

Istruzioni per l'uso

HSV1 ELITe MGB® Kit

reagenti per la Real-Time PCR del DNA



REF RTS031PLD

UDI 08033891483586

CE IVD
0123

CRONOLOGIA REVISIONI

Rev.	Avviso di modifica	Data (gg/mm/aa)
22-R	Miglioramento nella descrizione delle informazioni relative ai risultati dei test LoD. Aggiornamento del paragrafo "Altri prodotti richiesti". Aggiornamento del paragrafo "Avviso per gli utilizzatori"	13/02/26
21-R	<p>Aggiornamento per la conformità ai requisiti del Regolamento (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVDR). Incremento delle prestazioni analitiche e diagnostiche nel paragrafo CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI Aggiornamento dell'uso previsto:</p> <ul style="list-style-type: none"> Validazione dei prodotti in associazione con gli strumenti ELITE InGenius (cod. INT030) ed ELITE BeGenius (cod. INT040) con matrici sangue intero, plasma e liquido cerebrospinale (CSF). Validazione dei prodotti in combinazione con la matrice di sangue intero e i seguenti strumenti: ELITE GALAXY e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR <p style="text-align: center;">NOTA</p> <p>La composizione del prodotto rimane invariata</p> <p>Nuova grafica e impostazione del contenuto delle Istruzioni per l'uso (IFU).</p>	10/03/25
20	Aggiornamento relativo all'uso del prodotto per la matrice del liquido cerebrospinale in combinazione con ELITE BeGenius (cod. INT040) Valori LoD e ULoQ/LLoQ confermati, calcolati sulla matrice del liquido cerebrospinale	29/09/22
19	<p>Aggiornamento per l'uso del prodotto in associazione con lo strumento ELITE BeGenius (cod. INT040) Aggiornamento del paragrafo CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI (pag.21):</p> <ul style="list-style-type: none"> Modifica del Limite di rilevabilità (LoD) Variazione dell'intervallo di misurazione lineare Aggiunta della Ripetibilità Aggiunta della Riproducibilità 	21/12/21
18	Aggiunta del riferimento al nuovo prodotto "HSV1 – ELITE Positive Control RF" (cod. CTR031PLD-R). Correzione dei risultati della tabella dell'intervallo di linearità ottenuti in combinazione con il sistema Cobas z480 (Roche).	18/12/20
17	Estensione dell'utilizzo del prodotto in associazione con la piattaforma Roche Cobas z 480 Analyzer.	12/09/19
16	Il numero di provette e il volume del Positive Control (cod. CTR031PLD) sono stati modificati: da 4 x 65 µL a 2 x 160 µL.	28/02/18
00 — 15	Sviluppo di nuovo prodotto e successive modifiche	-

NOTA

I lotti di prodotti identificati dai seguenti numeri di LOTTO continuano ad essere presenti sul mercato in conformità alla Direttiva IVDD fino alla rispettiva scadenza posticipata, ai sensi dell'articolo 110 del Regolamento IVDR. Se si è in possesso di tali lotti di prodotto, si prega di contattare il personale di ELITechGroup per richiedere la revisione precedente delle IFU corrispondenti.

<u>COD. PRODOTTO</u>	<u>Numero di lotto</u>	<u>Data di scadenza</u>
RTS031PLD	U0624-017	31/05/2026
RTS031PLD	U0125-105	31/12/2026

Il prodotto Positive Control e i lotti di prodotto Standard attualmente immessi sul mercato ai sensi della Direttiva IVDD (identificati dai numeri di LOTTO indicati nelle istruzioni per l'uso del Positive Control e nelle istruzioni per l'uso del prodotto Standard) sono tecnicamente compatibili con la nuova versione del kit di amplificazione e possono essere utilizzati, fino a esaurimento, in associazione con la nuova versione dell'IVDR del kit di amplificazione e in conformità al suo uso previsto.

INDICE

1 USO PREVISTO	5
2 PRINCIPIO DEL SAGGIO.....	5
3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	5
4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	6
5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO	6
6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	6
7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI	7
8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius	9
9 PROCEDURA ELITe InGenius.....	12
10 PROCEDURA ELITe BeGenius.....	20
11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius ed ELITe BeGenius.....	25
12 CAMPIONI E CONTROLLI per ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument	36
13 PROCEDURA per ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.....	37
14 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.....	42
15 BIBLIOGRAFIA	44
16 LIMITI DELLA PROCEDURA	44
17 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI.....	45
18 LEGENDA DEI SIMBOLI	49
19 AVVISO PER L'UTILIZZATORE	50
20 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA.....	50
Appendix A QUICK START GUIDE.....	52
Appendix B QUICK START GUIDE.....	57

1 USO PREVISTO

Il prodotto **HSV1 ELITE MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico *in vitro* destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come saggio di Real Time PCR quantitativa degli acidi nucleici per la **rilevazione e la quantificazione del DNA del virus dell'Herpes Simplex tipo 1 (HSV1)**, estratto da campioni clinici.

Il saggio è stato validato in associazione con gli strumenti **ELITE InGenius®** ed **ELITE BeGenius®**, che sono sistemi automatizzati e integrati per l'estrazione, la Real Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni umani di liquido cerebrospinale (CSF), sangue intero raccolto in EDTA e plasma raccolto in EDTA.

Infine il saggio è stato validato in associazione con il sistema automatico di estrazione e configurazione della PCR denominato **ELITE GALAXY** e con la piattaforma di Real Time PCR denominata **ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, utilizzando campioni umani di sangue intero raccolto in EDTA.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio delle infezioni da HSV1 in pazienti con sospetta infezione o sottoposti a monitoraggio per infezioni da HSV1.

I risultati devono essere interpretati in combinazione con tutte le osservazioni cliniche e i risultati di laboratorio pertinenti.

2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è un test di Real Time PCR quantitativo per la rilevazione del DNA dell'HSV1 isolato da campioni clinici amplificati utilizzando il reagente del saggio **HSV1 Q - PCR Mix**, che contiene i primer e le sonde con tecnologia ELITE MGB®.

Le sonde ELITE MGB sono attivate quando ibridano con il prodotto specifico della PCR. **ELITE InGenius** ELITE InGenius ed **ELITE BeGenius** monitorano l'incremento di fluorescenza emessa e calcolano i "cicli soglia" (Ct) e le temperature di melting (Tm). La concentrazione di HSV1 è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

La piattaforma **ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** misura e registra l'incremento di emissione di fluorescenza. La successiva elaborazione dei dati consente la rilevazione e la quantificazione dell'HSV1 nel campione primario.

Nelle sonde ELITE MGB i fluorofori non emettono segnale quando la sonda non ibrida con il prodotto di reazione specifico. Quando la sonda ibrida con il prodotto specifico di amplificazione, il quencher viene separato dal fluoroforo ed emette il segnale di fluorescenza. Da notare che la sonda non viene idrolizzata durante la PCR e può essere utilizzata per l'analisi di dissociazione e il calcolo della temperatura di melting.

3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il **HSV1 ELITE MGB Kit** include il reagente del saggio **HSV1 Q-PCR Mix**, una miscela per PCR ottimizzata e stabilizzata che contiene primer e sonde specifici per:

- una regione della **glicoproteina D (gpD)** dell'HSV1, rilevata nel Canale **HSV1**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher® e marcata con fluoroforo FAM.
- Internal Control, specifico per la **regione del promotore e della 5' UTR del gene della beta-globina umana**, rilevato nel canale **IC**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 525 (AP525).

La **HSV1 Q-PCR Mix** contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfati, il fluoroforo AP593 (utilizzato al posto di ROX o Cy5) come riferimento passivo per la normalizzazione della fluorescenza), l'enzima Uracile N-glicosidasi (UNG) per inattivare la contaminazione da prodotto di amplificazione, e l'enzima DNA polimerasi ad attivazione termica ("hot start"). Il prodotto **HSV1 ELITE MGB Kit** contiene reagenti sufficienti per eseguire **96 test** su **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius utilizzando 20 µL** per reazione.

Il prodotto **HSV1 ELITE MGB Kit** contiene reagenti sufficienti per **100 test su altri sistemi**, utilizzando **20 µL** per reazione.

NOTA

È necessario un fattore di conversione per esprimere i risultati dell'analisi quantitativa in Unità Internazionali (IU) di HSV1, in conformità al "1 Standard Internazionale dell'OMS per il DNA del virus HSV1 (NIBSC cod. 14/368, Regno Unito).

