabella 15

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	**Scongelare** le provette di **Q-PCR Standard** (Cal1: Q-PCR Standard 10^2, Cal2: Q-PCR Standard 10^3, Cal3: Q-PCR Standard 10^4, Cal4: Q-PCR Standard 10^5) a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelare le provette di Controllo Positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. **Preparare** il **Controllo Negativo** trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un "**Elution tube**", fornito con il prodotto ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata Home, selezionare "**Perform Run**".	Nella schermata Home, selezionare "**Perform Run**".
3	Rimuovere i **Racks** dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i **Racks** dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "Run mode": "**PCR Only**".	Selezionare il "Run mode": "**PCR Only**".

Tabella 15 (segue)

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
5	**Caricare** le provette di **Q-PCR Standard** nell' "Elution Rack".	**Caricare** le provette di **Controllo Positivo** e di **Controllo Negativo** nell' "Elution Rack".
6	Inserire l'"**Elution Rack**" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol.".	Inserire l'"**Elution Rack**" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol.".
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 600 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 50 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 600 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 50 µL.
9	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	**Caricare la miscela completa di reazione** nel "Reagent/Elution Rack".	**Caricare la miscela completa di reazione** nel "Reagent/Elution Rack".
12	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) Per ogni PCR Mix inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2). Per ogni PCR Mix inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).
13	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
14	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i "**Tip Rack**".	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i "Tip Rack".
15	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
16	Caricare il "**PCR Rack**" con le "**PCR Cassette**" nell' Inventory Area.	Caricare il "PCR Rack" con le "PCR Cassette" nell' Inventory Area.
17	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
18	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
19	Premere "Start".	Premere "Start".

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

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderli, identificarli e conservarli a -20 C o temperatura inferiore al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

NOTA

La **miscela completa di reazione** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 7 ore (per 2 sessioni di lavoro da 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 la sessione successiva. La **miscela completa di reazione non può** essere conservata per essere riutilizzata.

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

10.3 FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

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

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

NOTA

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

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

1. Validazione della Curva di Calibrazione
2. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
3. Validazione dei risultati dei campioni
4. Refertazione dei risultati dei campioni

NOTA

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

11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

11.1 Limite di Rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) del saggio è stato definito con campioni di plasma sullo strumento ELITe InGenius e positivizzati utilizzando diluizioni del materiale di riferimento di CMV RNA (Università di Torino).

L'analisi di regressione Probit dei dati è stata eseguita sui risultati e il LoD è stato stimato come la concentrazione del campione che ha una probabilità del 95% di risultare positivo.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 16 Limite di Rilevazione per campioni di Plasma e ELITe InGenius

Target	LoD	Intervallo di confidenza 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
CMV RNA	0.19 PFU/mL	0.15 PFU/mL	0.29 PFU/mL
	30 copie/mL	N.A.	N.A.

Il valore di LoD calcolato è stato verificato testando campioni di plasma positivizzati con il materiale di riferimento di CMV RNA (Università di Torino) al valore dichiarato. I risultati hanno confermato la concentrazione calcolata per il target.

Il valore di LoD calcolato, 30 copie/mL, è stato verificato in associazione a ELITe BeGenius testando campioni di plasma positivizzati con il materiale di riferimento di CMV RNA (NoToVir) al valore dichiarato. I risultati hanno confermato la concentrazione calcolata per il target.

11.2 Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare del saggio è stato definito con campioni di plasma sugli strumenti ELITe InGenius ed ELITe BeGenius utilizzando diluizioni del materiale di riferimento di CMV RNA (NoToVir). La regressione lineare è stata eseguita sui risultati ed è stato verificato l'intervallo di misurazione lineare.

I risultati sono riportati nelle seguenti figure.

