



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

Sito internet: www.elitechgroup.com

AVVERTENZA del 07/06/2024

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«HBV ELITE MGB Kit» Ref. RTK602ING

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Principio del Saggio: Correzione del nome della regione del gene della DNA polimerasi dell'HBV.*
- *Altri prodotti richiesti: nota riguardo la disponibilità di HBV ELITE Standard (REF STD602ING) e HBV - ELITE Positive Control (REF CTR602ING) come prodotti separati.*
- *Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti: estensione del periodo di utilizzo di ciascun reagente a 60 giorni dalla prima apertura.*
- *Descrizione Del Prodotto: Concentrazione del DNA plasmidico correlata anche al materiale di riferimento "5th WHO International Standard for HBV DNA for NAT"*

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



HBV ELITE MGB® Kit
reagenti per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK602ING



INDICE

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	pag. 4
MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO	pag. 4
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 4
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 5
ELITE InGenius	pag. 7
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 7
PROCEDURA	pag. 8
ELITE BeGenius	pag. 16
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 16
PROCEDURA	pag. 17
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI ELITE InGenius e ELITE BeGenius	pag. 23
BIBLIOGRAFIA	pag. 37
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 37
RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	pag. 38
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 40
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 40
ALLEGATO	pag. A

USO PREVISTO

Il prodotto "HBV ELITE MGB® Kit" è un saggio quantitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la **rilevazione e la quantificazione del DNA** del virus dell'epatite B (HBV) su campioni di DNA estratto da campioni clinici.

Il saggio è in grado di rilevare l'HBV DNA appartenente ai genotipi A, B, C, D, E, F, G, H, I e RF.

Il saggio è validato in associazione con il sistema "ELITE InGenius®" e "ELITE BeGenius®" partendo dal plasma umano raccolto in EDTA o ACD e campioni di siero.

Il prodotto trova impiego come ausilio nella gestione di individui HBV-positivi sottoposti a terapia antivirale, insieme con i dati clinici del paziente e ad altri referti di laboratorio.

Questo prodotto non deve essere utilizzato come test di screening per la presenza di HBV nel sangue o negli emoderivati né come test diagnostico per confermare la presenza di un'infezione da HBV.

HBV ELITE MGB® Kit
reagenti per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK602ING

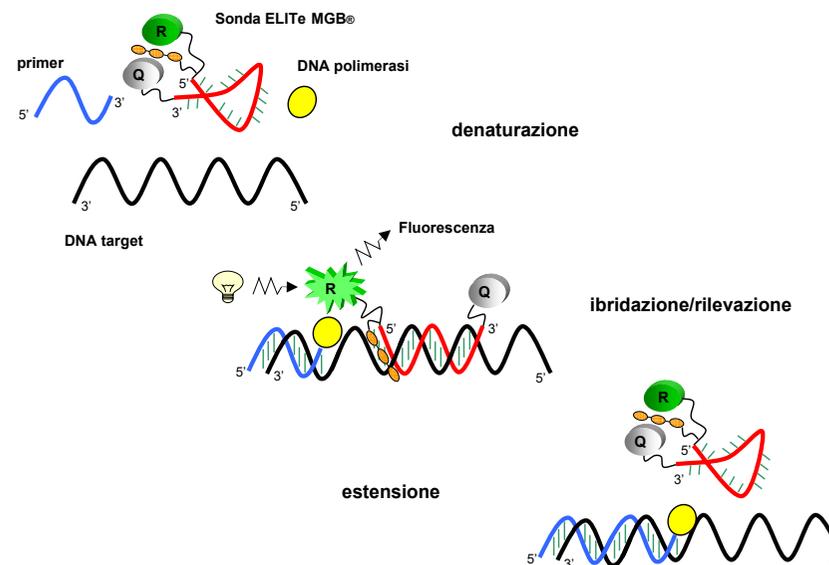
PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio consiste in una reazione di amplificazione real-time eseguita con gli strumenti **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**, sistemi automatici ed integrati per l'estrazione, l'amplificazione, la rilevazione di acidi nucleici e l'interpretazione dei risultati.

L'HBV DNA è estratto dal campione plasma (raccolto in EDTA o ACD) o di siero; quindi è eseguita una reazione di amplificazione specifica mediante il reagente **HBV PCR Mix**. Il reagente contiene primer e sonde specifiche per il gene della DNA polimerasi dell'HBV (gene P). La sonda HBV utilizza la tecnologia ELITE MGB ed è marcata con il fluoroforo FAM. Inoltre, nel reagente sono inclusi primer e sonde specifici per il controllo interno eterologo. Anche la sonda del controllo interno utilizza la tecnologia ELITE MGB ed è marcata con il colorante AquaPhluor® 525 (AP525). Il DNA del controllo interno esogeno (sequenza artificiale IC2) è aggiunto all'inizio dell'estrazione e permette il monitoraggio dell'efficienza dell'estrazione e della PCR.

Le sonde specifiche dell'HBV e del controllo interno si attivano quando si ibridano con i relativi prodotti di PCR. Lo strumento ELITE InGenius monitora l'aumento della fluorescenza e calcola il Ct e la quantità in base a una curva di calibrazione memorizzata.

La tecnologia delle sonde ELITE MGB è rappresentata nell'illustrazione seguente. I fluorofori sono spenti nella sonda in soluzione a singolo filamento (random-coiled). I fluorofori sono attivi nella sonda ibridata sull'amplicone (duplex), poiché il quencher è fisicamente separato dal fluoroforo. Si noti che la sonda non è idrolizzata e il fluoroforo non è liberato durante la PCR.



DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **HBV ELITE MGB® Kit** fornisce i seguenti componenti:

• **HBV ELITE MGB Mix**

Questo componente fornisce il sub-componente "HBV PCR Mix", una miscela ottimizzata e stabilizzata di oligonucleotidi e reagenti per l'amplificazione real-time, pre-aliquotato in **otto provette pronte per l'uso** (tappo BIANCO). Ogni provetta contiene **280 µL** di soluzione, che consentono di effettuare **12 test** (almeno 2 campioni per sessione) in associazione con **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**.

I primer e la sonda per l'HBV (stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo FAM e dal quencher non-fluorescente Eclipse) sono specifici per il gene codificante la polimerasi (gene P) dell'HBV.

Il segnale emesso dall'HBV viene rilevato dal canale 1 di **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**.

I primer e la sonda per il controllo interno esogeno (IC, stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo AP525 e dal quencher non-fluorescente Eclipse) sono specifici per una sequenza artificiale (IC2). Il segnale emesso dall'IC è rilevato dal canale 2 di **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**.

La miscela di reazione fornisce anche buffer, cloruro di magnesio, nucleotidi trifosfato e la DNA polimerasi "hot start".

Il componente consente di effettuare **96 test in associazione con ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**, utilizzando 20 µL per reazione.

• **HBV ELITE Standard**

Questo componente fornisce i sub-componenti "HBV Q-PCR Standard", quattro soluzioni stabilizzate di DNA plasmidico a un **titolo noto**, ciascuna aliquotata in **una provetta pronta per l'uso**. Ogni provetta contiene **160 µL** di soluzione, che consentono di effettuare **2 sessioni analitiche**. Il DNA plasmidico contiene una regione di gene codificante la polimerasi dell'HBV. La rilevazione dell'HBV DNA a seguito dell'analisi eseguita con il prodotto **HBV ELITE MGB® Kit** in associazione con gli strumenti **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** consente di calcolare la curva standard del sistema (lotto del prodotto e strumento) per la quantificazione dell'HBV.

La concentrazione del DNA plasmidico in copie / mL è stata determinata mediante misurazione dell'assorbanza con uno spettrofotometro. La concentrazione del DNA plasmidico è stata messa in correlazione con lo standard internazionale "4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT" (NIBSC, UK, codice 10/266) con l'ausilio di un fattore di conversione al fine di poter esprimere la concentrazione in unità internazionali / mL (UI / mL).

La concentrazione del DNA plasmidico è stata correlata anche al "5th WHO International Standard for HBV DNA for NAT" (NIBSC, UK, code 22/120) come indicato nella Sezione Fattore di conversione alle Unità Internazionali delle Caratteristiche delle Prestazioni.

Il componente consente di effettuare **2 sessioni analitiche distinte in associazione con ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**, utilizzando 20 µL per reazione.

• **HBV - ELITE Positive Control**

Questo componente fornisce il sub-componente "HBV Positive Control", una soluzione stabilizzata di DNA plasmidico, aliquotata in **due provette pronte per l'uso**. Ogni provetta contiene **160 µL** di soluzione, che consentono di effettuare **4 sessioni analitiche**. Il DNA plasmidico contiene una regione di gene codificante la polimerasi dell'HBV. La rilevazione e quantificazione dell'HBV DNA a seguito dell'analisi eseguita con il prodotto **HBV ELITE MGB® Kit** in associazione con gli strumenti **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** consentono di validare il sistema (lotto del prodotto e strumento) per la rilevazione dell'HBV.

Il componente consente di effettuare **8 sessioni analitiche distinte in associazione con ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**, utilizzando 20 µL per reazione.

• **HBV Internal Control**

Questo componente fornisce il sub-componente "HBV CPE", una soluzione stabilizzata di DNA plasmidico, aliquotata in **otto provette pronte per l'uso**. Ogni provetta contiene **160 µL** di soluzione, che consentono di effettuare **12 test** (almeno 2 campioni per sessione). Il DNA plasmidico contiene la sequenza artificiale IC2, il template del controllo interno esogeno. La rilevazione del DNA del Controllo Interno a seguito dell'analisi eseguita con il prodotto **HBV ELITE MGB® Kit** in associazione con gli strumenti **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** consente di validare i risultati dei campioni HBV-negativi.

Il componente consente di effettuare **96 test in associazione con ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**, utilizzando 10 µL per estrazione.

MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Componente	Componente secondario	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
HBV ELITE MGB Mix	HBV PCR Mix	Miscela di reagenti per amplificazione real time con tappo BIANCO	8 x 280 µL	-
HBV ELITE Standard	HBV Q-PCR Standard 10 ⁵	Soluzione di plasmide in provetta con tappo ROSSO	1 x 160 µL	-
	HBV Q-PCR Standard 10 ⁴	Soluzione di plasmide in provetta con tappo BLU	1 x 160 µL	
	HBV Q-PCR Standard 10 ³	Soluzione di plasmide in provetta con tappo VERDE	1 x 160 µL	
	HBV Q-PCR Standard 10 ²	Soluzione di plasmide in provetta con tappo GIALLO	1 x 160 µL	
HBV - ELITE Positive Control	HBV Positive Control	Soluzione di plasmide in provetta con tappo NERO	2 x 160 µL	-
HBV Internal Control	HBV CPE	Soluzione di DNA plasmidici e RNA genomico di fago MS2 con tappo NEUTRO	8 x 160 µL	-

MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti non talcati 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 (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Acqua per biologia molecolare.

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA dai campioni da analizzare e i materiali di consumo **non** sono in dotazione con questo prodotto.

Per l'estrazione automatica degli acidi nucleici, l'amplificazione real time e l'interpretazione dei risultati delle analisi eseguite sui campioni, è richiesto l'impiego dello strumento «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, cod. INT030) e dei seguenti Assay Protocols specifici (EG SpA):

- parametri per l'amplificazione dei calibratori «**HBV ELITE STD**»,
- parametri per l'amplificazione del controllo positivo «**HBV ELITE_PC**»,
- parametri per l'amplificazione del controllo negativo «**HBV ELITE_NC**»,
- parametri per i campioni di plasma da analizzare «**HBV ELITE_PL_200_50**»,
- parametri per i campioni di siero da analizzare «**HBV ELITE_Se_200_50**».

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

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

- contenitori «**ELITE InGenius® Waste Box**» (EG SpA, cod. F2102-000).