4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Tabella 1

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
HSV1 Q-PCR Mix cod. RTS031PLD	Miscela di reagenti per Real Time PCR in provetta con tappo NEUTRO	4 x 540 µL	-

5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o materiale analogo.
- Agitatore vortex.
- Centrifuga da banco (~5.000 giri/minuto).
- Microcentrifuga da banco (~13,000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a spostamento positivo (intervallo di volume: 0,5-1000 µL).
- Provette sterili da 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt, Germania, rif. 72.694.005).
- Provette sterili da 0,5 mL con tappo a vite (Sarstedt, Germania, cod. 72.730.005).
- Acqua per biologia molecolare.

6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA del campione, il controllo interno di estrazione e inibizione, i controlli positivi e negativi di amplificazione, gli standard di DNA e i materiali di consumo **non sono** inclusi in questo prodotto.

Per l'estrazione degli acidi nucleici, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati dei campioni, sono richiesti i seguenti prodotti:

Tabella 2

Strumenti e software	Prodotti e reagenti
<p>ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA cod. INT030)</p> <p>ELITe InGenius Software versione 1.3.0.19 (o successiva)</p> <p>HSV1 ELITe STD, Assay Protocol con parametri per l'analisi dei Calibratori</p> <p>HSV1 ELITe PC, Assay Protocol con parametri per l'analisi del Positive Control</p> <p>HSV1 ELITe NC, Assay Protocol con parametri per l'analisi del Negative Control</p> <p>HSV1 ELITe WB_200_100, Assay Protocol con parametri per l'analisi dei campioni di sangue intero</p> <p>HSV1 ELITe PL_200_100, Assay Protocols con parametri per l'analisi dei campioni di plasma</p> <p>HSV1 ELITe CSF_200_100, Assay Protocols con parametri per l'analisi dei campioni di CSF</p>	<p>HSV1 - ELITe Standard (EG SpA, cod. STD031PLD)</p> <p>HSV1 - ELITe Positive Control (EG SpA, cod. CTR031PLD)</p> <p>ELITe InGenius SP200 (EG SpA, cod. INT032SP200)</p> <p>CPE - Internal Control (EG SpA, cod. CTCPE)</p> <p>ELITe InGenius ed ELITe BeGenius Consumable Set (vedere le Istruzioni per l'uso di ELITe InGenius ed ELITe BeGenius)</p> <p>ELITe GALAXY Consumable Set (vedere le istruzioni per l'uso di ELITe GALAXY)</p> <p>MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (Life Technologies, cod. 4346906), micropiastre con pozzetti da 0,1 mL e fogli sigillanti adesivi per l'amplificazione Real Time</p>
<p>ELITe BeGenius (EG SpA cod. INT040)</p> <p>ELITe BeGenius Software versione 2.3.0 (o successiva)</p> <p>HSV1 ELITe Be STD, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei Calibratori</p> <p>HSV1 ELITe Be PC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Positive Control</p> <p>HSV1 ELITe Be NC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Negative Control</p> <p>HSV1 ELITe Be WB_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di sangue intero</p> <p>HSV1 ELITe Be PL_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di plasma</p> <p>HSV1 ELITe Be CSF_200_100, Assay Protocols con parametri per l'analisi dei campioni di CSF</p>	
<p>ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, cod. 4406985)</p> <p>ELITe GALAXY (EG SpA, cod. INT020) con versione software 1.3.1 (o successiva).</p> <p>Extraction Protocol per ELITe GALAXY, xNA Extraction (Universale)</p>	

7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Questo prodotto è riservato esclusivamente all'uso in vitro.

7.1 Avvertenze e precauzioni generali

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

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

- Indossare indumenti protettivi e guanti adatti a proteggersi gli occhi e il viso.
- Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.

- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree di lavoro.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.
- Eliminare i reagenti avanzati e i rifiuti secondo le norme vigenti.
- Prima di eseguire il saggio, leggere attentamente tutte le istruzioni.
- Durante l'esecuzione del saggio attenersi alle istruzioni fornite con il prodotto.
- Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.
- Utilizzare solo i reagenti in dotazione con il prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.
- Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

7.2 Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

Non spostare mai i camici, guanti o strumenti da laboratorio dall'area designata per l'amplificazione/rilevazione dei prodotti della reazione di amplificazione all'area designata per l'estrazione/preparazione delle reazioni di amplificazione.

Quando la sessione di amplificazione deve essere eseguita con lo strumento 7500 Fast Dx Real Time PCR, è necessario disporre di aree separate per l'estrazione/preparazione delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione/rilevazione dei prodotti di amplificazione. Non introdurre mai un prodotto della reazione di amplificazione nell'area designata per l'estrazione/preparazione delle reazioni 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.

I prodotti per l'estrazione devono essere manipolati in modo da impedirne la dispersione nell'ambiente ed evitare la contaminazione dell'area di lavoro dello strumento.

La cassetta per la PCR deve essere maneggiata con cura e non deve mai essere aperta per evitare la diffusione dei prodotti della PCR e la contaminazione da trasferimento.

7.3 Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Tabella 3

Componente	Temperatura di conservazione	Uso dopo la prima apertura	Cicli di congelamento/scongelo	Stabilità sullo strumento (ELITe InGenius ed ELITe BeGenius)
HSV1 Q-PCR Mix	-20 °C o inferiore (al riparo dalla luce)	Un mese	Fino a cinque	Fino a cinque sessioni indipendenti* di tre ore ciascuna oppure fino a 7 ore consecutive (2 sessioni di 3 ore ciascuna e il tempo necessario per iniziare la terza sessione)

* con congelamento intermedio.

8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITE InGenius ed ELITE BeGenius

8.1 Campioni

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

Tabella 4

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto/conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
Sangue intero	EDTA	≤1 d	≤3 d	≤30 d	≤30 d
Plasma	EDTA	≤1 d	≤3 d	≤30 d	≤30 d
CSF	-	≤4 ore	≤4 ore	≤30 gg	≤30 gg

EDTA, acido etilendiamminotetraacetico; d, giorno.

Anche se sono possibili periodi di conservazione più lunghi a -70 °C, come ampiamente riportato dalla letteratura scientifica, la loro applicazione dovrebbe essere valutata internamente dagli utilizzatori finali di questo prodotto.

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

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

Tabella 5

Campione	Strumento	Nome Assay Protocol	Report	Caratteristiche
Sangue intero in EDTA	ELITE InGenius	HSV1 ELITE_WB_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITE BeGenius	HSV1 ELITE_Be_WB_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
Plasma in EDTA	ELITE InGenius	HSV1 ELITE_PL_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITE BeGenius	HSV1 ELITE_Be_PL_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
CSF	ELITE InGenius	HSV1 ELITE_CSF_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITE BeGenius	HSV1 ELITE_Be_CSF_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL

IU - International Units: Unità Internazionali dell'OMS.

NOTA

Verificare se la provetta primaria e il volume del campione sono compatibili con ELITE InGenius o ELITE BeGenius, attenendosi alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione **ELITE InGenius SP200** (EG SpA, rif. INT032SP200)

Il volume del campione in una provetta primaria varia secondo il tipo di provetta caricata. Consultare le istruzioni per l'uso del kit di estrazione per maggiori informazioni sulla preparazione e l'esecuzione della procedura di estrazione.

Se richiesto, si devono trasferire 200 µL di campione in un Extraction tube (per ELITE InGenius) o in una provetta Sarstedt da 2 mL (per ELITE BeGenius).

NOTA

Il trasferimento dei campioni nell'**Extraction tube** o nella **provetta Sarstedt da 2 mL** potrebbe **generare contaminazione**. Utilizzare le pipette appropriate e seguire tutte le raccomandazioni contenute nella sezione "7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI pagina 7".

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

Per controllare i dati relativi alle sostanze interferenti, fare riferimento a "Sostanze potenzialmente interferenti" nella sezione **11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius ed ELITE BeGenius pagina 25**.

NOTA

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

8.2 Calibratori e controlli per PCR

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

- Per la curva di calibrazione, usare i quattro livelli del prodotto **HSV1 ELITE Standard** (non fornito con questo kit) con gli Assay Protocol **HSV1 ELITE_STD** o **HSV1 ELITE_Be_STD**.

NOTA

La concentrazione dei quattro prodotti Q – PCR Standard è espressa in copie/reazione (10^5 copie/reaz., 10^4 copie/reaz., 10^3 copie/reaz., 10^2 copie/reaz.). Fare riferimento a "Incertezza della curva standard" nella sezione **11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius ed ELITE BeGenius pagina 25**

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

- come controllo positivo, usare il prodotto **HSV1 - ELITE Positive Control** (non fornito in questo kit) con gli Assay Protocol **HSV1 ELITE_PC** o **HSV1 ELITE_Be_PC**.
- come controllo negativo, usare acqua per biologia molecolare (non fornita in questo kit) con gli Assay Protocol **HSV1 ELITE_NC** o **HSV1 ELITE_Be_NC**.