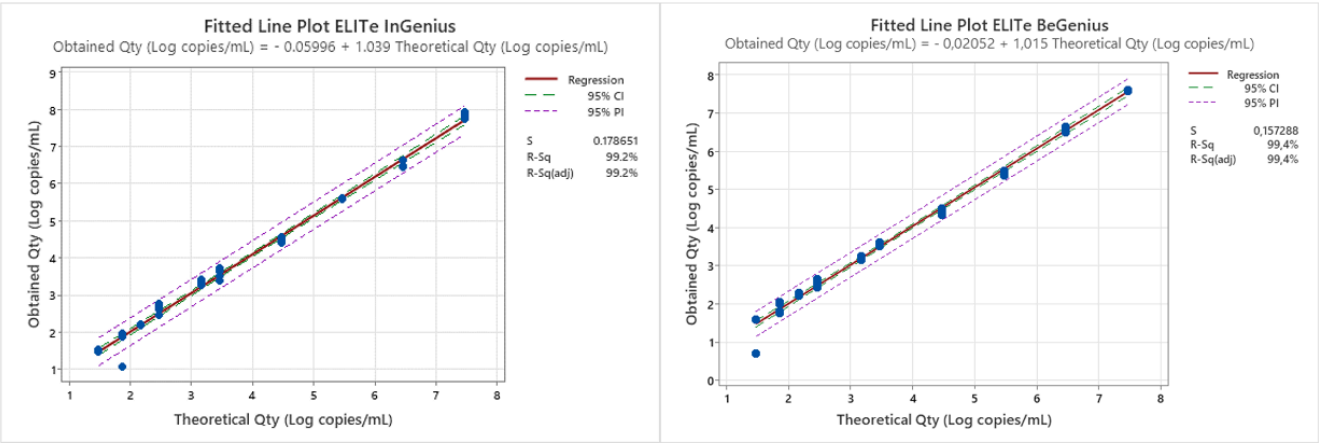


Fig. 1

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 17 Intervallo di misurazione lineare per campioni di Plasma EDTA e ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Limite Inferiore	Limite Superiore
30 copie / mL	29.392.000 copie / mL

I risultati ottenuti con ELITe InGenius e ELITe BeGenius sono stati analizzati mediante regressione ortogonale e lineare al fine di calcolare la correlazione tra i due metodi.

I risultati sono riassunti nella figura seguente.

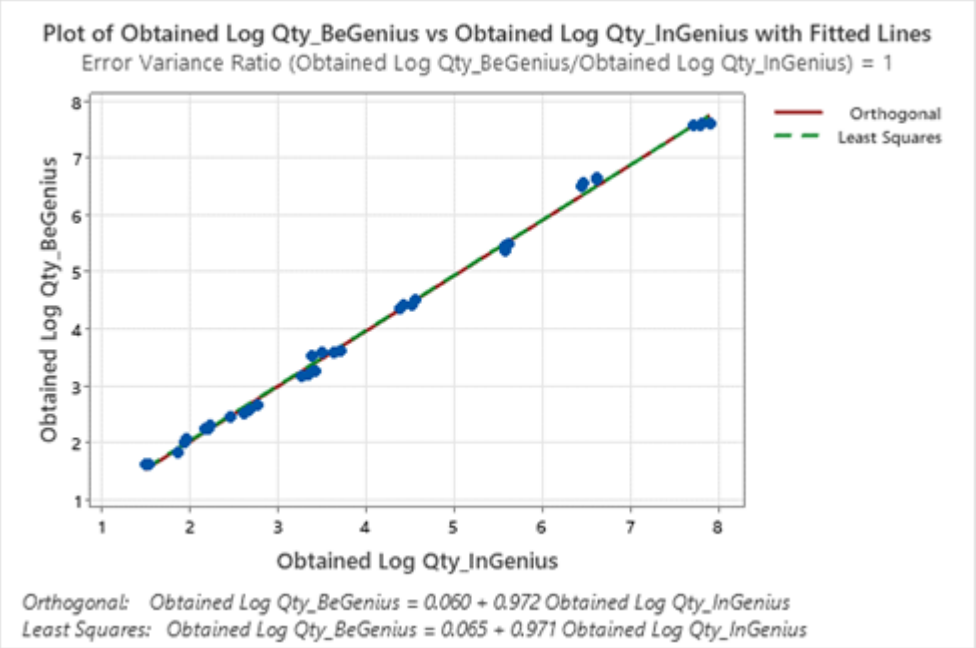


Fig. 2

La regressione ortogonale ha generato un'intercetta di 0,060 (95% CI: -0,015; 0,135) e una pendenza uguale a 0,972 (95% CI: 0,956; 0,989). La regressione lineare ha generato un R2 di 0,997.

11.3 Incertezza della Curva Standard

Il valore di incertezza della curva standard è stato calcolato combinando gli errori casuali (SD) di tutte le quantificazioni dei livelli e moltiplicando per il fattore di copertura k = 2 (Incertezza Combinata Espansa) ed è pari a 0,1588 Log copie/ reazione.

Tabella 18

Livelli di curva standard	Teorico	SD	Incertezza Combinata Estesa
	Log c/rxn		
CMV RNA Standard 10^5	5,0000	0,0273	0,1588
CMV RNA Standard 10^4	4,0000	0,0234	
CMV RNA Standard 10^3	3,0000	0,0329	
CMV RNA Standard 10^2	2,0000	0,0627	

11.4 Inclusività: Efficienza di rilevazione e quantificazione su differenti genotipi

L'inclusività del saggio, come efficienza di rilevazione su diversi genotipi e ceppi di CMV, è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nei database dei nucleotidi.

L'analisi ha mostrato una sufficiente conservazione di sequenza e l'assenza di mutazioni significative. Quindi si prevede un'efficiente rilevazione e quantificazione per i diversi genotipi e ceppi di CMV.