Per l'estrazione automatica degli acidi nucleici, l'amplificazione real time e l'interpretazione dei risultati delle analisi eseguite sui campioni, è richiesto l'impiego dello strumento «**ELITE BeGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, cod. INT040) e dei seguenti Assay Protocols specifici (EG SpA):

- parametri per l'amplificazione dei calibratori «**HBV ELITE_Be_STD**»,
- parametri per l'amplificazione del controllo positivo «**HBV ELITE_Be_PC**»,
- parametri per l'amplificazione del controllo negativo «**HBV ELITE_Be_NC**»,
- parametri per i campioni di plasma da analizzare «**HBV ELITE_Be_PL_200_50**»,
- parametri per i campioni di siero da analizzare «**HBV ELITE_Be_Se_200_50**».

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

- cartucce di estrazione «**ELITE InGenius® SP 200**» (EG SpA, cod. INT032SP200),
- materiali di consumo per l'estrazione «**ELITE InGenius SP 200 Consumable Set**» (EG SpA, cod. INT032CS),
- cartucce di amplificazione «**ELITE InGenius PCR Cassette**» (EG SpA, cod. INT035PCR),
- puntali «**1000 µL Filter Tips Tecan**» (Tecan, Switzerland, ref. 30180118),
- contenitori «**ELITE InGenius Waste Box**» (EG SpA, cod. F2102-000)

Nota: in caso di necessità, i Calibratori e il Controllo Positivo sono disponibili anche come prodotti separati: **HBV ELITE Standard**, cod. STD602ING, e **HBV ELITE Positive Control**, cod. CTR602ING.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

Avvertenze e precauzioni generali

Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare il materiale che viene a contatto con i campioni biologici per almeno 30 minuti con ipoclorito di sodio al 3% o in autoclave a 121 °C per un'ora prima di smaltirlo.

Manipolare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali utilizzati per eseguire il saggio come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare e smaltire i rifiuti nel rispetto di norme di sicurezza adeguate. Incenerire il materiale monouso combustibile. Neutralizzare i rifiuti liquidi contenenti acidi o basi prima di smaltirli.

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti a proteggersi gli occhi e il viso.

Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.

Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici sul posto di lavoro.

Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.

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

Prima di eseguire il saggio, leggere attentamente tutte le istruzioni fornite con il prodotto.

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

Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.

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

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

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

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

Utilizzare puntali sterili, esenti da DNasi e RNasi, come anche da DNA e RNA.

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

Manipolare i prodotti di estrazione in modo tale da ridurre quanto più possibile la dispersione nell'ambiente per prevenire il rischio di contaminazione. Utilizzare le pipette destinate all'estrazione dei prodotti della reazione di amplificazione unicamente per questo scopo.

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

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

- **HBV ELITE MGB Mix**

Conservare la **HBV PCR Mix** al buio ad una temperatura inferiore a -20 °C.

La **HBV PCR Mix** deve essere utilizzata entro un mese dalla prima apertura del tubo.

Congelare e scongelare la **HBV PCR Mix** per un massimo di **sette volte** perché un numero maggiore di cicli di congelamento e scongelamento potrebbe comprometterne le prestazioni.

La **HBV PCR Mix** può essere conservata nel blocco refrigerato nell'Area Reagenti per un massimo di **sette sessioni di lavoro indipendenti da tre ore ciascuna** (modalità "Extract + PCR") o per **tre sessioni di lavoro consecutive da tre ore ciascuna** (modalità "Extract + PCR").

- **HBV ELITE Standard**

Conservare gli **HBV Q-PCR Standard** ad una temperatura inferiore a -20 °C.

Gli **HBV Q-PCR Standard** devono essere utilizzati entro un mese dalla prima apertura del tubo.

Congelare e scongelare gli **HBV Q-PCR Standard** per un massimo di **due volte** perché un numero maggiore di cicli di congelamento e scongelamento potrebbe compromettere il titolo.

Gli **HBV Q-PCR Standard** possono essere conservati nel blocco refrigerato nell'area di estrazione per un massimo di **due sessioni di lavoro indipendenti da due ore ciascuna** (modalità "PCR Only").

- **HBV - ELITE Positive Control**

Conservare l'**HBV Positive Control** ad una temperatura inferiore a -20 °C.

L'**HBV Positive Control** deve essere utilizzato entro un mese dalla prima apertura del tubo.

Congelare e scongelare l'**HBV Positive Control** per un massimo di **quattro volte** perché un maggior numero di cicli di congelamento e scongelamento potrebbe comprometterne le prestazioni.

L'**HBV Positive Control** può essere conservato nel blocco refrigerato nell'area di estrazione per un massimo di **quattro sessioni di lavoro indipendenti da tre ore ciascuna** (modalità "Extract + PCR").

- **HBV Internal Control**

Conservare l'**HBV CPE** ad una temperatura inferiore a -20 °C.

L'**HBV CPE** deve essere utilizzato entro un mese dalla prima apertura del tubo.

Congelare e scongelare l'**HBV CPE** per un massimo di **dodici volte** perché un numero maggiore di cicli di congelamento e scongelamento potrebbe comprometterne le prestazioni.

L'**HBV CPE** può essere conservato nel blocco refrigerato nell'Area Reagenti per un massimo di **sei sessioni di lavoro indipendenti da tre ore ciascuna** (modalità "Extract + PCR").

ELITE InGenius

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

Plasma raccolto in provette con EDTA o ACD

Raccogliere i campioni di plasma per l'estrazione degli acidi nucleici in provette con EDTA o ACD, identificarli secondo le linee guida del laboratorio, trasportarli e conservarli a temperatura ambiente (~+25 °C) per un massimo di tre giorni o a +2/+8 °C per un massimo di cinque giorni. Diversamente, congelarli e conservarli a ~-20 °C per un massimo di un mese o a ~-70 °C per sei mesi.

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

Nota: L'estrazione del DNA dal plasma raccolto in provette con EDTA o ACD si esegue con il sistema **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius Software** versione 1.3 (o versioni equivalenti successive) utilizzando l'Assay Protocol **HBV ELITE_PL_200_50**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge 10 µL per ogni estrazione di **HBV CPE** (controllo interno) ed eluisce gli acidi nucleici in 50 µL.

Gli acidi nucleici purificati possono essere conservati a ~-20° C per un mese.

Siero

Raccogliere e identificare i campioni di siero per l'estrazione degli acidi nucleici secondo le linee guida del laboratorio, trasportarli e conservarli a temperatura ambiente (~+25 °C) per un massimo di tre giorni o a +2/+8 °C per un massimo di cinque giorni. Diversamente, congelarli e conservarli a ~-20 °C per un massimo di un mese o a ~-70 °C per sei mesi.

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

Nota: L'estrazione del DNA dal siero si esegue con il sistema **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius Software** versione 1.3 (o versioni equivalenti successive) utilizzando l'Assay Protocol **HBV ELITE_Se_200_50**. Questo protocollo elabora 200 µL di campione, aggiunge 10 µL per ogni estrazione di **HBV CPE** (controllo interno) ed eluisce gli acidi nucleici in 50 µL.

Gli acidi nucleici purificati possono essere conservati a ~-20° C per un mese.

Altri campioni

Al momento non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con altri campioni clinici come sangue intero.

Sostanze interferenti

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

Non utilizzare il plasma raccolto in provette con eparina al fine di prevenire l'inibizione della reazione di amplificazione e risultati non validi.

Controlli di amplificazione

Prima di analizzare qualunque campione, è indispensabile generare e approvare la curva di calibrazione e i controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di amplificazione:

- come set di calibrazione, utilizzare i quattro livelli di concentrazione del prodotto **HBV ELITE Standard** in dotazione con questo kit, in associazione con l'Assay Protocol **HBV ELITE_STD**,
- come controllo positivo di amplificazione utilizzare il prodotto **HBV - ELITE Positive Control** in dotazione con questo kit, in associazione con l'Assay Protocol **HBV ELITE_PC**,
- come controllo negativo di amplificazione utilizzare acqua per biologia molecolare (non in dotazione con questo kit) in associazione con il con l'Assay Protocol **HBV ELITE_NC**.

Nota: Il sistema **ELITE InGenius** richiede risultati approvati e validi della curva di calibrazione e dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di amplificazione inserito nel database.

Le curve di calibrazione, approvate e inserite nel database, scadranno dopo **60 giorni**. Alla data di scadenza, sarà necessario ripetere il test con il prodotto Q-PCR Standard in associazione con il lotto del reagente di amplificazione.

I risultati dei controlli di amplificazione, approvati e inseriti nel database, scadranno dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza, sarà necessario ripetere i controlli positivi e negativi in associazione con il lotto del reagente di amplificazione.

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

- quando si inizia un nuovo lotto di reagenti,
- quando i risultati delle analisi di controllo di qualità (vedi paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche,
- quando lo strumento **ELITE InGenius** deve essere sottoposto a un importante intervento di manutenzione.

Controlli di qualità

Si consiglia la validazione programmata della procedura di estrazione e amplificazione. Si possono utilizzare campioni testati o materiale di riferimento certificato. Utilizzare i controlli esterni in conformità con le linee guida delle organizzazioni di accreditamento locali, statali e/o federali, a seconda del caso.

PROCEDURA

La procedura per l'impiego del prodotto **HBV ELITE MGB Kit** con il sistema **ELITE InGenius** si compone di tre fasi:

- verifica che il sistema sia pronto,
- allestimento della sessione,
- lettura ed esportazione 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 (**HBV Q-PCR Standard**) siano eseguiti, approvati e non scaduti (Status) in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto. In assenza di calibratori approvati o non scaduti, eseguirli come descritto nei paragrafi seguenti,
- verificare che i controlli di amplificazione (**HBV Positive Control**, **HBV Negative Control**) siano eseguiti, approvati e non scaduti (Status) in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto. In assenza di controlli di amplificazione approvati o non scaduti, eseguirli come descritto nei paragrafi seguenti,
- selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per l'allestimento della sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da **ELITechGroup S.p.A.** Questi protocolli IVD sono stati specificamente validati con il kit **ELITE MGB**, lo strumento **ELITE InGenius** e la matrice citata.

Gli Assay Protocols disponibili per analizzare i campioni con il prodotto **HBV ELITE MGB Kit** sono descritti nella tabella sottostante:

Assay Protocol per il prodotto HBV ELITE MGB Kit e ELITE InGenius			
Nome	Matrice	Esito	Caratteristiche
HBV ELITE_PL_200_50	Plasma	Positivi / UI/mL / copie/mL / Negativi	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione estratto: 50 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume iniziale PCR del campione: 20 µL
HBV ELITE_Se_200_50	Siero	Positivi / UI/mL / copie/mL / Negativi	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione estratto: 50 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume iniziale PCR del campione: 20 µL

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

Allestimento della sessione

Il prodotto **HBV ELITE MGB Kit** può essere utilizzato con il sistema **ELITE InGenius** per eseguire:

- Sessione integrata (Extract + PCR),
- Sessione di amplificazione (PCR only),
- Sessione di calibrazione (PCR only),
- Sessione di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo (PCR Only).

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi nell'Assay Protocol disponibile sullo strumento e vengono richiamati automaticamente nel momento in cui lo si seleziona.

Nota: Il sistema ELITE InGenius può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile caricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Si descrivono di seguito i passaggi principali per la preparazione dei tre tipi di sessione.

A. Sessione integrata

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

- Scongelare a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti i campioni da analizzare e trattarle secondo le linee guida del laboratorio e secondo quanto disposto nel paragrafo "Campioni e controlli".
- Scongelare le provette di **HBV PCR Mix** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo (almeno 2 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota: Scongelare la miscela **HBV PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

- Scongelare le provette di **HBV CPE** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
- Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
- Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia di 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia di 50 µL.
- Per ogni "Track" d'interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
- Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (es. HBV ELITE_PL_200_50).

- Verificare che il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".
- Selezionare "Extraction tube" nella colonna "Sample Position". Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Nell' "Inventory Block" selezionato caricare i prodotti **HBV CPE** e **HBV PCR Mix** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Nell' "Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Caricare le cassette PCR, le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200", tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" per avviare la sessione.

Una volta completata la procedura, il sistema ELITE InGenius consente all'operatore di visualizzare, approvare e salvare i risultati, come anche di stampare e salvare il report.