NOTA

Gli strumenti **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** consentono di generare e memorizzare la curva di calibrazione e la convalida dei controlli della PCR per ogni lotto di reagente per PCR.

Le curve di calibrazione scadono dopo **60 giorni**; trascorso questo termine, è necessario ripetere la calibrazione.

I risultati dei controlli per PCR scadono dopo **15 giorni**; trascorso questo termine, è necessario rianalizzare i controlli positivo e negativo.

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

- si utilizza un nuovo lotto di reagenti;
- i risultati delle analisi di controllo della qualità (vedere paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche;

- lo strumento **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius** viene sottoposto a un importante intervento di manutenzione o assistenza.

8.3 Controlli di qualità

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

9 PROCEDURA ELITE InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **HSV1 ELITE MGB Kit** con lo strumento **ELITE InGenius** si articola in due fasi:

Tabella 6

FASE 1	Verifica che il sistema sia pronto	
FASE 2	Impostazione della sessione	A) Corsa dei campioni (Extract + PCR)
		B) Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
		C) Corsa di Calibrazione (PCR Only)
		D) Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	1) Validazione della curva di calibrazione
		2) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		3) Validazione dei risultati del campione
		4) Refertazione dei risultati del campione

9.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

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

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

9.2 STEP 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **HSV1 ELITE MGB Kit** può essere utilizzato su **ELITE InGenius** per eseguire:

- Corsa dei campioni (Extract + PCR)
- Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
- Sessione di calibrazione (PCR Only)
- Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR only)

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi negli Assay Protocol disponibili sullo strumento e vengono richiamati automaticamente nel momento in cui li si seleziona.

NOTA

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

Prima di impostare una sessione:

Scongelare le provette di **PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test**. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo.

NOTA

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

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

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
1	<p>Identificare i campioni e, ne necessario, scongelare a temperatura ambiente, agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere su ghiaccio o un blocco freddo. Se richiesto, trasferire 200 µL di campione in un Extraction tube precedentemente etichettato.</p> <p>Scongelare le provette contenenti CPE necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerle su ghiaccio o un blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni.</p>	<p>Scongelare a temperatura ambiente la provetta di eluizione contenente gli acidi nucleici estratti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo.</p>
2	Nella schermata "Home", selezionare " Perform Run ".	Nella schermata "Home", selezionare " Perform Run ".
3	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.
4	Per ogni campione, assegnare un "Track" e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un "Track" e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
5	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare l' Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").
6	Verificare che il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" (protocollo) selezionare "PCR Only".
7	Nella colonna "Sample Position" selezionare "Primary tube" o "Extraction tube" come posizione da cui caricare il campione. Verificare che " Dilution factor " sia "1".	Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)". Verificare che " Dilution factor " sia "1".
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Caricare il CPE e la PCR Mix nell'"Inventory Block" (area reagenti) facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto di CPE e PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.	Caricare la PCR Mix nell'"Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
11	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i rack dei puntali se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i rack dei puntali se necessario.
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	Caricare la PCR Cassette, le cartucce per estrazione ELITe InGenius SP 200 e tutti i materiali di consumo richiesti e i campioni da estrarre.	Caricare la PCR Cassette e le provette di eluizione con i campioni estratti.
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
15	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
16	Premere "Start".	Premere "Start".

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	Scongelare le provette di Q-PCR Standard necessarie (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo.	Scongelare le provette di controllo positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo. Preparare il controllo negativo trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in una provetta di eluizione, fornita in dotazione con l'ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".
3	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.
4	Per il Q-PCR Standard, assegnare il "Track", selezionare l'Assay Protocol (vedere "Campioni e controlli") nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto reagente e la data di scadenza.	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli"). Inserire il numero di lotto e la data di scadenza del controllo positivo e dell'acqua per biologia molecolare.
5	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) sia selezionato "PCR Only".	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) sia selezionato "PCR Only".
6	Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)".	Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)".
7	Caricare la PCR Mix nell'"Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.	Caricare la PCR Mix nell'"Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i rack se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i rack se necessario.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Caricare la PCR Cassette e le provette di Q-PCR Standard.	Caricare la PCR Cassette, il Positive Control e il Negative Control.
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
14	Premere "Start".	Premere "Start".

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

NOTA

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

NOTA

Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento la **PCR Mix** tapparla e conservarla a -20 °C o temperatura inferiore oppure conservarla a bordo nel blocco freddo per un massimo di 7 ore (per 2 sessioni di 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione); mescolare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

NOTA

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

NOTA

Il **Q-PCR Standard** può essere utilizzato per 4 sessioni indipendenti da 2 ore ciascuna.

NOTA

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

NOTA

Il **Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni indipendenti da 3 ore ciascuna.

NOTA

Alla fine della sessione, smaltire la **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo secondo le disposizioni legali e ambientali vigenti. Evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

9.3 FASE 3 - Esame e approvazione dei risultati

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

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

NOTA

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

Lo strumento **ELITE InGenius** utilizza il prodotto **HSV1 ELITE MGB Kit** per generare risultati tramite la seguente procedura:

1. Validazione della curva di calibrazione
2. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
3. Validazione dei risultati ottenuti sul campione
4. Refertazione dei risultati del campione

9.3.1 Validazione della curva di calibrazione

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

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

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

NOTA

se la curva di calibrazione non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Calibration" appare il messaggio "Failed". In questo caso, i risultati non possono essere approvati e si devono ripetere le reazioni di amplificazione del calibratore. Inoltre, se inclusi nella sessione, i campioni non vengono quantificati e devono essere ripetuti per generare risultati quantitativi.

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

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

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

I risultati del Positive Control e del Negative Control scadono **dopo 15 giorni**.

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

NOTA

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

NOTA

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

9.3.3 Validazione dei risultati dei campioni

Il programma con **ELITE InGenius Software** interpreta i risultati della PCR per il target (canale **HSV1**) e per l'Internal Control (canale **IC**) con i parametri degli Assay Protocol **HSV1 ELITE_PL_200_100** o **HSV1 ELITE-CSF_200_100**. I valori di Ct target risultanti vengono convertiti in concentrazione.

I risultati sono mostrati sulla schermata "Results Display".

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

1) Curva di calibrazione	Stato
HSV1 Q-PCR Standard	APPROVATO
2) Controllo positivo	Stato
HSV1 Positive Control	APPROVATO
3) Controllo negativo	Stato
HSV1 Negative Control	APPROVATO

I risultati del campione vengono interpretati automaticamente dall'**ELITE InGenius Software** utilizzando i parametri dell'Assay Protocol.

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

Per ogni campione il sistema indica una combinazione dei seguenti messaggi specificando se sono stati rilevati i DNA dei patogeni.

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
HSV1:DNA Detected, quantity equal to XXXcopies/mL or IU/mL (HSV1:DNA rilevato, quantità pari a XXXcopie/mL o UI/ml)	Il DNA dell'HSV1 è stato rilevato nel campione entro l'intervallo di misurazione del saggio, alla concentrazione indicata.
HSV1:DNA Detected, quantity below LLoQcopies/mL or IU/mL (HSV1:DNA rilevato, quantità inferiore LLoQcopie/ml o UI/ml)	Il DNA dell'HSV1 è stato rilevato nel campione, al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) del saggio.
HSV1:DNA Detected, quantity beyond ULoQcopies/mL or IU/mL (HSV1:DNA rilevato, quantità oltre ULoQcopie/ml o UI/ml)	Il DNA dell'HSV1 è stato rilevato nel campione, la sua concentrazione è al di sopra del limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio.
HSV1:DNA Not detected or below LoDcopies/mL or IU/mL (HSV1:DNA non rilevato o inferiore LoDcopie/ml o UI/ml)	Il DNA dell'HSV1 non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per il DNA dell'HSV1 target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevabilità (LoD) del saggio.
Invalid - Retest Sample (Non valido - Ripetere test campione)	Risultato del saggio non valido per un errore del controllo interno (ad es. dovuto a errata estrazione o effetto carryover degli inibitori). Il test deve essere ripetuto.

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

Se ne rimane un volume sufficiente, l'eluato può essere rianalizzato (tal quale oppure diluito) mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only". In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere nuovamente analizzato partendo dall'estrazione di un nuovo campione in modalità "Extract + PCR" (vedere [17 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 45](#)).