L' inclusività del saggio è stata verificata, in associazione a ELITe InGenius, analizzando diversi materiali di riferimento (ATCC e Università di Torino) a bassa concentrazione.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 19

ceppo CMV	Pos. / Rep.	Esito
AD169	3 / 3	CMV RNA rilevato
Towne	3 / 3	CMV RNA rilevato
Davis	3 / 3	CMV RNA rilevato
Merlin	3 / 3	CMV RNA rilevato

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati postivi per CMV RNA con CMV RNA ELITe MGB Kit e ELITe InGenius.

11.5 Organismi potenzialmente interferenti: Cross-reattività

La potenziale cross-reattività del saggio con il DNA genomico di CMV e con altri microrganismi è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nei database dei nucleotidi.

L'analisi ha mostrato differenze significative con il DNA genomico di CMV pertanto, non è attesa alcuna cross-reattività. L'analisi non ha mostrato alcuna omologia significativa con altri organismi diversi da quello in interesse; pertanto, non è attesa alcuna cross-reattività.

La potenziale cross-reattività con altri organismi che possono essere presenti nei campioni clinici di Plasma, è stata verificata anche, in associazione a ELITe InGenius, mediante l'analisi di un pannello di materiali di riferimento certificati (ATCC e NIBSC) ad alto titolo.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 20

Campione	Pos. / Rep.	Esito
HIV1	0 / 3	Nessuna cross-reattività
EBV	0 / 3	Nessuna cross-reattività
HAV	0 / 3	Nessuna cross-reattività
HBV	0 / 3	Nessuna cross-reattività
HHV6	0 / 3	Nessuna cross-reattività
HSV1	0 / 3	Nessuna cross-reattività
HSV2	0 / 3	Nessuna cross-reattività
HEV	0 / 3	Nessuna cross-reattività
RSV	0 / 3	Nessuna cross-reattività
VZV	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Influenza A virus (H1N1)	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Influenza B virus (Florida)	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Dengue Virus Type 3	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Adenovirus 2	0 / 3	Nessuna cross-reattività
West Nile Virus	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Echovirus 4	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Parvovirus B19	0 / 3	Nessuna cross-reattività

Tabella 20 (segue)

Campione	Pos. / Rep.	Esito
HCV	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Aspergillus fumigatus	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Staphylococcus aureus	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Candida albicans	0 / 3	Nessuna cross-reattività

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti testati non hanno mostrato alcuna cross-reattività per l'amplificazione del target CMV RNA utilizzando il CMV RNA ELITe MGB Kit.

11.6 Organismi potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione del saggio da parte di altri organismi che possono essere presenti nei campioni clinici di plasma è stata verificata attraverso l'analisi di un pannello di materiali di riferimento certificati (ATCC e NIBSC) ad alto titolo positivizzati con materiale di riferimento di CMV RNA (Università di Torino) ad una concentrazione di 3x LoD.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 21

Campione	Pos. / Rep.	Esito
HIV1	3 / 3	Nessuna inibizione
EBV	3 / 3	Nessuna inibizione
HAV	3 / 3	Nessuna inibizione
HBV	3 / 3	Nessuna inibizione
HHV6	3 / 3	Nessuna inibizione
HSV1	3 / 3	Nessuna inibizione
HSV2	3 / 3	Nessuna inibizione
HEV	3 / 3	Nessuna inibizione
RSV	3 / 3	Nessuna inibizione
VZV	3 / 3	Nessuna inibizione
Influenza A virus (H1N1)	3 / 3	Nessuna inibizione
Influenza B virus (Florida)	3 / 3	Nessuna inibizione
Dengue Virus Type 3	3 / 3	Nessuna inibizione
Adenovirus 2	3 / 3	Nessuna inibizione
West Nile Virus	3 / 3	Nessuna inibizione
Echovirus 4	3 / 3	Nessuna inibizione
Parvovirus B19	3 / 3	Nessuna inibizione
HCV	3 / 3	Nessuna inibizione
Aspergillus fumigatus	3 / 3	Nessuna inibizione

Tabella 21 (segue)

Campione	Pos. / Rep.	Esito
Staphylococcus aureus	3 / 3	Nessuna inibizione
Candida albicans	3 / 3	Nessuna inibizione

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti testati non hanno mostrato alcuna inibizione dell'amplificazione e quantificazione del target CMV RNA utilizzando il CMV RNA ELITe MGB Kit.

11.7 Sostanze potenzialmente interferenti: Cross-reattività

La cross-reattività del saggio da parte di sostanze potenzialmente interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero trovarsi nei campioni clinici di Plasma è stata valutata mediante analisi di un pannello di sostanze a concentrazioni rilevanti.