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

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

Nota: La miscela PCR Mix può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 3 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

B. Sessione di amplificazione

Per allestire la sessione di amplificazione partendo dal DNA estratto, procedere come segue, come risulta dalla GUI:

- Scongelare le provette di **HBV PCR Mix** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo (almeno 2 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota: Scongelare la miscela **HBV PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

- Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
- Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che l'"Extraction Input Volume" sia di 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia di 50 µL.
- Per ogni Track di interesse compilare il SID digitando o scansionando il codice a barre.
- Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (es. HBV ELITE_PL_200_50).
- Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
- Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella "Sample Position" sia "Elution Tube". Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Nell' "Inventory Block" selezionato caricare la miscela **HBV PCR Mix** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Nell' "Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Caricare le cassette di PCR e i campioni di acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" per avviare la sessione.

Una volta completata la procedura, il sistema **ELITE InGenius** consente all'operatore di visualizzare, approvare e salvare i risultati, come anche di stampare e salvare il report.

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

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

Nota: La miscela PCR Mix può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 3 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

C. Sessione di calibrazione

Per allestire la sessione di calibrazione per Q-PCR Standard, procedere come segue, come risulta dalla GUI:

1. Scongellare le provette di **HBV PCR Mix** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo (almeno 2 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota: Scongellare la miscela **HBV PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Scongellare le provette **HBV Q-PCR Standard** (Cal1: HBV Q-PCR Standard 10², Cal2: HBV Q-PCR Standard 10³, Cal3: HBV Q-PCR Standard 10⁴, Cal4: HBV Q-PCR Standard 10⁵) a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta consente un volume sufficiente per preparare 2 reazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
3. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
4. Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che l'"Extraction Input Volume" sia di 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia di 50 µL.
5. Nella colonna "Assay", all'interno della "Track" d'interesse, selezionare l'Assay Protocol da utilizzare.
6. Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol "HBV ELITE_STD" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di HBV Q-PCR Standard.
7. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
8. Nell'"Inventory Block" selezionato caricare la miscela **HBV PCR Mix** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
9. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
10. Caricare le cassette e le provette **HBV Q-PCR Standard** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
11. Chiudere lo sportello dello strumento.
12. Premere "Start" per avviare la sessione.

Una volta completata la procedura, il sistema **ELITE InGenius** consente 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 Q-PCR Standard residuo, tapparlo e conservarlo a -20° C.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento le cassette PCR contenenti i prodotti di reazione e altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Attenzione a evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

Nota: Il prodotto Q-PCR Standard può essere utilizzato per 2 sessioni di lavoro indipendenti da 2 ore ciascuna.

Nota: La miscela PCR Mix può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o

può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 3 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

D. Sessione 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. Scongellare le provette di **HBV PCR Mix** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo (almeno 2 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota: Scongellare la miscela **HBV PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Scongellare le provette di **HBV Positive Control** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti per sessione. Ogni provetta consente un volume sufficiente per preparare 4 reazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
3. Trasferire almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in una provetta con soluzione di eluizione, in dotazione con l'ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".
5. Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che l'"Extraction Input Volume" sia di 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia di 50 µL.
6. Nella colonna "Assay", all'interno della "Track" d'interesse, selezionare l'Assay Protocol da utilizzare.
7. Per il controllo positivo selezionare nella colonna "Assay" l'Assay Protocol "HBV ELITE_PC" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di HBV Positive Control.
8. Per il controllo negativo selezionare l'Assay Protocol "HBV ELITE_NC" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua per biologia molecolare.
9. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
10. Nell'"Inventory Block" selezionato caricare la miscela **HBV PCR Mix** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
11. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
12. Caricare le "PCR Cassette", la provetta per **HBV Positive Control** e la provetta per Negative Control seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
13. Chiudere lo sportello dello strumento.
14. Premere "Start" per avviare la sessione.

Una volta completata la procedura, il sistema **ELITE InGenius** consente 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 e conservarlo a -20° C. Smaltire il controllo negativo residuo.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento le cassette PCR contenenti i prodotti di reazione e altri materiali di consumo e smaltirle facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Attenzione a evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

Nota: Il controllo positivo può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

Nota: La miscela PCR Mix può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 3 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

Validazione dei risultati del campione

Al termine della sessione, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display", nella quale sono riportati 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 "Location 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 del prodotto **HBV ELITE MGB Kit** tramite la seguente procedura:

- A. Validazione della curva di calibrazione,
- B. validazione dei risultati relativi al controllo positivo e negativo,
- C. validazione dei risultati relativi al campione,
- D. refertazione dei risultati relativi al campione.

A. Validazione della curva di calibrazione

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda per HBV (canale "HBV") nelle reazioni di amplificazione del calibratore sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi nell'Assay Protocol "**HBV ELITE STD**".

La curva di calibrazione, specifica per il lotto del reagente di amplificazione, viene registrata nel database (calibrazione) e può essere consultata e approvata da personale avente la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

La curva di calibrazione, specifica per il lotto di reagente di amplificazione, scadrà **dopo 60 giorni**.

Nota: se la curva di calibrazione non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Calibration" si visualizza il messaggio "Failed" che ne impedisce l'approvazione. Le reazioni di amplificazione del calibratore devono essere ripetute.

Nota: se la curva di calibrazione viene eseguita insieme ai campioni e il risultato non è valido, i campioni non sono quantificati e non possono essere approvati. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

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

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda per HBV (canale HBV) nella reazione di amplificazione con il controllo positivo e il controllo negativo sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay Protocols "**HBV ELITE_PC**" e "**HBV ELITE_NC**".

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

Prima di analizzare qualunque campione, è assolutamente indispensabile verificare che le reazioni di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo siano state eseguite con il lotto del reagente di amplificazione da impiegare per la prova e approvare e convalidare i risultati. La disponibilità di risultati della reazione di amplificazione con il controllo positivo e il controllo negativo "Approved" (Status) è indicata nella finestra "Controls" della GUI. In mancanza di tali risultati, generarli come descritto in precedenza.

I risultati delle sessioni di amplificazione per controllo positivo e controllo negativo sono utilizzati dal software dello strumento per impostare i "Control Charts". A tal fine sono richiesti quattro risultati per il controllo positivo e il controllo negativo da quattro sessioni differenti. A questo punto, i risultati per il controllo positivo e il controllo negativo vengono utilizzati per monitorare le prestazioni durante la fase di amplificazione. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Nota: se il risultato della reazione di amplificazione con il controllo positivo e il controllo negativo non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Controls" appare il messaggio "Failed" che ne impedisce l'approvazione. In tal caso, ripetere la reazione di amplificazione con il controllo positivo e il controllo negativo.

Nota: se il controllo positivo o il controllo negativo vengono trattati insieme ai campioni da analizzare e il risultato non è valido, i campioni possono essere approvati, ma i risultati non sono validati. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

C. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda per HBV (canale HBV) e dalla sonda per il controllo interno (canale "IC") nella reazione di amplificazione con il controllo positivo e il controllo negativo sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay Protocols "HBV ELITE_PL_200_50" e "HBV ELITE_Se_200_50".

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

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

1) Curva di calibrazione	Status
HBV Q-PCR Standard	APPROVATO
2) Controllo positivo	Status
HBV Positive Control	APPROVATO
3) Controllo negativo	Status
HBV 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 del l'Assay Protocol.

La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato ottenuto.

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
HBV: DNA Rilevato, quantità uguale a "XXX" UI / mL o copie / mL	L' HBV DNA è stato rilevato nel campione nell'intervallo di misurazione del saggio, nella quantità indicata.
HBV: DNA Rilevato, quantità inferiore a "LLoQ" UI / mL o copie / mL	L' HBV DNA è stato rilevato nel campione al di sotto del limite inferiore di quantificazione del saggio.
HBV: DNA Rilevato, quantità superiore a "ULoQ" UI / mL o copie / mL	L' HBV DNA è stato rilevato nel campione oltre il limite superiore di quantificazione del saggio.
HBV: DNA Non Rilevato o minore di "LoD" UI / mL o copie / mL	L' HBV DNA non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per l'HBV DNA oppure la sua concentrazione è inferiore al Limite di Rilevazione (LoD) del saggio.
Invalide – Ripetere il campione.	Risultato del saggio non valido a causa di un problema rilevato dal Controllo Interno (estrazione errata, presenza di un inibitore o errore di campionamento). Il test dovrebbe essere ripetuto.

I campioni segnalati con "Invalid - Retest Sample" dal programma **ELITE InGenius software** non sono utilizzabili ai fini dell'interpretazione del risultato. In tal caso, il DNA del controllo interno non è stato rilevato in maniera efficace per problemi nella fase di amplificazione o estrazione (degrado o perdita di DNA durante l'estrazione o effetto carryover degli inibitori nell'eluato), che possono essere all'origine di risultati errati.

Quando il volume è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato com'è oppure diluito mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only". In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato cominciando dall'estrazione di una nuova aliquota in modalità "Extract + PCR".

I campioni segnalati come "HBV DNA Not Detected or below LoD" sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA dell'HBV. In tal caso non si può escludere che il DNA virale sia presente in una concentrazione inferiore al limite di rilevanza del saggio (vedi "Caratteristiche delle prestazioni").

I campioni HBV positivi ad una concentrazione inferiore al LoD, quando vengono rilevati dal test, vengono riportati come "HBV: DNA Detected, quantità inferiore a LLoQ" (vedere "Caratteristiche delle prestazioni").

Nota: I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e di altri report 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 finestra "Result Display" è possibile stampare e salvare i risultati della sessione analitica sotto forma di "Sample Report" e "Track Report".

D. 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 rapporti possono essere stampati e firmati da personale autorizzato.

Sostanze interferenti

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

Non utilizzare il plasma raccolto in provette con eparina al fine di prevenire l'inibizione della reazione di amplificazione e risultati non validi.

Controlli di amplificazione

Prima di analizzare qualunque campione, è indispensabile generare e approvare la curva di calibrazione e i controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di amplificazione:

- come set di calibrazione, utilizzare i quattro livelli di concentrazione del prodotto **HBV ELITE Standard** in dotazione con questo kit, in associazione con l'Assay Protocol **HBV ELITE STD**,
- come controllo positivo di amplificazione utilizzare il prodotto **HBV - ELITE Positive Control** in dotazione con questo kit, in associazione con l'Assay Protocol **HBV ELITE_PC**,
- come controllo negativo di amplificazione utilizzare acqua per biologia molecolare (non in dotazione con questo kit) in associazione con il con l'Assay Protocol **HBV ELITE_NC**.

Nota: Il sistema **ELITE InGenius** richiede risultati approvati e validi della curva di calibrazione e dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di amplificazione inserito nel database.

Le curve di calibrazione, approvate e inserite nel database, scadranno dopo **60 giorni**. Alla data di scadenza, sarà necessario ripetere il test con il prodotto Q-PCR Standard in associazione con il lotto del reagente di amplificazione.

I risultati dei controlli di amplificazione, approvati e inseriti nel database, scadranno dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza, sarà necessario ripetere i controlli positivi e negativi in associazione con il lotto del reagente di amplificazione.

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

- quando si inizia un nuovo lotto di reagenti,
- quando i risultati delle analisi di controllo di qualità (vedi paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche,
- quando lo strumento **ELITE InGenius** deve essere sottoposto a un importante intervento di manutenzione.

Controlli di qualità

Si consiglia la validazione programmata della procedura di estrazione e amplificazione. Si possono utilizzare campioni testati o materiale di riferimento certificato. Utilizzare i controlli esterni in conformità con le linee guida delle organizzazioni di accreditamento locali, statali e/o federali, a seconda del caso.

ELITE BeGenius

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

Plasma raccolto in provette con EDTA o ACD

Raccogliere i campioni di plasma per l'estrazione degli acidi nucleici in provette con EDTA o ACD, identificarli secondo le linee guida del laboratorio, trasportarli e conservarli a temperatura ambiente (~+25 °C) per un massimo di tre giorni o a +2/+8 °C per un massimo di cinque giorni. Diversamente, congelarli e conservarli a ~-20 °C per un massimo di un mese o a ~-70 °C per sei mesi.

