

## AVVERTENZA del 13/01/2026

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

### «Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit» Ref. RTS160ING

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- Sostituzione della provetta da 2 mL 953-217 e del tappo bianco 953-223 con la provetta da 2 mL 953-065 per il componente PCR Mix.
- Aggiornamento del paragrafo "Simboli" con il simbolo "Consultare le istruzioni per l'uso".
- Aggiornamento del paragrafo "Avviso per l'acquirente: licenza limitata".

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

### NOTA BENE

|                                                                                     |                                                                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT                     |
|  | THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT                         |
|  | CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT |
|  | LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT                          |
|  | A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT                                  |
|  | DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS            |



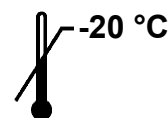
ELITechGroup S.p.A.  
C.so Svizzera, 185  
10149 Torino ITALIA

Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11  
E-mail: [emd.support@elitechgroup.com](mailto:emd.support@elitechgroup.com)  
Sito internet: [www.elitechgroup.com](http://www.elitechgroup.com)

## Respiratory Viral PLUS ELITE MGB<sup>®</sup> Kit

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

REF RTS160ING



### INDICE

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

### USO PREVISTO

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

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

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

## PRINCIPIO DEL SAGGIO

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

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

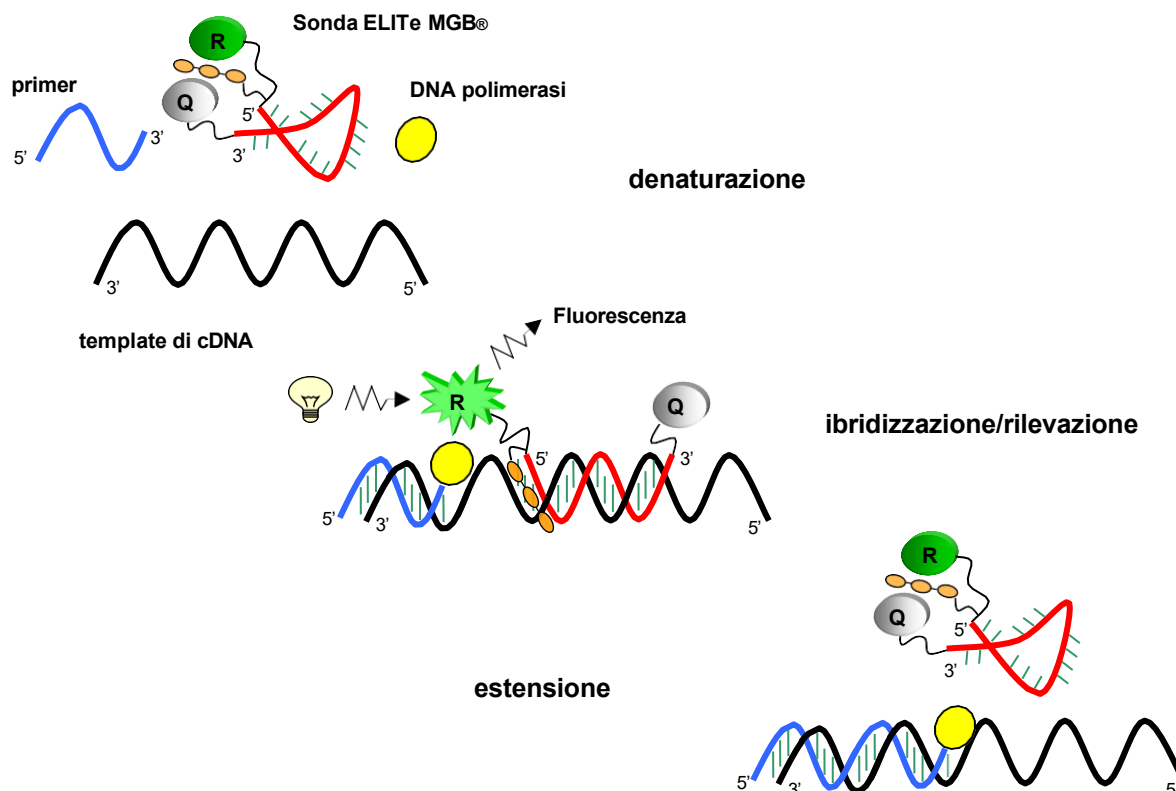
- sequenza del gene che codifica per la proteina di matrice di FluA, rilevata dalla sonda specifica nel canale **FluA** (canale 5),
- sequenza del gene che codifica per la proteina di matrice di FluB, rilevata dalla sonda specifica nel canale **FluB** (canale 1),
- sequenza del gene che codifica per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

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

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

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

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



## DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

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

- **RV PLUS PCR Mix**

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

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

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

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

- **RT EnzymeMix**

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

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

## MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO

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

## MATERIALE RICHIESTO MA NON IN DOTAZIONE

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

### ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

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

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

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

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

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

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

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

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

### AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

#### Avvertenze e precauzioni generali

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

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

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

Non pipettare a bocca alcuna soluzione.