I risultati sono riportati nella tabella seguente

Tabella 22

Campione	Pos. / Rep.	Esito
Plasma Itterico	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Plasma lipemico	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Sangue emolitico (alto grado)	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Sangue emolitico (medio grado)	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Sangue emolitico (basso grado)	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Plasma eparinato	0 / 3	Campione Invalido
Plasma EDTA	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Azitromicina	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Ciclosporina A	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Valganciclovir	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Cidofovir	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Abacavir	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Ganciclovir	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Foscarnet	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Ribavirin	0 / 3	Nessuna cross-reattività
Letermovir	0 / 3	Nessuna cross-reattività

Il test ha dimostrato che tutte le sostanze, ad eccezione dell'eparina, non cross-reagiscono nell'amplificazione di CMV RNA utilizzando il CMV RNA ELITe MGB Kit.

È stato confermato che l'eparina è in grado di inibire il saggio. Tuttavia, questi campioni sono risultati "non validi" anziché falsi "negativi" a causa del fallimento del controllo interno (IC Ct > 32).

11.8 Sostanze potenzialmente interferenti: Inibizione

L' inibizione del saggio da parte di sostanze potenzialmente interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero trovarsi nei campioni clinici di plasma è stata valutata, in associazione a ELITe InGenius, mediante analisi di un pannello di sostanze a concentrazione rilevanti positivizzate con materiale di riferimento di CMV RNA (Università di Torino) ad una concentrazione di 3xLoD.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 23

Sostanza	Pos. / Rep.	Esito
Plasma Itterico	3 / 3	Nessuna inibizione
Plasma lipemico	3 / 3	Nessuna inibizione
Sangue emolitico (alto grado)	3 / 3	Nessuna inibizione
Sangue emolitico (medio grado)	3 / 3	Nessuna inibizione
Sangue emolitico (basso grado)	3 / 3	Nessuna inibizione
Plasma eparinato	0 / 3	Campione invalido
Plasma EDTA	3 / 3	Nessuna inibizione
Azithromycin	3 / 3	Nessuna inibizione
Cyclosporine A	3 / 3	Nessuna inibizione
Valganciclovir	3 / 3	Nessuna inibizione
Cidofovir	3 / 3	Nessuna inibizione
Abacavir	3 / 3	Nessuna inibizione
Ganciclovir	3 / 3	Nessuna inibizione
Foscarnet	3 / 3	Nessuna inibizione
Ribavirin	3 / 3	Nessuna inibizione
Letermovir	3 / 3	Nessuna inibizione

Tutte le sostanze potenzialmente interferenti testate, ad eccezione dell'eparina, non hanno mostrato alcuna inibizione dell'amplificazione e quantificazione del target CMV RNA utilizzando il CMV RNA ELITe MGB Kit.

È stato confermato che l'eparina è in grado di inibire il saggio. Tuttavia, questi campioni sono risultati "non validi" anziché falsi "negativi" a causa del fallimento del controllo interno (IC Ct > 32).

11.9 Cross-contaminazione

La possibile cross-contaminazione è stata valutata, in associazione con ELITe InGenius, testando 30 campioni di plasma negativi per CMV RNA alternati a 30 campioni di plasma positivizzati con materiale di riferimento di CMV RNA (Università di Torino) ad alto titolo.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 24

Campioni	N	Negativi	Positivi	Concordanza
Plasma positivizzato con CMV RNA a ~1x10^6 copie/mL	30	0	30	100%
Plasma negativo per CMV RNA	30	30	0	100%

Nessuno dei campioni negativi per CMV RNA ha dato risultati falsi positivi. In questo test, non è stata rilevata alcuna cross-contaminazione né all'interno delle sessioni né tra le sessioni.

11.10 Tasso totale di errore del sistema

Il tasso totale di errore del sistema è stato valutato, in associazione a ELITe InGenius, analizzando un panello di campioni positivizzati con materiale di riferimento di CMV RNA (Università di Torino) ad una concentrazione di 3x LoD

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 25

Campioni	N	Negativi	Positivi	Tasso totale di errore del sistema
Plasma positivizzato con CMV RNA	50	0	50	0%

Nessuno dei campioni positivi per CMV RNA ha dato risultati falsi negativi. In questo test, il tasso totale di errore del sistema è pari a 0%.

11.11 Ripetibilità

La ripetibilità Intra-Sessione e Inter-Sessione del saggio è stata valutata su ELITe InGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di Plasma, costituito da un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento di CMV RNA (Università di Torino) ad una concentrazione di 3x LoD e 10x LoD.

Un esempio dei risultati di ripetibilità Intra-Sessione (su un giorno) è riportato nelle seguenti tabelle.

Tabella 26 ELITe InGenius Ripetibilità Intra – Sessione (Giorno 1)

Campione	Pos. / Rep.	Ct medio	SD	% CV	Concordanza
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x LoD	8 / 8	33,19	0,43	1,30	100%
10x LoD	8 / 8	31,69	0,09	0,27	100%

Un esempio dei risultati di ripetibilità Inter-Sessione (su due giorni) è riportato nelle seguenti tabelle.