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

Nota: L'estrazione del DNA dal plasma raccolto in provette con EDTA o ACD si esegue con il sistema **ELITE BeGenius** e con **ELITE BeGenius Software** versione 2.1.0 (o versioni equivalenti successive) utilizzando l'Assay Protocol **HBV ELITE_Be_PL_200_50**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge 10 µL per ogni estrazione di **HBV CPE** (controllo interno) ed eluisce gli acidi nucleici in 50 µL.

Gli acidi nucleici purificati possono essere conservati a ~-20° C per un mese.

Siero

Raccogliere e identificare i campioni di siero per l'estrazione degli acidi nucleici secondo le linee guida del laboratorio, trasportarli e conservarli a temperatura ambiente (~+25 °C) per un massimo di tre giorni o a +2/+8 °C per un massimo di cinque giorni. Diversamente, congelarli e conservarli a ~-20 °C per un massimo di un mese o a ~-70 °C per sei mesi.

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

Nota: L'estrazione del DNA dal siero si esegue con il sistema **ELITE BeGenius** e con **ELITE BeGenius Software** versione 2.1.0 (o versioni equivalenti successive) utilizzando l'Assay Protocol **HBV ELITE_Be_Se_200_50**. Questo protocollo elabora 200 µL di campione, aggiunge 10 µL per ogni estrazione di **HBV CPE** (controllo interno) ed eluisce gli acidi nucleici in 50 µL.

Gli acidi nucleici purificati possono essere conservati a ~-20° C per un mese.

Altri campioni

Al momento non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con altri campioni clinici come sangue intero.

Sostanze interferenti

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

Non utilizzare il plasma raccolto in provette con eparina al fine di prevenire l'inibizione della reazione di amplificazione e risultati non validi.

Controlli di amplificazione

Prima di analizzare qualunque campione, è indispensabile generare e approvare la curva di calibrazione e i controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di amplificazione:

- come set di calibrazione, utilizzare i quattro livelli di concentrazione del prodotto **HBV ELITE Standard** in dotazione con questo kit, in associazione con l'Assay Protocol **HBV ELITE_Be_STD**,
- come controllo positivo di amplificazione utilizzare il prodotto **HBV - ELITE Positive Control** in dotazione con questo kit, in associazione con l'Assay Protocol **HBV ELITE_Be_PC**,
- come controllo negativo di amplificazione utilizzare acqua per biologia molecolare (non in dotazione con questo kit) in associazione con l'Assay Protocol **HBV ELITE_Be_NC**.

Nota: Il sistema **ELITE BeGenius** richiede risultati approvati e validi della curva di calibrazione e dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di amplificazione inserito nel database.

Le curve di calibrazione, approvate e inserite nel database, scadranno dopo **60 giorni**. Alla data di scadenza, sarà necessario ripetere il test con il prodotto Q-PCR Standard in associazione con il lotto del reagente di amplificazione.

I risultati dei controlli di amplificazione, approvati e inseriti nel database, scadranno dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza, sarà necessario ripetere i controlli positivi e negativi in associazione con il lotto del reagente di amplificazione.

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

- quando si inizia un nuovo lotto di reagenti,
- quando i risultati delle analisi di controllo di qualità (vedi paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche,
- quando lo strumento **ELITe BeGenius** deve essere sottoposto a un importante intervento di manutenzione.

Controlli di qualità

Si consiglia la validazione programmata della procedura di estrazione e amplificazione. Si possono utilizzare campioni testati o materiale di riferimento certificato. Utilizzare i controlli esterni in conformità con le linee guida delle organizzazioni di accreditamento locali, statali e/o federali, a seconda del caso.

PROCEDURA

La procedura per l'impiego del prodotto **HBV ELITe MGB Kit** con il sistema **ELITe BeGenius** si compone di tre fasi:

- verifica che il sistema sia pronto,
- allestimento della sessione,
- lettura ed esportazione 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 BeGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**",
- verificare che i calibratori (**HBV Q-PCR Standard**) siano eseguiti, approvati e non scaduti (Status) in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto. In assenza di calibratori approvati o non scaduti, eseguirli come descritto nei paragrafi seguenti,
- verificare che i controlli di amplificazione (**HBV Positive Control**, **HBV Negative Control**) siano eseguiti, approvati e non scaduti (Status) in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto. In assenza di controlli di amplificazione approvati o non scaduti, eseguirli come descritto nei paragrafi seguenti, ma
- selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per l'allestimento della sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da **ELITechGroup S.p.A.** Questi protocolli IVD sono stati specificamente validati con il kit **ELITe MGB**, lo strumento **ELITe BeGenius** e la matrice citata.

Gli Assay Protocols disponibili per analizzare i campioni con il prodotto **HBV ELITe MGB Kit** sono descritti nella tabella sottostante:

Assay Protocol per il prodotto HBV ELITe MGB Kit e ELITe BeGenius			
Nome	Matrice	Esito	Caratteristiche
HBV ELITe_Be_PL_200_50	Plasma	Positivi / UI/mL / copie/mL / Negativi	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione estratto: 50 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume iniziale PCR del campione: 20 µL
HBV ELITe_Be_Se_200_50	Siero	Positivi / UI/mL / copie/mL / Negativi	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione estratto: 50 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume iniziale PCR del campione: 20 µL

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

Allestimento della sessione

Il prodotto **HBV ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con il sistema **ELITe BeGenius** per eseguire:

- A. Sessione integrata (Extract + PCR),
- B. Sessione di amplificazione (PCR only),
- C. Sessione di calibrazione (PCR only),
- D. Sessione di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo (PCR Only).

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi nell'Assay Protocol disponibile sullo strumento e vengono richiamati automaticamente nel momento in cui lo si seleziona.

Nota: Il sistema **ELITe BeGenius** può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile caricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Si descrivono di seguito i passaggi principali per la preparazione dei tre tipi di sessione.

A Corsa integrata

Per impostare la corsa integrata seguire le seguenti indicazioni come da **SW Graphical User Interface (GUI)**:

1. Scongellare a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti i campioni da analizzare e trattarle secondo le linee guida del laboratorio e secondo quanto disposto nel paragrafo "Campioni e controlli".
2. Scongellare le provette di **HBV PCR Mix** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo (almeno 2 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota: Scongellare la miscela **HBV PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

3. Scongellare le provette di **HBV CPE** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
4. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
5. Rimuovere tutti i Rack dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
6. Selezionare il "run mode": "Extract + PCR".
7. Caricare i campioni nella cooling area partendo dal rack L5.
8. Inserire il Rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.

Nota Bene: se un tubo secondario è utilizzato selezionare "2 mL Tube". Se il tubo secondario non ha il barcode, digitare manualmente il Sample ID.

- Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia di 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 50 µL.
- Selezionare il protocollo del test da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio i.e. HBV ELITE_Be_PL_200_50). Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Se deve essere effettuata una seconda estrazione, ripetere i passaggi da 6 a 9 utilizzando il rack L4.
- Caricare i tubi di eluizione barcodati nella cooling area partendo dal rack L3.

Nota Bene: i tubi di eluizione possono essere etichettati per aumentare la tracciabilità.

- Inserire il Rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Ripetere i passaggi 11 e 12 utilizzando il rack L2.
- Caricare il CPE e la HBV PCR Mix nella cooling area.
- Inserire il rack L1 nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare e controllare i Rack puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare il Rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare il rack per estrazione con le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200" e tutti i consumabili richiesti, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" per avviare la corsa.

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

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

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

Nota: La miscela PCR Mix può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nella Cooler Unit per un massimo di 3 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

B Corsa di amplificazione

Per impostare la corsa di amplificazione seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

- Scongelare le provette di **HBV PCR Mix** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo (almeno 2 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota: Scongelare la miscela **HBV PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

- Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
- Rimuovere i rack 1, 2, e 3 dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
- Selezionare il "run mode": "PCR Only".
- Caricare i campioni nella cooling area partendo dal rack L3.
- Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 50 µL.
- Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio HBV ELITE_Be_PL_200_50).
- Caricare HBV PCR Mix nella cooling area.
- Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare e controllare i Rack puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare il Rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" per avviare la corsa.

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

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

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

Nota: La miscela PCR Mix può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nella Cooler Unit per un massimo di 3 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

C Corsa di calibrazione

Per impostare la corsa di calibrazione seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare le provette di HBV PCR Mix a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo (almeno 2 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota: Scongellare la miscela **HBV PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Scongellare le provette **HBV Q-PCR Standard** (Cal1: HBV Q-PCR Standard 10², Cal2: HBV Q-PCR Standard 10³, Cal3: HBV Q-PCR Standard 10⁴, Cal4: HBV Q-PCR Standard 10⁵) a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta consente un volume sufficiente per preparare 2 reazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
4. Rimuovere i rack 1, 2 e 3 dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
5. Selezionare il "run mode": "PCR Only".
6. Caricare i calibratori nella cooling area nel rack L3.
7. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 50 µL.
9. Selezionare l'Assay Protocol "HBV ELITE_Be_STD" da utilizzare nella colonna "Assay". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare HBV PCR Mix nella cooling area.
11. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Caricare e controllare i Rack puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Caricare il Rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
14. Chiudere lo sportello dello strumento.
15. Premere "Start" per avviare la corsa.

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

Nota bene: Alla fine della corsa lo standard rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato, e conservato a -20 ° C.

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

Nota: La miscela PCR Mix può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nella Cooler Unit per un massimo di 3 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

D. Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo

Per impostare la corsa di amplificazione del Controllo Positivo e Negativo seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare le provette di **HBV PCR Mix** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo (almeno 2 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

Nota: Scongellare la miscela **HBV PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Scongellare le provette di **HBV Positive Control** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti per sessione. Ogni provetta consente un volume sufficiente per preparare 4 reazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
3. Trasferire almeno 50 µL di acqua ultrapura per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito nell'ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
5. Rimuovere i rack 1, 2 e 3 dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
6. Selezionare il "run mode": "PCR Only".
7. Caricare i controlli nella cooling area nel rack L3.
8. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 50 µL.
10. Selezionare l'Assay Protocol "HBV ELITE_Be_PC" per il Positive Control e "HBV ELITE_Be_NC" per il Negative Control da utilizzare nella colonna "Assay". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare HBV PCR Mix nella cooling area.
12. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Caricare e controllare i Rack puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
14. Caricare il Rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
15. Chiudere lo sportello dello strumento.
16. Premere "Start" per avviare la corsa.

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

Nota bene: Alla fine della corsa lo standard rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato, e conservato a -20 ° C.

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

Nota: La miscela PCR Mix può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nella Cooler Unit per un massimo di 3 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

Esame e approvazione dei risultati

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata sono visualizzati i risultati relativi a campione / calibratore / controllo e le informazioni relative alla corsa. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i rapporti ("Sample Report" o "Track Report").

Nota Bene: Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento **ELITE BeGenius**.

ELITE BeGenius genera i risultati con **HBV ELITE MGB® Kit** attraverso questa procedura:

- A. Validazione della curva di calibrazione,
- B. Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
- C. Validazione dei risultati del campione,
- D. Refertazione dei risultati del campione.

Nota bene: per i dettagli, fare riferimento agli stessi capitoli di **ELITE InGenius**.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI
ELITE InGenius e ELITE BeGenius

Limite di Rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) del kit HBV ELITE MGB® è stato definito in associazione con i campioni di plasma e con il sistema **ELITE InGenius**.

Il LoD è stato definito mediante analisi di un pannello di campioni negativi di plasma raccolto in ACD positivamente con un materiale di riferimento certificato per HBV (4th WHO International Standard, NIBSC) a un titolo noto. Sono stati preparati sei livelli di diluizione a partire da 18 UI / mL fino a 1 UI / mL. Ogni livello di diluizione è stato testato in 24 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 (UI / mL) per campione di plasma raccolto in ACD ed ELITE InGenius			
Target	LoD	Intervallo di confidenza 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
HBV	9	6	18

Il LoD inteso come copie / mL per campioni di plasma raccolto in ACD è stato calcolato applicando lo specifico fattore di conversione indicato a pag. 35 Si riporta di seguito la sensibilità analitica espressa in copie / mL.