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

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

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

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

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

Rispettare la data di scadenza del prodotto.

Utilizzare solo i reagenti presenti nel prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

### Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

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

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

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

Manipolare i reagenti sotto una cappa a flusso laminare. Preparare i reagenti necessari per la trascrittasi inversa e l'amplificazione in modo che il volume sia sufficiente per un'unica sessione. Utilizzare le pipette destinate alla manipolazione dei reagenti unicamente per questo scopo. Utilizzare pipette a spostamento positivo o con puntali con filtro per aerosol. Utilizzare puntali sterili, esenti da DNasi e RNasi, come anche da DNA e RNA.

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

### Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

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

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

### RT EnzymeMix

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

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

## CAMPIONI E CONTROLLI

### Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

### Tampone respiratorio

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

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

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

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



### Lavaggio bronco-alveolare (BAL)

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

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

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

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

### Sostanze interferenti

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

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

### Controlli di amplificazione

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

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

**Nota bene:** il sistema **ELITE InGenius** richiede la presenza di risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione che è memorizzato nel suo database.

I risultati dei controlli di amplificazione, approvati e memorizzati nel database, scadono **dopo 15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente l'analisi dei controlli positivi e negativi con il lotto in uso di reagente di amplificazione.

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

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

### Controlli di qualità

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

## PROCEDURA

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

comprende tre fasi:

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

### Verifica che il sistema sia pronto

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

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

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

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

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

### Impostazione della sessione

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

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

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

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

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

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



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

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

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

| Numero di campioni (N) | RV PLUS PCR Mix                 | RT EnzymeMix                     |
|------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| $1 \leq N \leq 5$      | $(N + 1) \times 20 \mu\text{L}$ | $(N + 1) \times 0,3 \mu\text{L}$ |
| $6 \leq N \leq 12$     | $(N + 2) \times 20 \mu\text{L}$ | $(N + 2) \times 0,3 \mu\text{L}$ |

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

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

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

#### **A. Corsa integrata**

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

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

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

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

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

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

## **B. Corsa di amplificazione**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Esame ed esportazione dei risultati

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

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

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

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

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

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

I risultati delle sessioni di amplificazione per il controllo positivo e negativo, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere consultati e approvati da personale avente la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

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

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

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

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

### B. Validazione dei risultati del campione

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

I risultati sono descritti nei rapporti generati dallo strumento ("Result Display") (schermata dei risultati).

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

| 1) Controllo positivo    | Status    |
|--------------------------|-----------|
| RV PLUS Positive Control | APPROVATO |
| 2) Controllo negativo    | Status    |
| RV PLUS Negative Control | APPROVATO |

Per ogni campione, il risultato del saggio viene interpretato automaticamente dal sistema secondo quanto stabilito dall'algoritmo del programma **ELITE InGenius® Software** e dai parametri dell'Assay Protocol.

La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato ottenuto. Per ogni campione il sistema indica una combinazione dei seguenti messaggi specificando se sono stati rilevati gli RNA dei patogeni.

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

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

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

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

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

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

### C. Esportazione dei risultati del campione

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

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

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

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

## CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

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

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

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

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

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

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

### Efficienza della rilevazione (inclusività)

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

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

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

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

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

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



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

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

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

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

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

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

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

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

### **Marcatori potenzialmente interferenti (interferenza)**

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

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

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

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

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

### Sostanze interferenti

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

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

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

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

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

### Ripetibilità

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

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

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

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

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

## Riproducibilità

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

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

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

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

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

## Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

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

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

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

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

## Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

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

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

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

I risultati sono sintetizzati nelle tabelle seguenti.