I campioni segnalati come "HSV1:DNA Not detected or below LoDcopies/mL or IU/mL" (HSV1:DNA non rilevato o inferiore LoDcopie/ml o IU/ml) sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare l'HSV1. In questo caso, il campione può essere negativo per il DNA dell'HSV1 oppure il DNA dell'HSV1 è presente in una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedere [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius ed ELITE BeGenius pagina 25](#)).

I campioni positivi per il DNA dell'HSV1 a una concentrazione minore del limite di rilevabilità (e del limite di quantificazione inferiore) del saggio, se rilevati, vengono segnalati come "HSV1:DNA Detected, quantity below LLoQcopies/mL or IU/mL" (HSV1:DNA rilevato, quantità inferiore LLoQcopie/ml o UI/ml) (vedere [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius ed ELITE BeGenius pagina 25](#)).

I campioni positivi per il DNA dell'HSV1 che rientrano nell'intervallo di misurazione lineare vengono rilevati e segnalati come "HSV1:DNA Detected, quantity equal to XXXcopies/mL or IU/mL" (HSV1:DNA rilevato, quantità pari a XXXcopie/mL o UI/ml) (vedere [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius ed ELITE BeGenius pagina 25](#)).

I campioni positivi per il DNA dell'HSV1 che sono in quantità maggiore del limite superiore di quantificazione sono segnalati come "HSV1:DNA Detected, quantity beyond ULoQcopies/mL or IU/mL" (HSV1:DNA rilevato, quantità oltre ULoQcopie/ml o UI/ml) (vedere [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius ed ELITE BeGenius pagina 25](#)) e non sono idonei per la quantificazione. Se necessario, il campione può essere diluito prima dell'estrazione o della PCR e analizzato nuovamente per ottenere risultati che rientrino nell'intervallo di misurazione lineare del saggio.

NOTA

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

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

9.3.4 Refertazione dei risultati dei campioni

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

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

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

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

10 PROCEDURA ELITe BeGenius

La procedura per l'uso del prodotto **HSV1 ELITe MGB Kit** con lo strumento **ELITe BeGenius** si articola in due fasi:

Tabella 7

FASE 1	Verifica che il sistema sia pronto	
FASE 2	Impostazione della sessione	A) Corsa dei campioni (Extract + PCR)
		B) Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
		C) Corsa di Calibrazione (PCR Only)
		D) Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	1) Validazione della curva di calibrazione
		2) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		3) Validazione dei risultati del campione
		4) Refertazione dei risultati del campione

10.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

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

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

10.2 STEP 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **HSV1 ELITe MGB Kit** può essere utilizzato su **ELITe BeGenius** per eseguire:

- Corsa dei campioni (Extract + PCR)
- Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
- Sessione di calibrazione (PCR Only)
- Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR only)

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

NOTA

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

Prima di impostare una sessione:

Scongelare le provette di **PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test**. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo.

NOTA

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

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

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
1	<p>Identificare i campioni e, ne necessario, scongelare a temperatura ambiente, agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere su ghiaccio o un blocco freddo. Se richiesto, trasferire 200 µL di campione in una provetta Sarstedt da 2 mL precedentemente etichettata.</p> <p>Scongelare le provette contenenti CPE necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerle su ghiaccio o un blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni.</p>	<p>Scongelare a temperatura ambiente la provetta di eluizione contenente gli acidi nucleici estratti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo.</p>
2	Nella schermata "Home", selezionare " Perform Run ".	Nella schermata "Home", selezionare " Perform Run ".
3	Rimuovere tutti i Rack dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "run mode": "Extract + PCR".	Selezionare il "run mode": "PCR Only".
5	Caricare i campioni nel "Sample Rack". (Nota: quando si caricano provette secondarie "2 mL Tubes", utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack").	Caricare i campioni nell'"Elution Rack".
6	Inserire il " Sample Rack " nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 5" (L5). Se necessario, inserire il "Sample ID" (SID) per ogni "Position" utilizzata. (Se si caricano provette secondarie, contrassegnare con "2 mL Tube". Se le provette secondarie non hanno codice a barre, digitare manualmente il "Sample ID").	<p>Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3).</p> <p>Se necessario, per ogni "Position" inserire il "Sample ID", la "Sample matrix", l'"Extraction kit" e l'"Extracted eluate vol." (volume eluato).</p>
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Non applicabile
9	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.	Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.
12	Caricare le "Elution tubes" nell'"Elution Rack" (le provette di eluizione possono essere etichettate con il codice a barre per migliorarne la tracciabilità).	Non applicabile
13	Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura utilizzando la "Lane 2" (L2).	Non applicabile
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
15	Caricare il CPE e la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".
16	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix e/o CPE, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).
17	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
18	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i rack se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i rack se necessario.
19	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
20	Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" nell'Inventory Area.	Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" nell'Inventory Area.
21	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
22	Caricare l'"Extraction Rack" con le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200" e i materiali di consumo per l'estrazione richiesti.	Non applicabile
23	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
24	Premere "Start".	Premere "Start".

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	Scongelare le provette di Q-PCR Standard necessarie (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo.	Scongelare le provette di controllo positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo. Preparare il controllo negativo trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in una provetta di eluizione, fornita in dotazione con l'ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".
3	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizzionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizzionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "run mode": PCR Only".	Selezionare il "run mode": "PCR Only".
5	Caricare le provette di Q-PCR Standard nell'"Elution Rack".	Caricare le provette di controllo positivo e controllo negativo nell'"Elution Rack".
6	Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" inserire "Reagent name" e "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).	Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" inserire "Reagent name" e "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Nella colonna "Assay" selezionare l' Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare l' Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").
9	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
10	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".
11	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2). Se necessario, per ogni PCR Mix, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 2" (L2). Se necessario, per ogni PCR Mix, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" (area reagenti) e sostituire i rack se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" (area reagenti) e sostituire i rack se necessario.
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
15	Caricare il "PCR Rack" con la " PCR Cassette " nell'"Inventory Area".	Caricare il "PCR Rack" con la " PCR Cassette " nell'"Inventory Area".
16	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
17	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
18	Premere "Start".	Premere "Start".

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

NOTA

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

NOTA

Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento la **PCR Mix** tapparla e conservarla a -20 °C o temperatura inferiore oppure conservarla a bordo nel blocco freddo per un massimo di 7 ore (per 2 sessioni di 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione); mescolare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

NOTA

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

NOTA

Il **Q-PCR Standard** può essere utilizzato per 4 sessioni indipendenti da 2 ore ciascuna.

NOTA

Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il **Positive Control** residuo, tapparlo e conservarlo a -20 °C o a temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita del **Positive Control**. Smaltire il **Negative Control** residuo.

NOTA

Il **Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni indipendenti da 3 ore ciascuna.

NOTA

Alla fine della sessione, smaltire la **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo secondo le disposizioni legali e ambientali vigenti. Evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

10.3 FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

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

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

NOTA

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

ELITe BeGenius utilizza il prodotto **HSV1 ELITe MGB Kit** per generare i risultati tramite la seguente procedura:

1. Validazione della curva di calibrazione
2. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
3. Validazione dei risultati ottenuti sul campione
4. Refertazione dei risultati del campione

NOTA

Per i dettagli, fare riferimento allo stesso paragrafo della **Procedura ELITE InGenius**

11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius ed ELITE BeGenius

11.1 Limite di rilevazione (LoD)

Sangue intero raccolto in EDTA

Il limite di rilevabilità (LoD) del saggio in associazione al sangue intero raccolto in EDTA è stato determinato sugli strumenti **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** analizzando una matrice di sangue intero in EDTA negativa, inoculata con materiale di riferimento dell'HSV-1 (1° standard internazionale dell'OMS per il DNA dell'HSV-1, NIBSC cod. 16/368). È stata eseguita l'analisi di regressione con modello Probit sui risultati ed è stato stimato il LoD come la concentrazione del campione che ha una probabilità del 95% di risultare positivo.

I risultati per ciascuna matrice di sangue intero in EDTA sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 8 Limite di rilevabilità con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius su sangue intero in EDTA

Campione	LoD	Intervallo di confidenza del 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
Sangue intero in EDTA	46 IU/mL	27 IU/mL	100 IU/mL
	230 copie/mL	135 copie/mL	500 copie/mL

I risultati ottenuti hanno confermato la concentrazione dichiarata per il target del prodotto HSV1 ELITE MGB Kit su entrambi gli strumenti ELITE InGenius ed ELITE BeGenius per la matrice di sangue intero in EDTA.