Limite di Rilevazione (copie / mL) per campione di plasma raccolto in ACD ed ELITE InGenius			
Target	LoD	Intervallo di confidenza 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
HBV	38	27	73

Il valore calcolato di LoD è stato verificato analizzando 30 replicati di plasma raccolto in ACD, 30 replicati di plasma raccolto in EDTA e 30 replicati di campioni di siero positivamente con materiale di riferimento certificato per HBV (4th WHO International Standard, NIBSC) alla concentrazione dichiarata. Il LoD è confermato se almeno 27 replicati su 30 danno un risultato positivo come da CLSI standard EP17-A2.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Limite di Rilevazione per campioni di plasma e siero ed ELITE InGenius					
Campione	Titolo	Target	N	Positivo	Negativo
Plasma raccolto in ACD	9 UI / mL	HBV	30	30	0
Plasma raccolto in EDTA	9 UI / mL	HBV	30	28	2
Siero	9 UI / mL	HBV	30	29	1

Il valore di LoD per il target HBV è stato confermato a 9 UI / mL per plasma raccolto in ACD, plasma raccolto in EDTA e siero.

Il valore di LoD calcolato per Plasma raccolto il EDTA, Plasma raccolto il ACD e Siero è stato verificato in associazione a **ELITE BeGenius** testando 30 replicati di campioni di Plasma raccolto in ACD, 30 replicati di Plasma raccolto in EDTA e 30 replicati di Siero, positivamente utilizzando il materiale di riferimento certificato HBV (4th WHO International Standard, NIBSC) alla concentrazione dichiarata. Il valore di LoD è confermato se almeno 27 repliche su 30 danno un risultato positivo secondo la linea guida CLSI EP17-A.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Limite di Rilevazione per campioni di plasma e siero ed ELITE BeGenius					
Campione	Titolo	Target	N	Positivo	Negativo
Plasma raccolto in ACD	9 UI / mL	HBV	30	28	2
Plasma raccolto in EDTA	9 UI / mL	HBV	30	28	2
Siero	9 UI / mL	HBV	30	30	0

Il valore LoD per il target HBV è stato confermato a 9 UI / mL per il Plasma raccolto in EDTA, Plasma raccolto in ACD e Siero.

Equivalenza tra matrici: plasma EDTA rispetto a plasma ACD e siero

L'equivalenza a livello di prestazioni del kit HBV ELITE MGB® è stata verificata utilizzando campioni di plasma raccolto in ACD, di plasma raccolto in EDTA e siero in associazione con il sistema **ELITE InGenius**.

Una serie di campioni di plasma provenienti da 30 donatori differenti - nello specifico, 30 campioni di plasma raccolto in EDTA e 30 campioni di plasma raccolto in ACD (campioni appaiati) - sono stati analizzati per verificarne la negatività per HBV mediante un saggio immunologico CE IVD. I campioni sono stati analizzati su sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR" (estratto + PCR). È stata valutata la percentuale di concordanza dei risultati negativi.

Il coefficiente di variabilità, espresso in percentuale (%CV) dei valori di Ct del controllo interno, è stato calcolato per valutare l'equivalenza delle due matrici.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	N	Positivo	Negativo	Concordanza negativi %	Ct di IC %CV	Ct di IC totale %CV
Plasma raccolto in EDTA	30	0	30	100%	0,86	0,98
Plasma raccolto in ACD	30	0	30		1,01	

I 30 campioni appaiati di plasma raccolto in EDTA e di siero sono stati analizzati per verificarne la negatività per HBV mediante un saggio immunologico CE IVD. I campioni sono stati analizzati su sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR" (estratto + PCR). È stata valutata la percentuale di concordanza dei risultati negativi. Il coefficiente di variabilità, espresso in percentuale (%CV) dei valori di Ct del controllo interno, è stato calcolato per valutare l'equivalenza delle due matrici.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	N	Positivo	Negativo	Concordanza negativi %	Ct di IC %CV	Ct di IC totale %CV
Plasma raccolto in EDTA	30	0	30	97%	0,90	0,86
Siero	30	1	29		0,82	

Il campione di siero risultato positivo ha evidenziato un titolo molto basso (inferiore a 9 UI/mL) compatibile con la mancata identificazione al saggio immunologico CE IVD utilizzato per certificarne la negatività.

I 30 campioni appaiati di plasma raccolto in EDTA e di plasma raccolto in ACD sono stati analizzati per verificarne la negatività per HBV mediante un saggio immunologico CE IVD e positivamente con un materiale di riferimento certificato (4th WHO HBV International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 27 UI / mL). I campioni sono stati analizzati su sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR" (estratto + PCR). È stata valutata la percentuale di concordanza dei risultati positivi. Il coefficiente di variabilità, espresso in percentuale (%CV) dei valori di Ct del target HBV, è stato calcolato per valutare l'equivalenza delle due matrici.

HBV ELITE MGB® Kit
reagenti per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK602ING

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	N	Positivo	Negativo	Accordo positivo %	Ct di HBV %CV	Ct di HBV totale %CV	ΔQty (Log IU/mL)
Plasma raccolto in EDTA	30	30	0	100%	1.75	1.81	0.0458
Plasma raccolto in ACD	30	30	0		1.88		

I 30 campioni appaiati di plasma raccolto in EDTA e di siero sono stati analizzati per verificarne la negatività per HBV DNA mediante un saggio immunologico CE IVD e positivizzati con un materiale di riferimento certificato (4th WHO HBV International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 27 UI / mL). I campioni sono stati analizzati su sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR". È stata valutata la percentuale di concordanza dei risultati positivi. Il coefficiente di variabilità, espresso in percentuale (%CV) dei valori di Ct del target HBV, è stato calcolato per valutare l'equivalenza delle due matrici.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	N	Positivo	Negativo	Accordo positivo %	Ct di HBV %CV	Ct di HBV totale %CV	ΔQty (Log IU/mL)
Plasma raccolto in EDTA	30	30	0	100%	1.59	1.49	0.0910
Siero	30	30	0		1.29		

In queste analisi, 30 campioni appaiati di plasma raccolto in EDTA e di plasma raccolto in ACD, come pure 30 campioni appaiati di plasma raccolto in EDTA e di siero hanno evidenziato prestazioni equivalenti quando le analisi sono state eseguite con il kit HBV ELITE MGB® in associazione con il sistema ELITE InGenius.

Ulteriori analisi sull'equivalenza delle matrici sono state eseguite nell'ambito dello studio riguardante l'intervallo di misurazione lineare (vedi pag. 17).

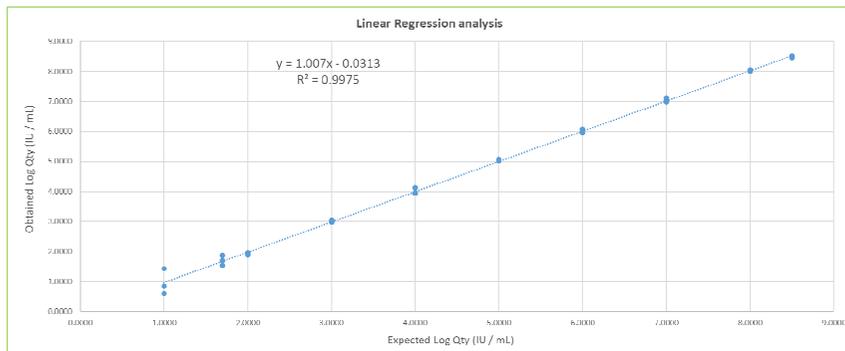
Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare del prodotto HBV ELITE MGB® Kit è stato determinato in associazione con campioni di plasma e il sistema ELITE InGenius.

A tal fine è stato utilizzato un pannello di diluizioni del materiale di riferimento (ZeptoMetrix) in campioni di plasma EDTA negativi. Il pannello era costituito da dieci punti di diluizione da circa 10^{8.5} UI / mL a 10¹ UI / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in 3 replicati sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita applicando il metodo di regressione lineare e polinomiale, ha evidenziato che la risposta del saggio è lineare per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione al quadrato (R²) pari a 0,998.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.



Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) è stato fissato alla concentrazione LoD che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard = 0,2813 Log IU / mL) e accurati (Errore = 0,2767 Log IU / mL) entro ±0,5 Log UI / mL: 9 UI / mL.

HBV ELITE MGB® Kit
reagenti per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK602ING

Il limite superiore di quantificazione (ULOQ) è stato fissato alla concentrazione più alta che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard = 0,0275 Log IU / mL) e accurati (Errore = 0,0175 Log IU / mL) entro ±0,5 Log UI / mL: 317.750.000 UI / mL.

L'intervallo di misurazione lineare inteso come copie / mL per campioni di plasma raccolto in EDTA è stato calcolato applicando lo specifico fattore di conversione indicato a pag. 35

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

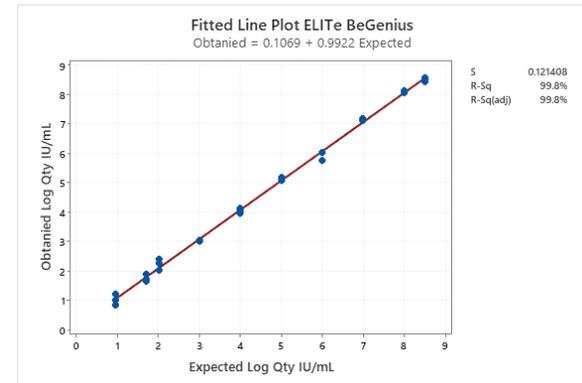
Intervallo di misurazione lineare per campioni di plasma EDTA ed ELITE InGenius	
Limite inferiore	Limite superiore
9 UI / mL	317.750.000 UI / mL
38 copie / mL	1.323.958.333 copie / mL

L'intervallo di misurazione lineare del prodotto HBV ELITE MGB® Kit è stato determinato in associazione con campioni di plasma e il sistema ELITE BeGenius.

A tal fine è stato utilizzato un pannello di diluizioni del materiale di riferimento (ZeptoMetrix) in campioni di plasma EDTA negativi. Il pannello era costituito da dieci punti di diluizione da circa 3,2x10⁸ UI / mL a 9 UI / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in 3 replicati sul sistema ELITE BeGenius in modalità "Extract + PCR".

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita applicando il metodo di regressione lineare, ha evidenziato che la risposta del saggio è lineare per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione al quadrato (R²) pari a 0,998.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.



Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) è stato fissato alla concentrazione LoD che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard = 0,1939 Log UI / mL) e accurati (Errore = - 0,0709 Log UI / mL) entro ±0,5 Log UI / mL: 9 UI / mL.

Il limite superiore di quantificazione (ULOQ) è stato fissato alla concentrazione più alta che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard = 0,0579 Log UI / mL) e accurati (Errore = 0,0131 Log UI / mL) entro ±0,5 Log UI / mL: 317.750.000 UI / mL.

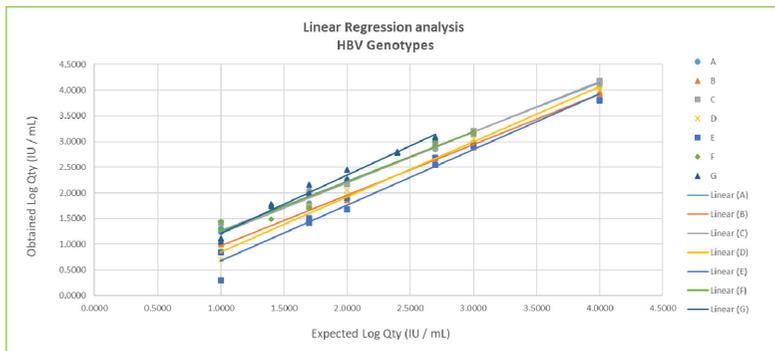
L'intervallo di misurazione lineare inteso come copie / mL per campioni di plasma raccolto in EDTA è stato calcolato applicando lo specifico fattore di conversione indicato a pag. 35

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare per campioni di plasma EDTA ed ELITE BeGenius	
Limite inferiore	Limite superiore
9 UI / mL	317.750.000 UI / mL
38 copie / mL	1.323.958.333 copie / mL

L'intervallo di misurazione lineare è stato verificato mediante analisi di campioni negativi di plasma raccolto in EDTA e positivizzato con il materiale di riferimento (1st WHO International Reference Panel for HBV Genotypes, PEI) per i principali genotipi di HBV (A, B, C, D, E, F, G). Ogni genotipo di HBV è stato analizzato in un pannello di 6 livelli di diluizione. Ogni livello di diluizione è stato testato in 2 replicati sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

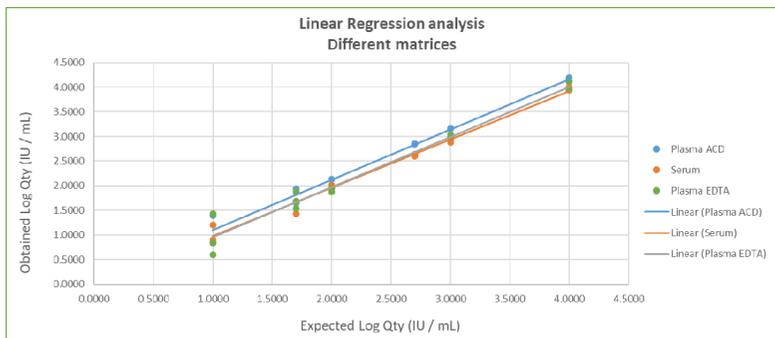
I risultati sono illustrati nella tabella seguente.