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

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

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

## BIBLIOGRAFIA

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

## **LIMITI DELLA PROCEDURA**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

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

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

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



| <b>Reazione del campione non valida</b>                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Possibili cause</b>                                                 | <b>Soluzioni</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Errore nella preparazione della sessione.                              | Controllare la posizione della miscela di reazione completa e del campione.<br>Controllare i volumi della miscela di reazione completa e del campione.                                                                                                                                                                                                                       |
| Errore di preparazione della miscela di reazione completa              | Controllare i volumi dei reagenti utilizzata durante la preparazione della miscela di reazione completa.                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Degradazione della miscela di reazione completa o dei suoi componenti. | Non utilizzare la miscela di reazione completa per più di una sessione.<br>Non lasciare la miscela di reazione completa a temperatura ambiente per più di 30 minuti.<br>Non lasciare il prodotto RT EnzymeMix a temperature superiori a -20° C per più di 10 minuti.<br>Preparare di nuovo la miscela di reazione completa.<br>Utilizzare una nuova aliquota dei componenti. |
| Degradazione del controllo interno.                                    | Utilizzare nuove aliquote di controllo interno.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.             | Ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR).<br>Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione primario in una sessione in modalità "Extract + PCR" (estratto + PCR).                      |
| Degradazione del campione.                                             | Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione primario in una sessione in modalità "Extract + PCR".<br>Utilizzare una nuova aliquota del campione.                                                                                                                                                                              |
| Errore dello strumento.                                                | Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

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

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

**LEGENDA DEI SIMBOLI**



Codice articolo.



Limite superiore di temperatura.



Codice lotto.



Da utilizzarsi entro (ultimo giorno del mese).



Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*.



Conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medici diagnostici *in vitro*.



Contenuto sufficiente per "N" test.



Consultare le istruzioni per l'uso.



Contenuto.



Conservare al riparo dalla luce del sole.



Fabbricante.

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

Questo prodotto contiene reagenti fabbricati da Life Technologies Corporation e venduti sulla base di accordi di licenza stipulati tra ELITechGroup S.p.A. e le sue affiliate e Life Technologies Corporation. Il prezzo d'acquisto di questo prodotto include diritti non trasferibili, limitati a utilizzare solo questa quantità di prodotto esclusivamente per attività dell'acquirente direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sulla licenza d'acquisto per questo prodotto per fini diversi da quelli dichiarati sopra, rivolgersi a Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Tel.: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-mail: [outlicensing@thermofisher.com](mailto:outlicensing@thermofisher.com).

I reagenti per la rivelazione ELITE MGB® sono coperti da uno o più brevetti USA, n. 7319022, 7348146, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8163910, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 e brevetti EP n. 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 oltre a richieste attualmente in corso di approvazione.

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

ELITE MGB®, il logo ELITE MGB® ed ELITE InGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup all'interno dell'Unione Europea.

UTM® è un marchio registrato di COPAN Italia S.p.A.



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: [www.elitechgroup.com](http://www.elitechgroup.com)  
 This document is available only in English.

## A. Intended use

The «**Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative multiplex nucleic acids reverse transcription and amplification assay for the detection and identification of the RNA of **Influenza A Virus (FluA)**, **Influenza B Virus (FluB)**, **Respiratory Syncytial Virus (RSV)** and **human Metapneumovirus (hMPV)** in clinical samples.

The assay is validated in association with ELITE InGenius® system and with Respiratory swabs and Broncho-Alveolar Lavage (BAL) samples.

The product is intended for use as an aid in the diagnosis of respiratory infections, in conjunction with the patient's clinical data and other laboratory test results.

## B. Amplified sequence

| Target      | Gene                                 | Fluorophore |
|-------------|--------------------------------------|-------------|
| <b>FluA</b> | Matrix protein gene sequence of FluA | AP639       |
| <b>FluB</b> | Matrix protein gene sequence of FluB | FAM         |
| <b>RSV</b>  | Matrix protein gene sequence of RSV  | AP593       |
| <b>hMPV</b> | Fusion protein gene sequence of hMPV | AP680       |
| <b>IC</b>   | genomic RNA of MS2 phage             | AP525       |

## C. Validated matrix

› **Respiratory Swab**

› **BAL**

## D. Kit content

| RV PLUS PCR Mix                                                                         | RT EnzymeMix                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
|  X 4 |  X 2 |
| 4 tubes of 600 µL<br>96 reactions per kit<br>5 freeze-thaw cycles per tube              | 2 tubes of 20 µL<br>96 reactions per kit<br>10 freeze-thaw cycles per tube               |
| › Maximum shelf-life: 18 months<br>› Storage temperature: - 20°C                        | › Maximum shelf-life: 18 months<br>› Storage temperature: - 20°C                         |