Tabella 27 ELITe InGenius Ripetibilità Inter – Sessione (Giorno 1 e Giorno 2)

Campione	Pos. / Rep.	Ct medio	SD	% CV	Concordanza
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x LoD	16 / 16	33,19	0,34	1,03	100%
10x LoD	16 / 16	31,62	0,18	0,56	100%

Nel test di ripetibilità, in associazione con ELITe InGenius, il CMV RNA ELITe MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima di valori di Ct come CV% minore del 5%.

La ripetibilità Intra-Sessione e Inter-Sessione del saggio è stata valutata su ELITe BeGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di Plasma, costituito da un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento di CMV RNA (NoToVir) ad una concentrazione di 3x LoD e 10x LoD.

Un esempio dei risultati di ripetibilità Intra-Sessione (su un giorno) è riportato nelle seguenti tabelle.

Tabella 28 ELITe BeGenius Ripetibilità Intra – Sessione (Giorno 1)

Campione	Pos. / Rep.	Ct medio	SD	% CV	Concordanza
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x LoD	8 / 8	36,17	0,87	2,40	100%
10x LoD	8 / 8	33,64	0,28	0,82	100%

Un esempio dei risultati di ripetibilità Inter-Sessione (su due giorni) è riportato nelle seguenti tabelle.

Tabella 29 ELITe BeGenius Ripetibilità Inter – Sessione (Giorno 1 e Giorno 2)

Campione	Pos. / Rep.	Ct medio	SD	% CV	Concordanza
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x LoD	16 / 16	35,82	0,79	2,22	100%
10x LoD	16 / 16	33,54	0,29	0,86	100%

Nel test di ripetibilità, in associazione con ELITe BeGenius, il CMV RNA ELITe MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima di valori di Ct come CV% minore del 5%.

11.12 Riproducibilità

La riproducibilità Inter-Lotto e Inter-Strumento del saggio è stata valutata su ELITe InGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di Plasma, costituito da un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento di CMV RNA (Università di Torino) ad una concentrazione di 3x LoD e di 10x LoD.

Un riassunto di riproducibilità Inter-Lotto (con tre lotti) è mostrato nelle seguenti tabelle.

Tabella 30 ELITe InGenius Riproducibilità Inter – Lotto

Campione	Pos. / Rep.	Ct medio	SD	% CV	Concordanza
Negativo	0 / 48	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x LoD	48 / 48	33,18	0,33	0,99	100%
10x LoD	48 / 48	31,47	0,31	1,00	100%

Un riassunto di riproducibilità Inter-Strumento (con tre strumenti) è mostrato nelle seguenti tabelle.

Tabella 31 ELITe InGenius Riproducibilità Inter – Strumento

Campione	Pos. / Rep.	Ct medio	SD	% CV	Concordanza
Negativo	0 / 24	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x LoD	24 / 24	34,53	0,56	1,63	100%
10x LoD	24 / 24	32,28	0,31	0,97	100%

Nel test di riproducibilità, in associazione con ELITe InGenius, il CMV RNA ELITe MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct come CV% minore del 5%.

La riproducibilità Inter-Lotto e Inter-Strumento del saggio è stata valutata su ELITe BeGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di Plasma, costituito da un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento di CMV RNA (NoToVir) ad una concentrazione di 3x LoD e di 10x LoD.

Un esempio di Riproducibilità Inter-Lotto (su uno strumento, con 2 lotti) è mostrato nella seguente tabella.

Tabella 32 ELITe BeGenius Riproducibilità Inter – Lotto

Campione	Pos. / Rep.	Ct medio	SD	% CV	Concordanza
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x LoD	8 / 8	34,96	0,16	0,46	100%
10x LoD	8 / 8	32,80	0,25	0,75	100%

Un riassunto di riproducibilità Inter-Strumento (con due strumenti) è mostrato nella seguente tabella.

Tabella 33 ELITe BeGenius Riproducibilità Inter – Strumento

Campione	Pos. / Rep.	Ct medio	SD	% CV	Concordanza
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x LoD	16 / 16	34,48	0,58	1,67	100%
10x LoD	16 / 16	32,58	0,34	1,05	100%

Nel test di riproducibilità, in associazione con ELITe BeGenius, il CMV RNA ELITe MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct come CV% minore del 5%.

11.13 Specificità Diagnostica: Conferma dei campioni negativi

La Specificità Diagnostica del saggio, intesa come concordanza percentuale negativa con il metodo di riferimento, è stata valutata analizzando campioni clinici di plasma negativi per il CMV DNA testati da un laboratorio esterno con un metodo di riferimento di diagnostica molecolare marcato CE IVD (EG SpA).