La linearità del saggio è stata confermata per i principali genotipi di HBV (A, B, C, D, E, F, G), dando risultati quantitativi entro $\pm 0,5$ Log UI / mL e R2 compreso tra 0,979 e 0,996.

L'intervallo di misurazione lineare è stato verificato mediante analisi di campioni negativi di plasma raccolto in ACD e campioni negativi di siero positivizzati con il materiale di riferimento (4th WHO International Standard, NIBSC). Ogni matrice è stata analizzata in un pannello di 6 livelli di diluizione. Ogni livello di diluizione è stato testato in 2 replicati sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR". Risultati corrispondenti dell'analisi con il plasma EDTA sono stati riportati come riferimento.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.



La linearità del saggio è stata confermata per i campioni di plasma raccolto in ACD e di siero dando risultati quantitativi entro $\pm 0,5$ Log UI / mL e R2 rispettivamente di 0,982 e 0,988.

Inclusività: Efficienza della rilevazione e della quantificazione su differenti genotipi

L'efficienza della rilevazione per differenti genotipi di HBV è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nei database dei nucleotidi.

L'analisi delle regioni scelte per l'ibridizzazione dei primer e della sonda nell'allineamento delle sequenze del gene codificante la polimerasi (gene P) disponibili nel database ha evidenziato una conservazione delle sequenze e l'assenza di mutazioni significative nei genotipi di HBV A, B, C, D, E, F, G, H, I e RF. Quindi si prevede che la rilevazione e quantificazione per i differenti genotipi di HBV saranno efficienti.

L'inclusività del saggio, intesa come efficienza di rilevazione e quantificazione rispetto a differenti genotipi, è stata verificata analizzando il pannello "1st WHO International Reference Panel for HBV Genotypes" (PEI) costituito dai principali genotipi di HBV (A, B, C, D, E, F, G).

Ogni campione del pannello è stato diluito alla concentrazione di 3 x LoD (circa 27 UI / mL) in campioni negativi di plasma raccolto in ACD e testato sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

"1st WHO International Reference Panel for HBV Genotypes" (PEI)				
ID campione	Genotipo	N	Ct HBV media	media HBV UI/ml
HBV 1/A	A	3 / 3	37,71	25
HBV 2/A		3 / 3	37,76	25
HBV 3/A		3 / 3	38,20	17
HBV 4/B	B	3 / 3	38,15	17
HBV 5/B		3 / 3	38,56	17
HBV 6/B		3 / 3	38,23	18
HBV 7/B		3 / 3	37,75	24
HBV 8/C	C	3 / 3	38,01	20
HBV 9/C		3 / 3	38,12	18
HBV 10/D	D	3 / 3	37,84	22
HBV 11/D		3 / 3	37,97	20
HBV 12/D		3 / 3	38,29	16
HBV 13/E	E	3 / 3	38,02	19
HBV 14/F	F	3 / 3	37,81	22
HBV 15/G	G	3 / 3	37,08	37

L'inclusività del saggio, intesa come efficienza di rilevazione e quantificazione rispetto a differenti genotipi, è stata verificata analizzando il pannello "AccuSet™ HBV DNA Genotype Performance Panel" (SeraCare), costituito dai genotipi di HBV A, B, C, D, E, F, G, H.

Ogni campione del pannello è stato diluito alla concentrazione di 3 x LoD (circa 27 UI / mL) in campioni negativi di plasma raccolto in ACD e testato sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

"AccuSet™ HBV DNA Genotype Performance Panel" (SeraCare)				
ID campione	Genotipo	N	Ct HBV media	UI/ml HBV media
A	A	3 / 3	38,01	19
B	B	3 / 3	37,99	20
C	C	3 / 3	38,14	18
D	D	3 / 3	38,16	18
E	E	3 / 3	38,15	17
F	F	3 / 3	37,92	21
H	H	3 / 3	37,80	22

Tutti i campioni sono stati rilevati e quantificati correttamente entro $\pm 0,5$ Log UI / mL (9-85 UI / mL) mediante utilizzo del prodotto HBV ELITE MGB® Kit in associazione con lo strumento ELITE InGenius.

Marcatori potenzialmente interferenti: cross-reattività

La potenziale cross-reattività del saggio con altri microrganismi involontari è stata valutata mediante analisi *in silico* di sequenze disponibili nel database dei nucleotidi.

Le regioni scelte per l'ibridizzazione dei primer e della sonda sono state verificate rispetto all'allineamento delle sequenze di altri microrganismi disponibili nel database. L'analisi delle regioni di ibridizzazione non ha evidenziato omologie significative. Pertanto, non si prevede alcuna crossreattività.

La mancata crossreattività con altri microrganismi che possono essere rilevati nei campioni clinici di plasma e siero 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, NIBSC ZeptoMetrix) sono stati analizzati in concentrazione elevata (almeno 10⁵ copie / reazione) in tre replicati in associazione con il sistema ELITE InGenius in modalità "PCR Only". Al DNA o RNA genomico di ogni microrganismo sono state aggiunte 80.000 copie di controllo interno allo scopo di simulare il campione clinico estratto.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	HBV Pos. / Rep.	Esito
Adenovirus 2	0 / 3	Nessuna crossreattività
CMV	0 / 3	Nessuna crossreattività
EBV	0 / 3	Nessuna crossreattività
HHV6	0 / 3	Nessuna crossreattività
VZV	0 / 3	Nessuna crossreattività
HSV1	0 / 3	Nessuna crossreattività
HSV2	0 / 3	Nessuna crossreattività
HTLVI	0 / 3	Nessuna crossreattività
HTLVII	0 / 3	Nessuna crossreattività
Parvovirus B19	0 / 3	Nessuna crossreattività
Echovirus 4	0 / 3	Nessuna crossreattività
Dengue Virus Type 3	0 / 3	Nessuna crossreattività
WNV	0 / 3	Nessuna crossreattività
Influenza A virus (H1N1)	0 / 3	Nessuna crossreattività
Influenza B virus (Florida)	0 / 3	Nessuna crossreattività
RSV A2	0 / 3	Nessuna crossreattività
HAV	0 / 3	Nessuna crossreattività
HCV	0 / 3	Nessuna crossreattività
HEV	0 / 3	Nessuna crossreattività
HIV-1	0 / 3	Nessuna crossreattività
HIV-2	0 / 3	Nessuna crossreattività
<i>Candida albicans</i>	0 / 3	Nessuna crossreattività
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 / 3	Nessuna crossreattività

Tutti i marcatori potenzialmente interferenti analizzati non hanno evidenziato alcuna cross-reattività per il target HBV quando analizzati con il prodotto HBV ELITE MGB® Kit.

Marcatori potenzialmente interferenti: Interferenza

La mancata interferenza con altri microrganismi che possono essere rilevati nei campioni clinici di plasma è stata valutata mediante analisi di un pannello di materiali di riferimento certificati.

Campioni di DNA o RNA genomico estratto da marcatori potenzialmente interferenti (ATCC, NIBSC, ZeptoMetrix) a concentrazione elevata (almeno 10⁵ copie / reazione) sono stati positivamente con DNA genomico dell'HBV (NIBSC) a bassa concentrazione (circa 10 copie / reazione). I campioni sono stati analizzati in tre replicati in associazione con il sistema ELITE InGenius in modalità "PCR Only" (solo PCR)". A ogni campione sono state aggiunte 80.000 copie di controllo interno allo scopo di simulare il campione clinico estratto.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	HBV Pos. / Rep.	Esito
Adenovirus 2	3 / 3	Nessuna interferenza
CMV	3 / 3	Nessuna interferenza
EBV	3 / 3	Nessuna interferenza
HHV6	3 / 3	Nessuna interferenza
VZV	3 / 3	Nessuna interferenza
HSV1	3 / 3	Nessuna interferenza
HSV2	3 / 3	Nessuna interferenza
HTLVI	3 / 3	Nessuna interferenza
HTLVII	3 / 3	Nessuna interferenza
Parvovirus B19	3 / 3	Nessuna interferenza
Echovirus 4	3 / 3	Nessuna interferenza
Dengue Virus Type 3	3 / 3	Nessuna interferenza
WNV	3 / 3	Nessuna interferenza
Influenza A virus (H1N1)	3 / 3	Nessuna interferenza
Influenza B virus (Florida)	3 / 3	Nessuna interferenza
RSV A2	3 / 3	Nessuna interferenza
HAV	3 / 3	Nessuna interferenza
HCV	3 / 3	Nessuna interferenza
HEV	3 / 3	Nessuna interferenza
HIV-1	3 / 3	Nessuna interferenza
HIV-2	3 / 3	Nessuna interferenza
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 / 3	Nessuna interferenza
<i>Candida albicans</i>	3 / 3	Nessuna interferenza

Tutti i marcatori potenzialmente interferenti analizzati non hanno evidenziato alcun effetto significativo sull'amplificazione del target HBV quando analizzati con il prodotto HBV ELITE MGB® Kit.

Sostanze potenzialmente interferenti

L'effetto di sostanze potenzialmente interferenti è stato valutato analizzando il pannello "AcroMetrix® Inhibition Panel" (Thermo Fisher Scientific Inc.) contenente sostanze endogene, derivanti da emolisi, ittero e lipemia, e sostanze esogene, anticoagulanti EDTA ed eparina.

I campioni del pannello di inibizione sono stati positivamente con materiale di riferimento certificato per HBV (4th WHO HBV International Standard, NIBSC) a concentrazione di 3 x LoD (circa 27 UI / mL).

Inoltre, altre 6 sostanze farmacologiche potenzialmente interferenti sono state analizzate nelle rispettive concentrazioni: ganciclovir, azitromicina, glecaprevir, entecavir, tenofovir, lamivudina. Le sostanze sono state aggiunte singolarmente ai campioni negativi di plasma raccolto in ACD e positivamente con materiale di riferimento certificato per HBV (4th WHO HBV International Standard, NIBSC) a concentrazione di 3 x LoD (circa 27 UI / mL).

I campioni sono stati testati in tre replicati sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR". I valori di Ct (campioni di riferimento e in test) del target HBV e il controllo interno sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente di variabilità percentuale (%CV) allo scopo di valutare la possibile interferenza.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	Pos./Rep.	%CV Ct HBV	%CV Ct CI
EDTA	3 / 3	1,78	0,87
Eparina	1 / 3	N.A.	7,11
Sangue emolitico	3 / 3	1,11	0,90
Plasma lipemico	3 / 3	1,30	0,72
Plasma itterico	3 / 3	1,13	1,41
Ganciclovir	3 / 3	0,96	0,76
Azitromicina	3 / 3	0,88	0,85
Glecaprevir	3 / 3	1,04	0,57
Entecavir	3 / 3	1,07	0,88
Tenofovir	3 / 3	0,88	0,76
Lamivudina	3 / 3	1,13	0,78

L'analisi ha dimostrato che EDTA, emoglobina, trigliceridi, bilirubina, ganciclovir, azitromicina, glecaprevir, entecavir, tenofovir e lamivudina non interferiscono con l'amplificazione di HBV o con il controllo interno. Il coefficiente %CV dei valori di Ct è risultato inferiore al 2%.