La sensibilità analitica, espressa in copie/mL per la matrice di sangue intero raccolto in EDTA, viene calcolata applicando il fattore di conversione specifico indicato al paragrafo [11.10 Fattore di conversione alle Unità Internazionali pagina 33](#)

Plasma raccolto in EDTA e CSF

Il limite di rilevabilità (LoD) dell'amplificazione del DNA consente di rilevare la presenza di circa 10 copie (1 IU) in 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione. Il valore teorico del limite di rilevabilità (LoD) del saggio in associazione a campioni di plasma in EDTA e liquido cerebrospinale (CSF) è stato stabilito e verificato mediante test effettuati con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius su un pool di campioni di plasma in EDTA e CSF negativi, inoculati con una concentrazione di 25 UI/mL di materiale di riferimento per l'HSV-1 (1° standard internazionale dell'OMS per il DNA dell'HSV-1, NIBSC cod. 16/368).

I risultati relativi alle matrici di plasma in EDTA e di CSF sono riportati nelle tabelle seguenti.

Tabella 9 Limite di rilevabilità con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius su plasma in EDTA e su CSF

Matrice	LoD
Plasma in EDTA	25 IU/mL
	250 copie/mL
CSF	25 IU/mL
	250 copie/mL

I risultati ottenuti hanno confermato la concentrazione dichiarata per il target del prodotto HSV1 ELITE MGB Kit sia su ELITE InGenius che su ELITE BeGenius per il plasma in EDTA e il CSF.

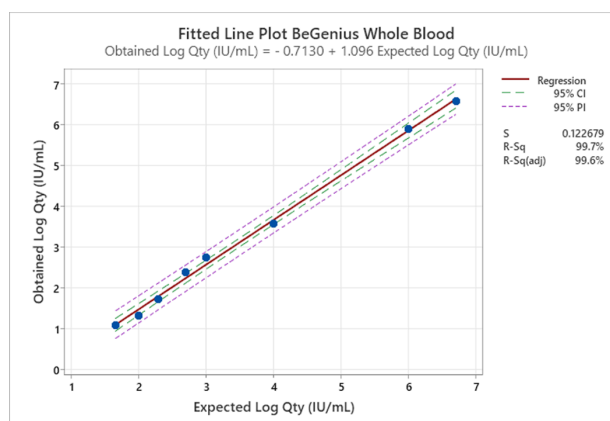
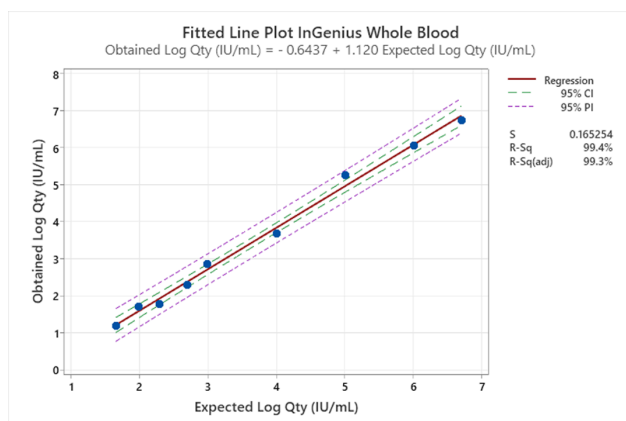
La sensibilità analitica, espressa in copie/mL per le matrici di plasma raccolto in EDTA e di CSF, viene calcolata applicando il fattore di conversione specifico (0.1 IU/copie) indicato al paragrafo [11.10 Fattore di conversione alle Unità Internazionali pagina 33](#)

11.2 Intervallo di misurazione lineare e limiti di quantificazione

L'intervallo di misurazione lineare del saggio è stato determinato utilizzando campioni di sangue intero in EDTA, plasma in EDTA e liquido cerebrospinale su **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** utilizzando un pannello di materiali di riferimento per HSV1 (Herpes Simplex Virus Type 1, Heat-Inactivated Culture Fluid, ZeptoMetrix in associazione con plasma in EDTA e liquido cerebrospinale; 1° standard internazionale dell'OMS per il DNA dell'HSV1, NIBSC cod. 16/368, Regno Unito, in associazione con sangue intero raccolto in EDTA) in matrici negative per il DNA dell'HSV1.

I risultati per ciascuna matrice sono riportati nei paragrafi seguenti.

Sangue intero:



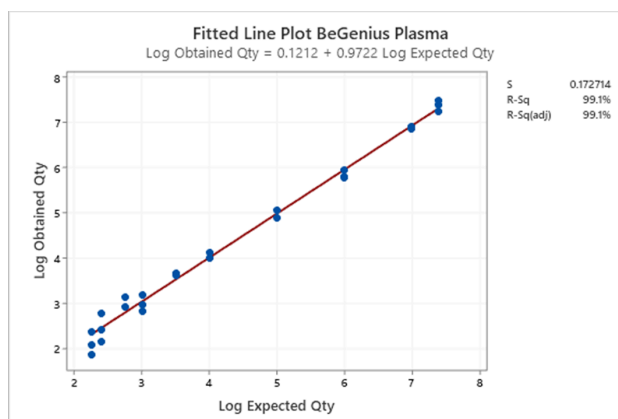
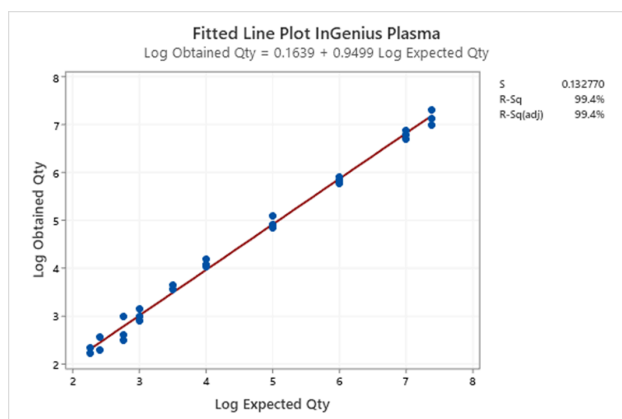
L'intervallo di misurazione lineare inteso come copie/mL per campioni di sangue intero raccolto in EDTA è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico indicato nel paragrafo [11.10 Fattore di conversione alle Unità Internazionali pagina 33](#)

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 10 Intervallo di misurazione lineare per campioni di sangue intero con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius

Unit	Limite inferiore	Limite superiore
IU/mL	46	5.000.000
copie/mL	230	25.000.000

Plasma:



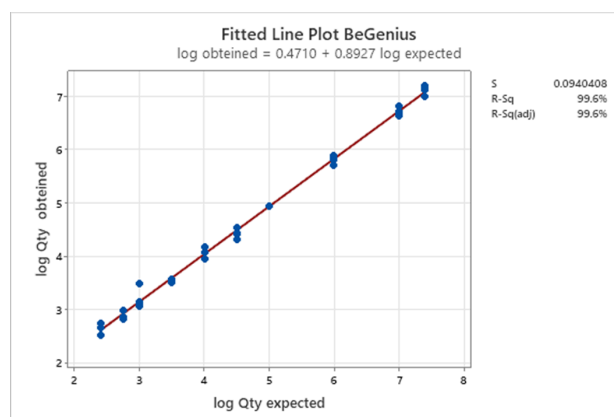
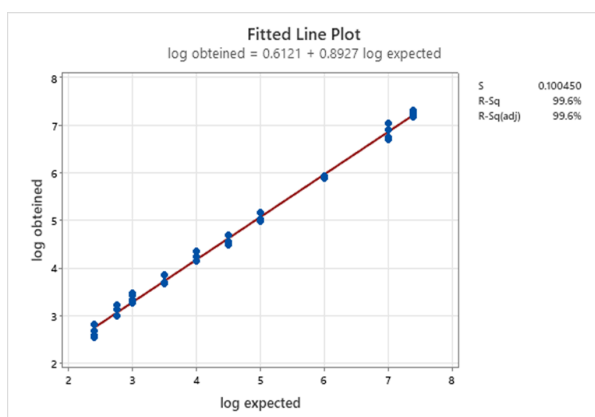
L'intervallo di misurazione lineare in copie/mL per il plasma raccolto in EDTA è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico indicato nel paragrafo [11.10 Fattore di conversione alle Unità Internazionali pagina 33](#)

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 11 Intervallo di misurazione lineare per campioni di plasma con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius

Unit	Limite inferiore	Limite superiore
IU/mL	25	2.500.000
copie/mL	250	25.000.000

CSF:



L'intervallo di misurazione lineare in copie/mL è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico riportato nel paragrafo [11.10 Fattore di conversione alle Unità Internazionali pagina 33](#)

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 12 Intervallo di misurazione lineare per campioni di CSF con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius

Unit	Limite inferiore	Limite superiore
IU/mL	25	2.500.000
copie/mL	250	25.000.000

11.3 Incertezza della curva dello standard

Il valore di incertezza della curva dello Standard è stato calcolato combinando gli errori casuali (SD) delle quantificazioni di tutti i livelli e moltiplicando per il fattore di copertura $k = 2$ (incertezza combinata estesa) ed è pari a 0,3030 Log copie/reazione.