Poiché ELITe BeGenius possiede performance analitiche equivalenti a ELITe InGenius, le performance diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono anch'esse considerate equivalenti. Quindi la Specificità Diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITe InGenius è anche riferibile ad ELITe BeGenius.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 34

Campioni	N	Positivi	Negativi	Invalidi	% Specificità Diagnostica
Plasma da sangue intero CMV DNA negativo	100	0	100	0	100%

La Specificità Diagnostica di CMV RNA ELITe MGB Kit è risultata uguale al 100%.

Il cut-off del Ct del Controllo Interno è impostato a 32 per la matrice plasma.

11.14 Sensibilità Diagnostica: Conferma dei campioni positivi

La Sensibilità Diagnostica del saggio, intesa come concordanza percentuale positiva con il metodo di riferimento e con il materiale di riferimento, è stata valutata analizzando:

- campioni clinici di plasma positivi per CMV DNA, provenienti da 8 pazienti trapiantati sottoposti a terapia antivirale con inibitori del complesso CMV terminasi (Letermovir, PREVYMIS™, Merck & Co), testati da un laboratorio esterno con un metodo di riferimento di diagnostica molecolare marcato CE IVD (EG SpA) dopo il trattamento con DNasi (I. Cassaniti et al. 2021),
- campioni clinici di plasma positivizzati con materiale di riferimento positivo per CMV RNA (Università di Torino) ad una concentrazione di 3x, 5x, 10x, 30x e 50x LoD.

Poiché ELITe BeGenius possiede performance analitiche equivalenti a ELITe InGenius, le performance diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono anch'esse considerate equivalenti. Quindi la Sensibilità Diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITe InGenius è anche riferibile ad ELITe BeGenius.

I risultati della Sensibilità diagnostica, dopo analisi dei discrepanti, sono riassunti nella tabella seguente

Tabella 35

Campioni	N	Positivi	Negativi	Invalidi	% Sensibilità Diagnostica
Plasma positivo per CMV DNA dopo trattamento con DNasi	10	9	1	0	90%
Plasma positivizzato con CMV RNA	70	70	0	0	100%
Tutti campioni di plasma	80	79	1	0	98,75%

La Sensibilità Diagnostica complessiva di CMV RNA ELITe MGB Kit è risultata uguale al 98,75%.

11.15 Sensibilità Diagnostica: Concordanza tra metodi

La Sensibilità Diagnostica, come concordanza con il metodo di riferimento, utilizzando il valore Kappa di Cohen, è stata valutata analizzando campioni clinici di plasma negativi e postivi per CMV DNA provenienti da 27 pazienti trapiantati sottoposti a terapia antivirale con inibitori del complesso CMV terminasi (Letermovir, PREVYMIS™, Merck & Co.), testati da un centro esterno con un metodo di riferimento marcato CE IVD (EG SpA) dopo trattamento con DNasi (I. Cassaniti et al. 2021).

Poiché ELITe BeGenius possiede performance analitiche equivalenti a ELITe InGenius, le performance diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono anch'esse considerate equivalenti. Quindi la Specificità Diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITe InGenius è anche riferibile ad ELITe BeGenius.

I risultati della Sensibilità Diagnostica, dopo analisi dei discrepanti, sono riassunti nella seguente tabella.

Tabella 36

		CMV DNA dopo trattamento con DNase		
		Pos	**Neg**	**Totale**
CMV RNA ELITe MGB Kit	**Pos**	9	2	11
	Neg	1	81	82
	Totale	10	83	93

Il CMV RNA ELITe MGB Kit ha generato un'Area sotto Curva (AUC) del 96,8% e un valore Kappa di Cohen pari a 0,839 corrispondente a un perfetto accordo con i risultati ottenuti con la DNAemia di CMV dei campioni di plasma trattati con DNasi.

NOTA

I dati ed i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "CMV RNA ELITe MGB Kit", FTP 115ING..

12 BIBLIOGRAFIA

W. D. Rawlinson et al. (1993) *J. Virology* 67: 5502 - 5513

D. Wang et al. (2004) *PNAS* 101: 16642 - 16647

W. A. Bresnahan (2000) *Science* 288: 2373 - 2376

A. E. Greijer et al. (2000) *J. Virology* 74: 9078 - 9082

E. Terhune et al. (2004) *J. Virology* 78: 10390 - 10398

E. Sarcinella et al. (2004) *Virus Research* 104: 129 - 137

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

G. Gerna et al. (2019) *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 20: 1429 - 1438

I. Cassaniti et al. (2021) *Am. J. Transplantat.* 21: 1622 - 1628

C. N. Kotton et al. (2025) *Transplantation* 1; 109(7):1066-1110

G. Piccirilli et al. (2024) *J. Clinical Microbiology* 62(5): e0163023.

13 LIMITI DELLA PROCEDURA

Questo prodotto è esclusivamente ad uso ricerca (RUO).