È stato confermato che l'eparina è in grado di inibire l'amplificazione di HBV, ma grazie al limite di Ct per il controllo interno (Ct CI < 31), i campioni risultano "non validi" e non "falsi negativi".

Assenza di cross-contaminazione

L'assenza di cross-contaminazione è stata verificata analizzando i risultati di cinque sessioni in cui campioni di plasma negativi per HBV DNA sono stati alternati a campioni di plasma positivizzati con materiale di riferimento certificato per HBV (ZepatoMetrix) alla concentrazione di 1×10^6 UI / mL.

Cinque serie di campioni, alternando sei campioni positivi con sei campioni negativi, sono state testate con il sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campioni	N	Negativo	Positivo
Plasma ACD positivizzato a 1×10^6 HBV UI / mL	30	0	30
Plasma ACD negativo per HBV	30	30	0

Nessuno dei campioni negativi per HBV ha evidenziato falsi positivi. Non sono state rilevate cross-contaminazioni intra-sessione e inter-sessioni.

Tasso totale di errore del sistema

Il tasso totale di errore del sistema, con risultati falsi negativi, è stato verificato analizzando un pannello di campioni positivizzati per HBV DNA a basso titolo.

100 campioni appaiati di plasma raccolto in EDTA, 30 differenti campioni di plasma raccolto in ACD e 30 differenti campioni di siero, risultati negativi per HBV DNA, sono stati positivizzati con un materiale di riferimento certificato (4th WHO HBV International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 27 UI / mL). I campioni sono stati analizzati su sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR" (estratto + PCR).

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni	N	Negativo	Positivo	UI / mL HBV media
Plasma raccolto in EDTA	100	0	100	26
Plasma raccolto in ACD	30	0	30	27
Siero	30	0	30	23

Nessuno dei campioni positivi per HBV ha evidenziato falsi negativi. In questo test, la percentuale di insuccesso dell'intero sistema è stata pari allo 0%.

Il tasso totale di errore del sistema, con risultati falsi negativi, è stato verificato in associazione a ELITE BeGenius analizzando un pannello di campioni positivizzati per HBV DNA a basso titolo.

100 campioni di plasma raccolto in EDTA, risultati negativi per HBV DNA, sono stati positivizzati con un materiale di riferimento certificato (4th WHO HBV International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 27 UI / mL). I campioni sono stati analizzati su sistema ELITE BeGenius in modalità "Extract + PCR" (estratto + PCR).

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni	N	Negativo	Positivo	UI / mL HBV media
Plasma raccolto in EDTA	100	0	100	15

Nessuno dei campioni positivi per HBV ha evidenziato falsi negativi. In questo test, la percentuale di insuccesso dell'intero sistema è stata pari allo 0%.

Ripetibilità

La ripetibilità dei risultati ottenuti con il prodotto HBV ELITE MGB Kit in associazione con il sistema ELITE InGenius è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di plasma. Il pannello ha incluso un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento certificato per HBV (4th WHO HBV International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 27 UI / mL) e di 10 x LoD (circa 90 UI / mL).

La ripetibilità è stata ottenuta mediante analisi di campioni in quattro replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, in due giorni differenti. Tre lotti di prodotto sono stati utilizzati con lo stesso strumento dallo stesso operatore. I campioni sono stati testati in posizioni randomizzate sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori di Ct del 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.

Campione	Ripetibilità intra-sessione							
	HBV				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	28,89	0,23	0,79
3 x LoD	8 / 8	38,07	0,38	1,00				
10 x LoD	8 / 8	36,26	0,25	0,69				

Campione	Ripetibilità inter-sessione							
	HBV				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	28,79	0,28	0,97
3 x LoD	16 / 16	38,01	0,41	1,08				
10 x LoD	16 / 16	36,18	0,28	0,77				

Nella prova di ripetibilità, il saggio ha rilevato il target HBV secondo le previsioni e ha mostrato un basso coefficiente %CV dei valori di Ct che non ha superato l'1,1% per HBV e l'1% per il controllo interno.

La ripetibilità dei risultati ottenuti con il prodotto HBV ELITE MGB Kit in associazione con il sistema ELITE BeGenius è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di plasma. Il pannello includeva un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento certificato per HBV (4th WHO HBV International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 27 UI / mL) e di 10 x LoD (circa 90 UI / mL).

La ripetibilità è stata ottenuta mediante analisi di campioni in otto replicati, in una sessione al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, in due giorni differenti. Tre lotti di prodotto sono stati utilizzati con lo stesso strumento dallo stesso operatore. I campioni sono stati testati in posizioni randomizzate sul sistema ELITE BeGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori di Ct del 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.

Ripetibilità intra-sessione								
Campione	HBV				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	30,06	0,37	1,24
3 x LoD	8 / 8	38,64	0,46	1,19				
10 x LoD	8 / 8	36,83	0,34	0,93				

Ripetibilità inter-sessione								
Campione	HBV				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	30,04	0,54	1,80
3 x LoD	16 / 16	38,93	0,86	2,22				
10 x LoD	16 / 16	36,87	0,35	0,94				

Nella prova di ripetibilità, il saggio ha rilevato il target HBV secondo le previsioni e ha mostrato un basso coefficiente %CV dei valori di Ct che non ha superato l'2,2% per HBV e l'1,8% per il controllo interno.

Riproducibilità

La riproducibilità dei risultati ottenuti mediante il prodotto HBV ELITE MGB Kit in associazione con il sistema **ELITE InGenius** è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di plasma. Il pannello includeva un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento certificato per HBV (4th WHO HBV International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 27 UI / mL) e di 10 x LoD (circa 90 UI / mL).

La riproducibilità è stata ottenuta mediante analisi dei campioni del pannello in quattro replicati, in una sessione al giorno, in due giorni per sito. Tre differenti lotti di prodotto sono stati utilizzati in tre siti differenti su tre strumenti differenti e da tre operatori differenti. I campioni sono stati lavorati in posizioni randomizzate sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori di Ct del 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 inter-sito								
Campione	HBV				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 24	N.A.	N.A.	N.A.	72 / 72	28,73	0,45	1,58
3 x LoD	24 / 24	37,60	0,68	1,80				
10 x LoD	24 / 24	35,63	0,35	0,98				

Riproducibilità inter-lotto								
Campione	HBV				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 48	N.A.	N.A.	N.A.	144 / 144	28,67	0,41	1,44
3 x LoD	48 / 48	38,19	0,44	1,16				
10 x LoD	48 / 48	36,25	0,38	1,06				

Nella prova di riproducibilità, il saggio ha rilevato il target HBV secondo le previsioni e ha mostrato un basso coefficiente %CV dei valori di Ct che non ha superato l'1,8% per HBV e l'1,6% per il controllo interno.

La riproducibilità dei risultati ottenuti mediante il prodotto HBV ELITE MGB Kit in associazione con il sistema **ELITE BeGenius** è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di plasma. Il pannello includeva un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento certificato per HBV (4th WHO HBV International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 27 UI / mL) e di 10 x LoD (circa 90 UI / mL).

La riproducibilità è stata ottenuta mediante analisi dei campioni del pannello in quattro replicati, in una sessione al giorno, in due giorni per strumento. Tre differenti lotti di prodotto sono stati utilizzati su tre strumenti differenti e da tre operatori differenti. I campioni sono stati lavorati in posizioni randomizzate sul sistema ELITE BeGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori di Ct del 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 inter-strumento								
Campione	HBV				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 24	N.A.	N.A.	N.A.	72 / 72	30,67	0,86	2,80
3 x LoD	24 / 24	38,54	1,08	2,79				
10 x LoD	24 / 24	36,53	0,76	2,09				

Riproducibilità inter-lotto								
Campione	HBV				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 48	N.A.	N.A.	N.A.	144 / 144	29,89	0,51	1,71
3 x LoD	48 / 48	38,19	0,85	2,24				
10 x LoD	48 / 48	36,38	0,57	1,57				

Nella prova di riproducibilità, il saggio ha rilevato il target HBV secondo le previsioni e ha mostrato un basso coefficiente %CV dei valori di Ct che non ha superato l'2,8% per HBV e l'2,8% per il controllo interno.

Fattore di conversione alle Unità Internazionali

Il fattore di conversione per esprimere i risultati quantitativi in Unità Internazionali / mL a partire da copie / mL è stato calcolato utilizzando un pannello di quattro diluizioni (0,5 Log tra diluizioni) del materiale di riferimento calibrato certificato "4th WHO HBV International Standard" (NIBSC) su campioni di plasma raccolti in EDTA risultato negativo per HBV DNA.

Ogni punto del pannello è stato testato su 27 replicati utilizzando tre differenti lotti di prodotto su tre differenti strumenti in tre giorni differenti. I campioni sono stati lavorati in posizioni randomizzate sul sistema **ELITE InGenius** in modalità "Extract + PCR".

Il fattore di conversione è stato calcolato mediante l'analisi della differenza di concentrazione logaritmica tra il titolo di riferimento in UI / mL e i risultati ottenuti in copie / mL, risultando pari a 0,24 UI / copia.

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

Fattore di conversione a Unità Internazionali, Fc = 0,24 UI / copia						
Campione			Risultato			Differenza Log (rif. - test)
UI / mL	UI / mL Log	N	c. / mL media	UI / mL media	Log UI/mL media	
31.600	4,5000	27	133.240	31.748	4,4877	+0,0123
10.000	4,0000	27	41.965	9.999	3,9917	+0,0083
3.160	3,5000	27	14.275	3.401	3,5187	-0,0187
1.000	3,0000	27	4.337	1.033	3,0020	-0,0020

Essendo stata dimostrata l'equivalenza tra il plasma raccolto in EDTA e il plasma raccolto in ACD e il siero (vedi pag. 15 e 16), il fattore di conversione può essere applicato alle tre matrici.

Il fattore di conversione per esprimere i risultati quantitativi in Unità Internazionali / mL a partire da copie / mL è stato verificato sui sistemi **ELITE BeGenius** ed **ELITE InGenius** utilizzando un pannello di cinque diluizioni (0,5 Log tra diluizioni) del materiale di riferimento calibrato certificato "4th WHO HBV International Standard" (NIBSC) su campioni di plasma raccolti in EDTA risultato negativo per HBV DNA.

Il pannello includeva cinque punti di diluizione da circa 4,5 Log UI / mL a 2,5 Log UI / mL. Ogni punto del pannello è stato testato in 4 replicati.

La precisione di quantificazione del target, come deviazione standard del log UI / mL, era inferiore a 0,5 log.

L'accuratezza della quantificazione del target, come differenza tra le concentrazioni teoriche e misurate in Log UI / mL, era inferiore a 0,5 Log.

Questi risultati hanno confermato il Fattore di conversione calcolato per Plasma con ELITE InGenius.

HBV ELITE MGB® Kit
reagenti per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK602ING

Nota: Il Fattore di Conversione alle Unità Internazionali (0.24 IU/copie), calcolato con il "4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT" (NIBSC), è applicabile anche al "5th WHO International Standard for HBV DNA for NAT" (NIBSC, UK, code 22/120).

Riproducibilità con il materiale di riferimento

La riproducibilità dei risultati del saggio rispetto ai risultati ottenuti utilizzando altri metodi in differenti laboratori è stata verificata analizzando il proficiency panel "QCMD 2020 Hepatitis B Virus DNA EQA Programme" (QCMD).