Tabella 13

Livelli della curva standard	Ottenuti	SD	Incertezza combinata estesa
	Log c/rxn		
HSV1 Q - PCR Standard 10^5	5,0424	0,0945	0,3030
HSV1 Q - PCR Standard 10^4	3,9368	0,0703	
HSV1 Q - PCR Standard 10^3	2,9500	0,0651	
HSV1 Q - PCR Standard 10^2	1,9131	0,0696	

11.4 Inclusività: Efficienza della rilevazione e della quantificazione su differenti genotipi

L'inclusività del saggio, come efficienza della rilevazione per differenti ceppi di *Herpes Simplex Virus Type1* è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nei database dei nucleotidi. L'analisi ha dimostrato la conservazione della sequenza e l'assenza di mutazioni significative. Pertanto, si prevede una rilevazione efficiente di differenti ceppi o isolati.

11.5 Microrganismi potenzialmente interferenti Cross-reattività

La potenziale crossreattività con altri microrganismi che si possono rilevare nei campioni clinici di plasma è stata valutata mediante analisi *in silico*. L'analisi non ha evidenziato omologie significative con altri organismi diversi da quello di interesse (virus, procarioti, funghi, fagi, invertebrati e uomo). Pertanto, non si prevede nessuna crossreattività.

La mancata cross-reattività con organismi potenzialmente interferenti è stata verificata anche mediante l'analisi di un pannello di organismi diversi da quello di interesse ad alto titolo.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 14

ID campione	HHV6 Pos./Rep.	Esito
EBV	0/3	Nessuna cross-reattività
CMV	0/3	Nessuna cross-reattività
HHV7	0/3	Nessuna cross-reattività
HHV8	0/3	Nessuna cross-reattività
HSV1	0/3	Nessuna cross-reattività
HSV2	0/3	Nessuna cross-reattività
VZV	0/3	Nessuna cross-reattività
BKV	0/3	Nessuna cross-reattività
Flu B	0/3	Nessuna cross-reattività
PVB19	0/3	Nessuna cross-reattività
HIV1	0/3	Nessuna cross-reattività
HBV	0/3	Nessuna cross-reattività
HCV	0/3	Nessuna cross-reattività
JCV	0/3	Nessuna cross-reattività
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0/3	Nessuna cross-reattività
<i>Staphylococcus aureus</i>	0/3	Nessuna cross-reattività
<i>Candida albicans</i>	0/3	Nessuna cross-reattività

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti analizzati non hanno evidenziato alcuna cross-reattività per l'amplificazione del target HHV6 quando analizzati con HSV1 ELITE MGB Kit.

11.6 Microrganismi potenzialmente interferenti Inibizione

La potenziale inibizione da parte di organismi indesiderati che possono essere presenti nei campioni clinici è stata valutata mediante analisi *in silico*. L'analisi non ha evidenziato omologie significative con altri organismi diversi da quello di interesse (virus, procarioti, funghi, fagi, invertebrati e umani). Pertanto, non si prevede nessuna inibizione.

L'assenza di cross-reattività con organismi potenzialmente interferenti è stata verificata anche mediante l'analisi di un pannello di organismi diversi da quello di interesse ad alto titolo.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 15

ID campione	HHV6 Pos./Rep.	Esito
Riferimento HHV6	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + EBV	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + CMV	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + HHV7	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + HHV8	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + HSV1	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + HSV2	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + VZV	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + BKV	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + ADV	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + PVB19	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + HIV1	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + HBV	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + HCV	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + JCV	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + <i>Aspergillus fumigatus</i>	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + <i>Staphylococcus aureus</i>	3/3	Nessuna inibizione
HHV6 + <i>Candida albicans</i>	3/3	Nessuna inibizione

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti analizzati non hanno evidenziato alcuna inibizione dell'amplificazione del target HHV6 quando analizzati con HSV1 ELITe MGB Kit.

11.7 Sostanze potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione di sostanze interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero essere presenti nei campioni clinici è stata valutata per il saggio mediante l'analisi di un pannello di sostanze a concentrazioni rilevanti in campioni positivi per l'HSV1.

I risultati per ciascuna matrice sono riportati nei paragrafi seguenti.

Tabella 16 Sangue intero

Campioni	HSV1 Pos. / Rep	Esito
Azitromicina	5/5	Nessuna interferenza
Ganciclovir	5/5	Nessuna interferenza
Etanolo	5/5	Nessuna interferenza
Ampicillina	5/5	Nessuna interferenza

Tabella 16 Sangue intero (segue)

Campioni	HSV1 Pos. / Rep	Esito
Fluconazolo	5/5	Nessuna interferenza
Ciclosporina A	5/5	Nessuna interferenza
Aciclovir	5/5	Nessuna interferenza
Vancomicina	5/5	Nessuna interferenza
Eparina	5/5	Nessuna interferenza
EDTA	5/5	Nessuna interferenza

Le sostanze analizzate non interferiscono con l'amplificazione dell'HSV1 o dell'Internal Control.

Tabella 17 Plasma

Campione	HSV1 Pos./Rep.	Esito
Panel 1 EDTA Plasma	5/5	Nessuna interferenza
Panel 2 Haemolytic Bloow Low	5/5	Nessuna interferenza
Panel 3 Haemolytic Bloow Mid	5/5	Nessuna interferenza
Panel 4 Haemolytic Bloow High	5/5	Nessuna interferenza
Panel 5 Heparinized Plasma	5/5	Interferenza
Panel 6 Lipemic Plasma	5/5	Nessuna interferenza
Panel 7 Icteric Plasma	5/5	Nessuna interferenza

Il test ha dimostrato che tutte le sostanze, ad eccezione dell'eparina, non interferiscono con la rilevazione e la quantificazione dell'HSV1 utilizzando il prodotto HSV1 ELITe MGB Kit su campioni plasmatici.

Tabella 18 CSF

Campioni	HSV1 Pos. / Rep	Esito
Azitromicina	5/5	Nessuna interferenza
Ganciclovir	5/5	Nessuna interferenza
Etanolo	5/5	Nessuna interferenza
Ampicillina	5/5	Nessuna interferenza
Fluconazolo	5/5	Nessuna interferenza
Ciclosporina A	5/5	Nessuna interferenza
Aciclovir	5/5	Nessuna interferenza
Vancomicina	5/5	Nessuna interferenza
Sangue intero, umano	5/5	Nessuna interferenza

Le sostanze analizzate non interferiscono con l'amplificazione dell'HSV1 o dell'Internal Control.

11.8 Ripetibilità

La ripetibilità intra-sessione e inter-sessione del saggio è stata valutata sugli strumenti ELITE InGenius ed ELITE BeGenius analizzando un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA, inclusi un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento certificato per HSV1 (Herpes Simplex Virus Type 1 Culture Fluid Heat Inactivated, ZeptoMetrix).

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

Tabella 19 Ripetibilità intra-sessione con ELITE InGenius

Campione	HSV1				
	N	Media Ct HSV1	SD Ct HSV1	%CV Ct HSV1	% Concordezza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	36,31	0,51	1,40	100%
10 x LoD	8	34,25	0,42	1,22	100%

Tabella 20 Ripetibilità intra-sessione con ELITE BeGenius

Campione	HSV1				
	N	Media Ct HSV1	SD Ct HSV1	%CV Ct HSV1	% Concordezza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	37,82	0,65	1,73	100%
10 x LoD	8	35,82	0,47	1,32	100%

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

Tabella 21 Ripetibilità inter-sessione con ELITE InGenius

Campione	HSV1 - giorni 1-2				
	N	Media Ct HSV1	SD Ct HSV1	%CV Ct HSV1	% Concordezza
Negativi	16	-	-	-	100%
3 x LoD	16	36,15	0,52	1,44	100%
10 x LoD	16	34,24	0,42	1,21	100%

Tabella 22 Ripetibilità inter-sessione con ELITE BeGenius

Campione	HSV1 - giorni 1-2				
	N	Media Ct HSV1	SD Ct HSV1	%CV Ct HSV1	% Concordezza
Negativi	16	-	-	-	100%
3 x LoD	16	37,53	0,64	1,71	100%
10 x LoD	16	35,55	0,53	1,50	100%

Nel test di ripetibilità, HSV1 ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct del target espressa come %CV inferiore a 5%.