## E. Material required not provided in the kit

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>› <b>ELITE InGenius</b> instrument: INT030</li> <li>› <b>ELITE InGenius SP 200</b> extraction cartridges: INT032SP200</li> <li>› <b>ELITE InGenius PCR Cassette</b> amplification cartridges: INT035PCR</li> <li>› <b>ELITE InGenius SP 200 Consumable Set</b> consumables for extraction: INT032CS</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>› <b>Respiratory Viral PLUS - ELITE Positive Control:</b> CTR160ING</li> <li>› <b>CPE – Internal Control:</b> CTCRCPE</li> <li>› <b>ELITE InGenius Waste Box:</b> F2102-000</li> <li>› <b>300 µL Filter Tips Axygen:</b> TF-350-L-R-S</li> <li>› <b>2 ml tube Sarstedt:</b> 72.694.005</li> <li>› <b>Copan UTM® kit:</b> 360C or 305C</li> </ul> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## F. ELITE InGenius protocol

- |                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>› Sample volume 200 µL</li> <li>› CPE Internal Control volume 10 µL</li> <li>› Total eluate volume 100 µL</li> <li>› PCR eluate input volume 10 µL</li> <li>› RV PLUS PCR Mix volume 20 µL</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>› Unit of qualitative result cp/mL</li> <li>› Frequency of controls 15 days</li> </ul> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## G. Performance

| Matrix           | Limit of Detection                               | Diagnostic Sensitivity   | Diagnostic Specificity |
|------------------|--------------------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| Respiratory Swab | <b>FLUA: 433 cp/mL</b><br><b>FLUB: 409 cp/mL</b> | <b>98.5%</b><br>252/257* | <b>100%</b><br>41/41*  |
| BAL              | <b>RSV: 359 cp/mL</b><br><b>hMPV: 333 cp/mL</b>  | <b>98.6%</b><br>176/179* | <b>100%</b><br>40/40*  |

\*confirmed samples/ tested samples

## H. Master Mix Preparation preparation

| Reagent         | 1 Test | Samples N. | Total reactions |
|-----------------|--------|------------|-----------------|
| RV PLUS PCR Mix | 20 µL  | 1 to 5     | N + 1 rxn       |
| RT Enzyme Mix   | 0.3 µL | 6 to 12    | N + 2 rxn       |

## I. Procedures

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

### Before analysis

|                                                                                                          |                                                                                                                                            |                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1.</b> Switch on ELITE InGenius Identification with username and password<br>Select the mode "Closed" | <b>2.</b> Verify controls: RV PLUS pos. and neg. controls in the "Control menu"<br><i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired | <b>3.</b> Thaw the CoV-2 PCR Mix, RT EnzymeMix tubes and the CPE Internal Control tubes<br>Vortex gently<br>Spin down 5 sec |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

|                                                                                                 |                                                                               |                                                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1.</b> Select "Perform Run" on the touch screen                                              | <b>2.</b> Verify the extraction volumes:<br>Input: "200 µL", eluate: "100 µL" | <b>3.</b> Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID |
| <b>4.</b> Select the "Assay protocol" of interest                                               | <b>5.</b> Select the sample position:<br>Extraction tube                      | <b>6.</b> Load the complete mix and the Internal Control in the inventory block        |
| <b>7.</b> Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip and Extraction tube racks | <b>8.</b> Close the door<br>Start the run                                     | <b>9.</b> View, approve and store the results                                          |

### Procedure 2 - PCR only

|                                                                                 |                                                                                   |                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>1 to 4:</b> Follow the Complete Run procedure described above                | <b>5.</b> Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube" | <b>6.</b> Load the extracted nucleic acid tubes in the Elution tubes rack |
| <b>7.</b> Load the PCR cassette rack<br>Load the PCR Mix in the inventory block | <b>8.</b> Close the door<br>Start the run                                         | <b>9.</b> View, approve and store the results                             |

### Procedure 3 - Extraction only

|                                                                                      |                                                                                             |                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>1 to 4:</b> Follow the Complete Run procedure described above                     | <b>5.</b> Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Secondary tube | <b>6.</b> Load the Internal Control in the inventory block |
| <b>7.</b> Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette and Extraction tube | <b>8.</b> Close the door<br>Start the run                                                   | <b>9.</b> Archive the eluate sample                        |