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

Al momento non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con altri campioni

Il Plasma raccolto in EDTA deve essere separato dal sangue intero conservato a temperatura ambiente +2 / +8 ° C per non più di 24 ore

Non utilizzare con questo prodotto l'RNA estratto da campioni eparinati: l'eparina inibisce la reazione di retro-trascrizione e amplificazione degli acidi nucleici e causa 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 necessario, pertanto, procedere con cautela durante queste fasi e seguire attentamente le istruzioni per l'uso riportate nel manuale fornito con il prodotto.

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

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

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

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

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

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che l'RNA target non è stato rilevato nell' RNA estratto dal campione, ma non si può escludere che l'RNA target abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (si veda. 11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22 In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi per il fallimento del controllo interno. In questo caso il campione dovrà essere analizzato di nuovo, a cominciare dall'estrazione, con conseguente possibile ritardo nel conseguimento dei risultati finali.

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

14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Tabella 37

Reazione del Controllo Positivo o dei Q - PCR Standard o della Curva standard non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione, Q-PCR Standard e del Controllo Positivo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione, Q-PCR Standard e del Controllo Positivo.
Errore di preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzati durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Degradazione della miscela completa di reazione o dei suoi componenti.	Non utilizzare la miscela completa di reazione per più di tre sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Non lasciare la RT EnzymeMix a temperatura più alte di -20 °C più di 10 minuti. Preparare nuovamente la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Degradazione del Controllo Positivo o dei Q-PCR Standards.	Non utilizzare i Q-PCR Standard per più di 4 sessioni indipendenti (2 ore ciascuna nell'area di estrazione o nell'unità refrigerata) Non utilizzare il Controllo Positivo per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione o nell'unità refrigerata). Utilizzare nuove aliquote di Q-PCR Standard o Controllo Positivo
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A.

Tabella 38

Reazione del Controllo Negativo non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione e del Controllo Negativo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione 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 completa di reazione o dei suoi componenti.	Preparare nuovamente la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack e dell'area reagenti o dell'unità refrigerata.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

Tabella 39

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione, del Controllo Interno e del campione. Controllare i volumi della miscela completa di reazione, del Controllo Interno e del campione.
Errore di preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzati durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Degradazione della miscela completa di reazione o dei componenti.	Non utilizzare la miscela completa di reazione per più di tre sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Non lasciare l'RT EnzymeMix a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti. Preparare nuovamente la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Degradazione del Controllo Interno.	Utilizzare una nuova aliquota di Controllo Interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR)". Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione in una sessione in modalità "Extract + PCR".
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

Tabella 40

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

Tabella 41

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

Tabella 42

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

15 LEGENDA DEI SIMBOLI

REF	Numero di catalogo
	Limite superiore di temperatura
LOT	Codice del lotto.
	Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).
IVD	Dispositivo medico diagnostico *in vitro* .
CE 0123	Conforme ai requisiti del Regolamento Europeo 2017/746/EC relativo ai dispositivi medici diagnostici *in vitro*. Certificazione rilasciata da TÜV SÜD Product Service GmbH, Germany.
UDI	Numero Unico Identificativo del dispositivo
	Contenuto sufficiente per "N" test.
	Consultare le istruzioni per l'uso
CONT	Contenuto.
	Tenere lontano dalla luce solare.
	Fabbricante.

16 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 in cui risiedono l'utilizzatore e/o il paziente. Per informare ELITechGroup S. p. A., fabbricante di questo dispositivo, si prega di utilizzare il seguente indirizzo e-mail: egspa.vigilance@elitechgroup.com.

Una "Sintesi della Sicurezza e delle Prestazioni" (Summary of Safety and Performance) sarà resa disponibile al pubblico attraverso la Banca Dati Europea sui Dispositivi Medici (Eudamed) quando questo sistema informatico sarà operativo. Prima della pubblicazione dell'avviso di piena funzionalità di Eudamed, il "Summary of Safety and Performance" sarà resa disponibile al pubblico su richiesta via e-mail all'indirizzo emd.support@elitechgroup.com, senza indebito ritardo.

17 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

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

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

Il "Method for the detection and quantification of human cytomegalovirus by means of virion RNAs" è coperto dal brevetto italiano 102020000007357 e oggetto di domande di brevetto.

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

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

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

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



CAUTION

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

INTENDED USE

The product **CMV RNA 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 **human Cytomegalovirus virion mRNA (CMV RNA)** extracted from non-cellular clinical specimens.

The assay is validated in association with the **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.

The product is intended for use as an aid in monitoring of CMV infection in CMV-infected individuals undergoing antiviral therapy with inhibitors of the CMV terminase complex.