11.9 Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata valutata sugli strumenti ELITE InGenius ed ELITE BeGenius analizzando un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi o positivizzati con materiale di riferimento per HSV1 (Herpes Simplex Virus Type 1 Culture Fluid Heat Inactivated, ZeptoMetrix).

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi della riproducibilità inter-strumento (su due strumenti).

Tabella 23 Riproducibilità inter-strumento con ELITE InGenius

Campione	HSV1				
	N	Ct media	SD	% CV	% Concordanza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	37,14	0,66	1,79	100%
10 x LoD	8	30,88	0,55	1,79	100%

Tabella 24 Riproducibilità inter-strumento con ELITE BeGenius

Campione	HSV1				
	N	Ct media	SD	% CV	% Concordanza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	37,26	0,59	1,58	100%
10 x LoD	8	36,12	0,79	2,18	100%

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

Tabella 25 Riproducibilità inter-lotto con ELITE InGenius

Campione	HSV1 - lotto 1-2				
	N	Ct media	SD	% CV	% Concordanza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	36,99	0,61	1,64	100%
10 x LoD	8	34,71	0,53	1,51	100%

Tabella 26 Riproducibilità inter-lotto con ELITE BeGenius

Campione	HSV1 - lotto 1-2				
	N	Ct media	SD	% CV	% Concordanza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	37,06	0,61	1,64	100%
10 x LoD	8	35,73	0,28	0,79	100%

Nel test di riproducibilità, HSV1 ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct del target espressa come %CV inferiore a 5%.

11.10 Fattore di conversione alle Unità Internazionali

Il fattore di conversione per riportare i risultati quantitativi da copie/mL in Unità Internazionali (IU)/mL è stato calcolato per ciascuna matrice utilizzando il materiale di riferimento calibrato certificato (1° Standard Internazionale dell'OMS per il DNA del virus HSV1, codice NIBSC 14/368).

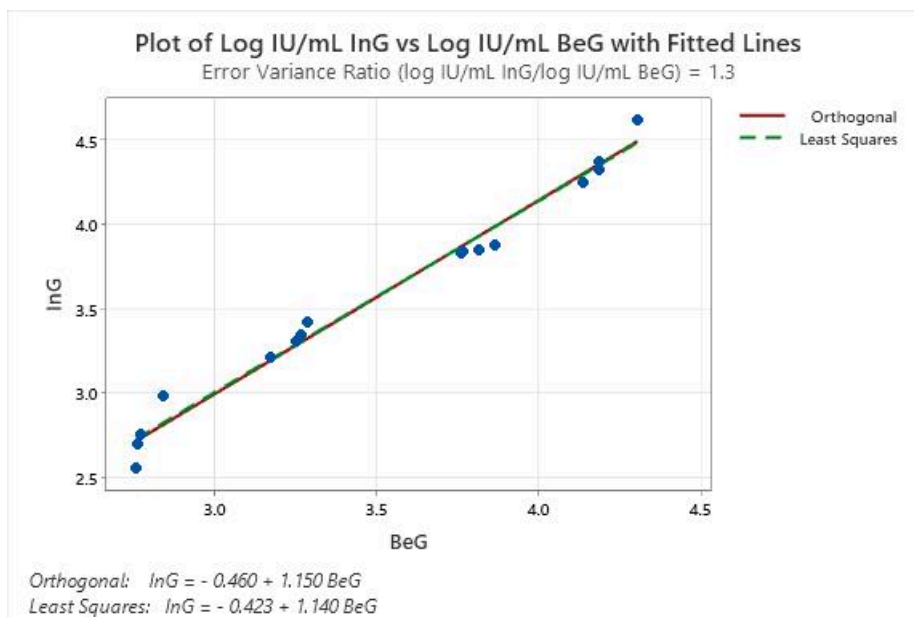
I risultati per ciascuna matrice sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 27 Fattore di conversione alle Unità Internazionali con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius

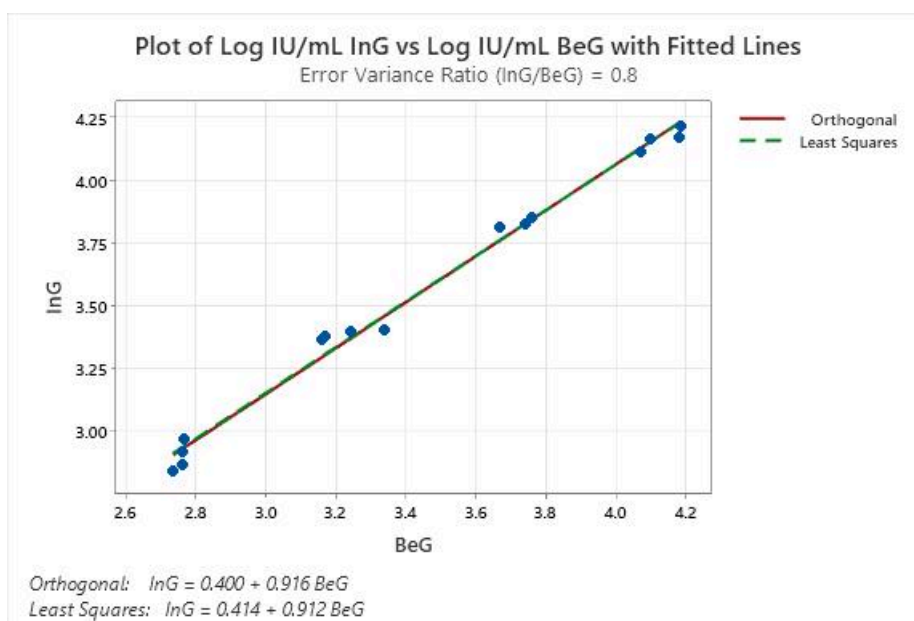
Matrice	Fc (IU/copie)
Sangue intero	0,2
Plasma	0,1
CSF	0,1

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

I risultati per ciascuna matrice sono riportati nei paragrafi seguenti.

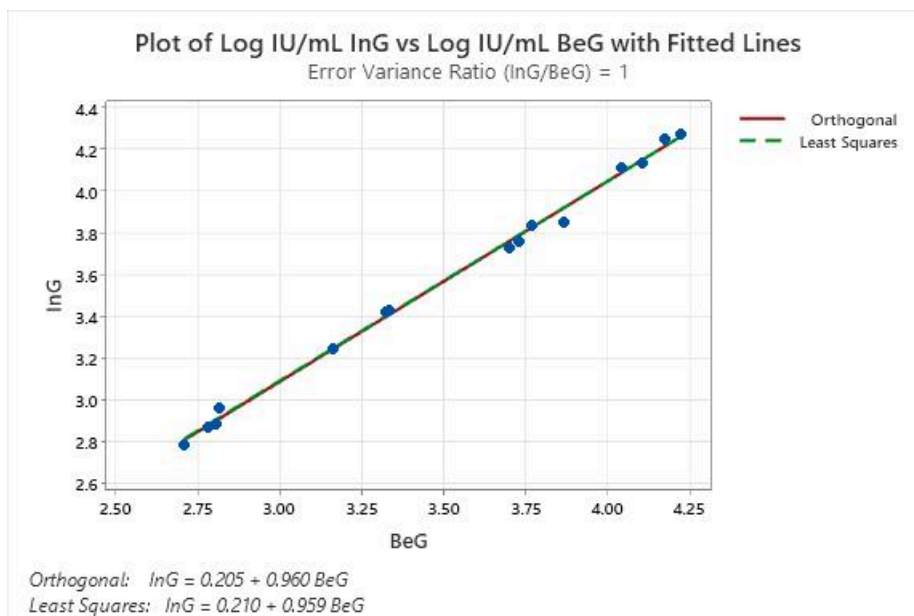
Sangue intero

L'analisi di regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a -0,460 (intervallo di confidenza del 95%: -0,739; 0,108) e una pendenza pari a 1,150 (95% CI: 1,0509/1,2285).

Plasma:

L'analisi di regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a 0,400 (intervallo di confidenza del 95%: 0,239; 0,589) e una pendenza pari a 0,916 (95% CI: 0,862/0,962).

CSF:



L'analisi di regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a 0,205 (intervallo di confidenza del 95%: 0,091; 0,330) e una pendenza pari a 0,960 (95% CI: 0,925/0,992).