Ogni punto del pannello è stato testato sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR". I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Codice del campione	Contenuto del campione	Consensus Log UI/ml	DS Log UI/ml	Risultati del test Log UI/ml	Differenza (rif. - test)
HBVDNA101S-01	HBV tipo A	2,823	0,130	2,695	+0,128
HBVDNA101S-02	HBV tipo D	2,673	0,148	2,625	+0,048
HBVDNA101S-03	HBV tipo D	3,642	0,155	3,579	+0,063
HBVDNA101S-04	HBV negativo	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
HBVDNA101S-05	HBV tipo A	1,869	0,229	1,688	+0,181
HBVDNA101S-06	HBV tipo A	3,803	0,156	3,781	+0,022
HBVDNA101S-07	HBV tipo A	2,848	0,176	2,696	+0,152
HBVDNA101S-08	HBV tipo D	1,724	0,227	1,422	+0,302

In quest'analisi, il saggio ha rilevato correttamente tutti i componenti del pannello. Sette campioni sono stati rilevanti nel range del technology consensus (sistemi commerciali di amplificazione real time) ± 1 deviazione standard (SD). Il campione HBVDNA101S-08 (53 UI/ml) è stato sottostimato, ma il risultato cade nell'intervallo del technology consensus ± 2 SD e del technology consensus $\pm 0,5$ Log UI/ml.

Sensibilità diagnostica: correlazione tra metodi

La sensibilità diagnostica del saggio, intesa come correlazione tra i risultati ottenuti con metodi differenti, è stata valutata in associazione a **ELITE InGenius** analizzando campioni clinici di pazienti sottoposti a terapia antivirale risultati positivi per il DNA di HBV con un titolo all'interno dell'intervallo di misurazione del prodotto HBV ELITE MBG Kit e dei metodi di riferimento di diagnostica molecolare CE IVD ("cobas® HBV for use on the 4800 Systems" e "cobas® HBV for use on the 6800 Systems", Cobas HBV, Roche Diagnostics).

Essendo che il sistema **ELITE BeGenius** ha prestazioni analitiche equivalenti al sistema ELITE InGenius, le prestazioni diagnostiche del saggio sui due strumenti sono considerate equivalenti. Di conseguenza la sensibilità diagnostica del saggio su ELITE InGenius è considerata valida anche su ELITE BeGenius.

Lo studio di correlazione è stato eseguito in tre siti differenti sui seguenti 131 campioni di plasma raccolti in EDTA:

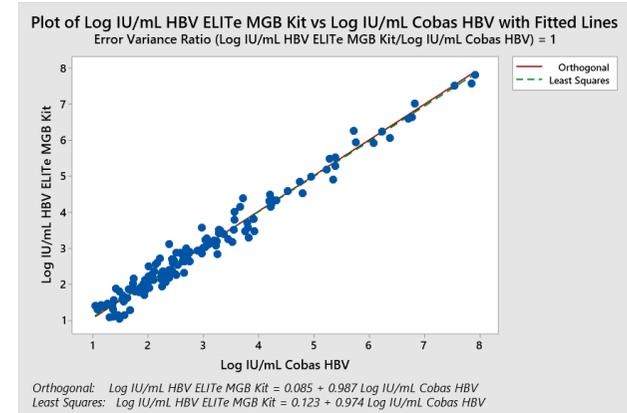
- sito 1: 93 campioni clinici di plasma raccolto in EDTA positivi per il DNA di HBV,
- sito 2: 17 campioni clinici di plasma raccolto in EDTA positivi per il DNA di HBV,
- sito 3: 22 campioni clinici di plasma raccolto in EDTA positivi per il DNA di HBV.

Ogni campione è stato testato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rilevazione e interpretazione dei risultati con i prodotti ELITEchGroup S.p.A. e con i metodi di riferimento. I risultati ottenuti con il prodotto HBV ELITE MBG Kit e con i metodi di riferimento sono stati sottoposti ad analisi di regressione lineare ed ortogonale allo scopo di calcolare la correlazione tra i metodi.

HBV ELITE MGB® Kit
reagenti per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK602ING

I risultati sono sintetizzati nelle figure sottostanti.



In questo test, l'analisi di regressione ortogonale ha generato una pendenza di 0,987 (95% IC: 0,959 – 1,1015) e un intercetta di 0,085 (95% IC: -0,009 – 0,179). La regressione lineare ha generato un R2 di 0,974.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, intesa come percentuale di concordanza tra i risultati ottenuti con metodi differenti su campioni negativi, è stata valutata in associazione a **ELITE InGenius** analizzando campioni clinici testati negativi per il DNA di HBV con metodi di riferimento di diagnostica molecolare CE IVD (Roche Diagnostics).

Essendo che il sistema **ELITE BeGenius** ha prestazioni analitiche equivalenti al sistema ELITE InGenius, le prestazioni diagnostiche del saggio sui due strumenti sono considerate equivalenti. Di conseguenza la specificità diagnostica del saggio su ELITE InGenius è considerata valida anche su ELITE BeGenius.

Lo studio di specificità diagnostica è stato eseguito in tre siti differenti sui seguenti 127 campioni di plasma raccolti in provette con EDTA:

- sito 1: 93 campioni clinici di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di HBV,
- sito 2: 13 campioni clinici di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di HBV,
- sito 3: 21 campioni clinici di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di HBV.

Ogni campione è stato testato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rilevazione e interpretazione dei risultati con i prodotti ELITEchGroup S.p.A. I risultati ottenuti con il prodotto HBV ELITE MBG Kit e con il metodo di riferimento sono stati analizzati allo scopo di calcolare la percentuale di concordanza su campioni negativi.

I risultati, dopo l'analisi dei discrepanti, sono riepilogati nella tabella seguente.

Campioni	N	positivo	negativo	non valido	Specificità diagnostica
Campioni HBV DNA-negativi di plasma raccolto in provette con EDTA	127	3	124	0	97,6%

In questo test, 124 campioni si sono confermati negativi. Tre campioni hanno dato un risultato discordante positivo con un titolo più basso dell'LoD del prodotto HBV ELITE MBG Kit e del metodo di riferimento. Questi campioni presentano un titolo così basso da generare casualmente esiti positivi. La specificità diagnostica del prodotto HBV ELITE MBG Kit è stata pari al 97,6%.

Nota: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche prestazionali del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati al cap. 7 del Fascicolo Tecnico di Prodotto di "HBV ELITE MGB® Kit", FTP 602ING.

BIBLIOGRAFIA

S. Velkov et al. (2018) *Genes*. 9: 495.
D. N. Clark et al. (2017) *J. of Virology*. 91: e01785-16.
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITI DELLA PROCEDURA

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

Il plasma raccolto in EDTA o ACD e il siero possono essere ottenuti da sangue intero conservato a +2 / +25 °C per non più di 24 ore.

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

Al momento non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con altri campioni clinici come sangue intero.

Questo prodotto non deve essere utilizzato come test di screening per la presenza di HBV nel sangue o negli emoderivati né come test diagnostico per confermare la presenza di un'infezione da HBV.

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

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

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

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

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

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

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il DNA non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione, ma non si può escludere che il DNA target abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (vedi "Caratteristiche prestazionali"). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

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

Possibili polimorfismi, inserimenti o rimozioni nella regione del DNA target coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione e la quantificazione del DNA target.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati 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

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

Reazione del Negative Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione del PCR Mix e del controllo negativo. Controllare i volumi del PCR Mix e del controllo negativo.
Contaminazione del controllo negativo.	Non utilizzare il controllo negativo per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione del PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota del PCR Mix.
Contaminazione dell'area di estrazione, del 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.

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

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

Errore TH, errore SDM, errore Ct	
Possibili cause	Soluzioni
Campione con anomala forma del plot.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa che genera un errore: - ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR) oppure - ripetere l'estrazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione primario in una sessione in modalità "Extract + PCR" (estratto + PCR).

LEGENDA DEI SIMBOLI

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

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

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

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

La tecnologia ELITE InGenius® e ELITE BeGenius® è coperta da brevetti o è oggetto di domande di brevetto.

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

Cobas® è un marchio registrato di Roche Diagnostics. ELITE MGB®, il logo ELITE MGB® ELITE InGenius® ed ELITE BeGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup all'interno dell'Unione Europea.



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

Intended use

The HBV ELITe MGB® Kit is a nucleic acid amplification assay for the detection and the quantification of Hepatitis B Virus (HBV) DNA extracted from clinical specimens.

The assay is able to detect the DNA of HBV belonging to genotypes A, B, C, D, E, F, G, H, I and RF.

The assay is validated in association with “ELITe InGenius®” and “ELITe BeGenius®” systems starting from human plasma collected in EDTA or in ACD and serum samples.

The product is intended for use as an aid in managing of HBV-infected individuals undergoing antiviral therapy. The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observations and laboratory results.

This product is not intended for use as a screening test for the presence of HBV in blood or blood products or as a diagnostic test to confirm the presence of HBV infection.

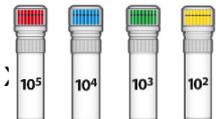
Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target	HBV polymerase gene (P gene)	FAM	HBV
Internal Control	IC2	AP525	IC

Validated matrix

- › Plasma EDTA or Plasma ACD
- › Serum

Kit content

HBV ELITe MGB Mix	HBV ELITe Standard	HBV Internal Control	HBV - ELITe Positive Control
 X 8		 X 8	 X 2
Ready-to-use PCR Mix 8 tubes of 280 µL 96 reactions per kit 7 freeze-thaw cycles	Ready-to-use 4 levels: 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 1 set of 4 tubes of 160 µL 2 freeze-thaw cycles	Ready-to-use IC 8 tubes of 160 µL 96 reactions per kit 12 freeze-thaw cycles	Ready-to-use PC 2 tubes of 160 µL 8 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles

Maximum shelf-life: **24 months**

Storage Temperature: **-20 °C**

Material required not provided in the kit

- › ELITe InGenius instrument: INT030
- › ELITe InGenius SP 200 Extraction Cartridge: INT032SP200
- › ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR
- › ELITe InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS
- › ELITe InGenius Waste Box: F2102-000
- › Filter Tips 300: TF-350-L-R-S
- › 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118

ELITe InGenius and ELITe BeGenius protocol

› Sample volume	200 µL	› Unit of quantitative result	International Unit: IU/mL
› HBV CPE volume	10 µL	› Conversion factor to IU	0.24 IU/copy
› Total elution volume	50 µL	› Frequency of controls	15 days
› PCR elution input volume	20 µL	› Frequency of calibration	60 days
› HBV PCR Mix volume	20 µL		

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performance

Matrix	Limit of Detection	Method Correlation	Diagnostic Specificity
Plasma / Serum	9 IU / mL 38 copies / mL	R² = 0.974 131 quantified samples	97.6% 124 confirmed samples / 127 tested samples

reference methods:

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

“cobas® HBV for use on the 6800 Systems”, Roche Diagnostics.

Sample preparation

Plasma samples collected in EDTA or ACD and Serum samples must be identified according to laboratory guidelines, transported and stored at room temperature (~+25 °C) for a maximum of three days or at +2 / +8 °C for a maximum of five days. Otherwise, they must be frozen and stored at ~-20 °C for a maximum of one month or at ~-70 °C for six months. Do not use Plasma collected in heparin in order to prevent inhibition of amplification reaction and frequent invalid results.

ELITE InGenius Procedures

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

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "50 µL"	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay protocol" of interest: HBV ELITE_PL_200_50, HBV ELITE_Se_200_50	5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Extraction Tube	6. Load the PCR Mix and the Internal Control in the inventory block
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the method "PCR only" and set the sample position "Elution Tube"	6. Load the PCR Mix in the inventory block
7. Load: PCR cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

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

ELiTe BeGenius Procedures

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

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extraction and PCR»



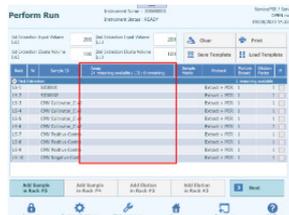
2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active



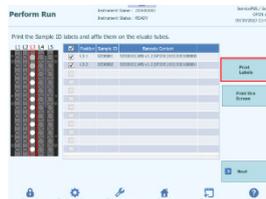
3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "50 µL"



4. Select the "Assay protocol" of interest



5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area



6. Load the PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area



Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4

7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack



8. Close the door. Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

<p>1. Select “Perform Run” on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»</p>	<p>2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area</p>	<p>3. Select the “Assay protocol” of interest</p>
<p>4. Load the PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area Load filter tips and the PCR rack</p>	<p>5. Close the door. Start the run</p>	<p>6. View, approve and store the results</p>

Procedure 3 - Extraction only

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