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

This product is not intended to be used to detect the presence of or exposure to or for screening for 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. This product is not intended to be used for CMV screening in pregnant women.

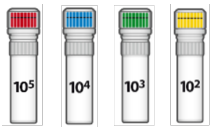
Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target	UL21.5 mRNA (spliced region)	FAM	CMV RNA
Internal Control	phage MS2	AP525	IC

Validated matrices

- **Plasma** collected in EDTA

Kit content and related products

CMV RNA ELITe MGB Kit (RTS115ING)		CMV RNA ELITe Standard (STD115ING)	CMV RNA - ELITe Positive Control (CTR115ING)
 X 4		 X 2	 X 2
CMV RNAPCR 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 4 levels: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 set of 4 tubes of 160 µL 4 freeze-thaw cycles	Ready-to-use Positive Control 2 tubes of 160 µL 8 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles
Maximum shelf-life: **18 months** Storage Temperature: **-20 °C**		Maximum shelf-life: **24 months** Storage Temperature: **-20 °C**	Maximum shelf-life: **24 months** Storage Temperature: **-20 °C**

Other products required not provided in the kit

- ELITe InGenius instrument: INT030.
- ELITe BeGenius instrument: INT040.
- ELITe InGenius SP 1000: INT033SP1000.
- CPE - Internal Control: CTRCPE
- **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** Consumables (see ELITe InGenius and ELITe BeGenius Instruction for Use)

ELITe InGenius and ELITe BeGenius protocol

Table 43

› Extraction Input Volume	600 µL	› PCR Mix volume	20 µL
› CPE volume	10 µL	› Frequency of controls	15 days
› Extraction Elution Volume	50 µL	› Frequency of calibration	60 days
› Sample PCR input volume	20 µL	› Unit of quantitative result	copies/mL

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Sensitivity	Specificity
Plasma EDTA	30 copies / mL	**98.75%** *80 tested samples*	**100%** *100 tested samples*

Sample preparation

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

Table 44

Specimen	Collection requirements	Transport / Storage conditions			
		+16 / +26 °C (room temperature)	**+2 / +8 °C**	**-20 ± 10 °C**	**-70 ± 15 °C**
Plasma	EDTA	≤ 24 hours	≤ 24 hours	≤ 1 month	Not Tested

ELITe InGenius Procedures

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

Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius. Log in with username and password. Select the mode "**CLOSED**".	**2.** Verify 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** (protect from light) and the **CTRCPE** tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec. Keep the **RT EnzymeMix** in ice or cool block.

4. Prepare the complete reaction mixture

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

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

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-barcode reader or type the sample ID.
4. Select the "Assay Protocol": CMVRNA ELITe_PL_600_50	**5.** Select the method "Extract + PCR" and the sample position "Extraction Tube". ". Ensure the "Dilution factor" is "1.7"	**6.** Load the complete reaction mixture 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.

NOTE

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

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

1. to 4. Follow the Procedure 1 described above (select the Assay Protocols: CMVRNA ELITe_PC and CMVRNA ELITe_NC or CMVRNA ELITe_STD or CMVRNA ELITe_PL_600_50)	**5.** Select the method “PCR Only” and 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

ELITe BeGenius Procedures

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

Before analysis

1. Switch on ELITe 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. Note: all must have been run, approved and not expired.	**3.** Thaw the **PCR Mix** (protect from light) and the **CTRCPE** tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec. Keep the **RT EnzymeMix** in ice or cool block.

4. Prepare the complete reaction mixture:

Samples Number (N)	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: Extract + PCR (e.g., samples)

1. Select “Perform Run” on the touch screen and then click on the run mode «Extract + PCR»	**2.** Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the Cooler Unit. The barcode scan is already active	**3.** Verify the extraction volumes: Input: “1000 µL”, Eluate: “50 µL”
4. Select the “Assay protocol”: (CMVRNA ELITe_Be_PL_600_50 **Note:** If a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4	**5.** Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	**6.** Load the complete reaction mixture and the Internal Control in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
7. Load “PCR Rack” with “PCR Cassette” and the “Extraction Rack” with the “ELITe InGenius SP 200” extraction cartridges and the required extraction consumables	**8.** Close the door. Start the run	**9.** View, approve and store the results

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

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

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «PCR Only»	**2.** Load the extracted nucleic acid or controls barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	**3.** Verify the extraction volumes: Input: "1000 µL", Eluate: "50 µL"
4. Select the "Assay protocol" of interest (CMVRNA ELITe_Be_PC and (CMVRNA ELITe_Be_NC or (CMVRNA ELITe_Be_STD or (CMVRNA ELITe_Be_PL_600_50)	**5.** Load the complete reaction mixture in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	**6.** Load "PCR Rack" with "PCR Cassette"
7. Close the door. Start the run	**8.** View, approve and store the results	

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