11.11 Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata in associazione con **ELITE InGenius** analizzando campioni clinici, certificati negativi o presunti negativi per il DNA dell'HSV1. Poiché **ELITE BeGenius** ha prestazioni analitiche equivalenti a **ELITE InGenius**, anche le prestazioni diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono considerate equivalenti. Pertanto, la specificità diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITE InGenius è applicabile anche a ELITE BeGenius.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

Tabella 28 Specificità diagnostica

Campioni	N	Positivi	Negativi	Specificità diagnostica in %
Sangue intero raccolto in EDTA e negativo per il DNA dell'HSV1	117	0	117	100
Plasma raccolto in EDTA e negativo per il DNA dell'HSV1	82	0	82	100
Liquido cerebrospinale (CSF) negativo per il DNA dell'HSV1	68	0	68	100

Il valore di cut-off del Ct IC è fissato a 35 per i campioni di sangue intero raccolto in EDTA, di plasma raccolto in EDTA e di CSF quando analizzati con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius.

11.12 Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata in associazione con **ELITE InGenius** analizzando campioni clinici certificati positivi per il DNA di HSV1 o positivizzati con materiale di riferimento. Poiché **ELITE BeGenius** ha prestazioni analitiche equivalenti a **ELITE InGenius**, anche le prestazioni diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono considerate equivalenti. Pertanto, la sensibilità diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITE InGenius è applicabile anche a ELITE BeGenius.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

Tabella 29 Sensibilità diagnostica

Campioni	N	Positivi	Negativi	Sensibilità diagnostica in %
Sangue intero raccolto in EDTA e positivo per il DNA dell'HSV1	23	23	0	100
Sangue intero raccolto in EDTA e positivizzato per il DNA dell'HSV1	27	27	0	
Plasma raccolto in EDTA e positivizzato per il DNA dell'HSV1	50	50	0	100
Liquido cerebrospinale (CSF) positivo per il DNA dell'HSV1	4	4	0	100
Liquido cerebrospinale (CSF) positivizzato per HSV1	48	48	0	

NOTA

I dati e i risultati completi dei test eseguiti per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico del prodotto "HSV1 ELITE MGB® Kit", FTP 031PLD.

12 CAMPIONI E CONTROLLI per ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

12.1 Campioni

I seguenti campioni e metodi di estrazione dell'acido nucleico sono convalidati per l'uso con il prodotto **HSV1 ELITE MGB Kit** utilizzando la piattaforma ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.

Tabella 30

Tipo di campione	Kit/Metodo di estrazione	Protocollo	Volume di input (µL)	Volume di eluizione (µL)	Volume minimo nella provetta primaria (µL)	Istruzioni specifiche
Sangue intero	ELITE GALAXY	xNA Extraction (Universal)	300	200	400-650	Aggiungere 10 µL/campione di CPE alla soluzione IC + Carrier

12.2 Sostanze interferenti

Il DNA estratto dal campione non deve contenere eparina, emoglobina, destrano, Ficoll®, etanolo o 2-propanolo al fine di evitare problemi di inibizione e la possibilità di frequenti risultati non validi.

La presenza di un'alta quantità di DNA genomico umano nel DNA estratto dal campione può inibire la reazione di amplificazione.

Non sono disponibili dati riguardanti l'inibizione conseguente alla somministrazione di antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

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

12.3 Controlli di amplificazione

È obbligatorio convalidare ogni sessione di amplificazione con una reazione del Negative Control e una reazione del Positive Control.

Per il Negative Control, utilizzare acqua di grado biologico molecolare (non fornita con questo kit) aggiunta alla reazione al posto del DNA estratto dal campione.

Per il Positive Control utilizzare il prodotto **HSV1 - ELITePositive Control** o il prodotto **HSV1 - ELITe Standard**.

12.4 Controlli di qualità

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

13 PROCEDURA per ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

13.1 Preparazione di una sessione di amplificazione real time

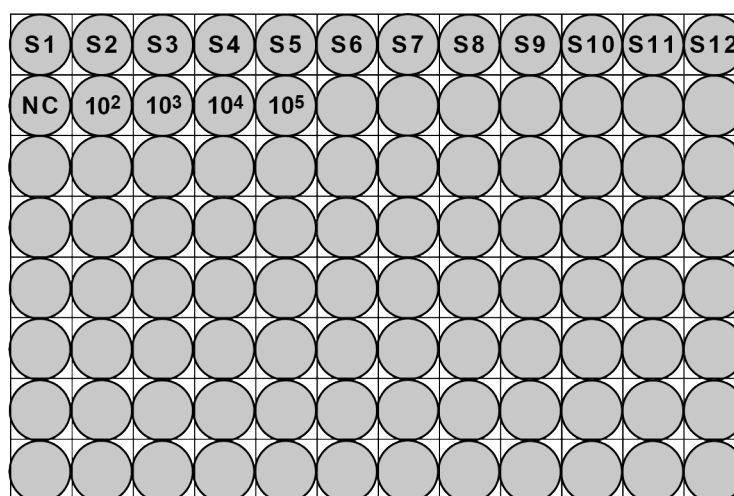
Prima di eseguire la sessione, fare riferimento alla documentazione dello strumento per:

- accendere lo strumento, accendere il computer, aprire il software dedicato e una sessione di “quantificazione assoluta”, quindi impostare la modalità di esecuzione “Run Mode”: Fast 7500”;
- impostare (Detector Manager) il “detector” (rilevatore) per la sonda dell’HSV1 con “reporter” = “FAM” e “quencher” = ‘none’ (non fluorescente) e denominarlo “HSV1”;
- impostare (Detector Manager) il “rilevatore” per la sonda dell’Internal Control con il “reporter” = “VIC” (AP525 è analogo a VIC) e il “quencher” = ‘none’ (non fluorescente) e denominarlo “IC”;
- Per ciascun pozzetto in uso della micropiastra, impostare (in Well Inspector) il “detector” (fluorescenza da misurare), il “passive reference” = “Cy5” (viene utilizzato AP593 invece di “Cy5” per la normalizzazione dei livelli di fluorescenza) e il tipo di reazione (campione, controllo negativo, controllo positivo o standard con la relativa quantità nota).

NOTA

Per quantificare il DNA nel campione iniziale, includere una serie di reazioni utilizzando i **Q-PCR Standards** (10^5 copie/reaz., 10^4 copie/reaz., 10^3 copie/reaz., 10^2 copie/reaz.) per ottenere la **curva standard**.

Di seguito viene illustrato, tramite un esempio, come impostare l’analisi quantitativa di 12 campioni.



Legenda: **S1 -S12:** Campioni da analizzare; **NC:** Negative Control di amplificazione;

10²: 10² copie standard/reaz.; **10³:** 10³ copie standard/reaz.; **10⁴:** 10⁴ copie standard/reaz.; **10⁵:** 10⁵ copie standard/reaz.

Per impostare i parametri del **ciclo termico**, consultare la documentazione dello strumento (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile):

- aggiungere una **estensione di 20 secondi a 72 °C** (Add Step);

NOTA

Nota: L'acquisizione dei dati di fluorescenza deve essere impostata durante la fase di ibridazione a 60 °C (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection).

- modificare le temperature e i tempi dei cicli termici come indicato nella tabella “**Thermal cycle**”;
- impostare il numero di cicli a **45**
- impostare il volume di campione a **30 µL**
- facoltativo: aggiungere una fase di dissociazione (Add Dissociation Stage), impostare la temperatura iniziale a **40 °C** e la temperatura finale a **80 °C**.

Tabella 31 Ciclo termico

Fase	Temperature	Durata
Decontaminazione	50 °C	2 min.
Denaturazione iniziale	94 °C	2 min.
Amplificazione e rilevazione (45 cicli)	94 °C	10 sec.
	60 °C (acquisizione della fluorescenza)	30 sec.
	72 °C	20 sec.
Dissociazione (facoltativa)	95 °C	15 sec.
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 sec.
	60 °C	15 sec.

13.2 Impostazioni della sessione per la Real-Time PCR

(Eseguita dallo strumento **ELITE GALAXY**)

Per eseguire la configurazione della sessione PCR:

- scongelare le provette di **Q-PCR Mix** necessarie per la sessione (ciascuna provetta è sufficiente per **25 reazioni**)
- scongelare le provette di **Positive Control** (analisi qualitativa: rilevazione di DNA estratto) o le provette di **Q – PCR Standard** (analisi quantitativa: quantificazione di DNA estratto)
- agitare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo
- preparare il **Negative Control** (non fornito) come da istruzioni d'uso dello strumento
- preparare una **Q-PCR microplate**. Maneggiarla con guanti senza polvere e non danneggiare i pozzetti.

NOTA

Per preparare la PCR sullo strumento **ELITE GALAXY**, caricare la micropiastra di eluizione contenente i campioni di DNA estratti, i reagenti e la **Q-PCR microplate** come indicato nel manuale d'uso dello strumento e seguire i passaggi indicati sull'interfaccia grafica utente.

Lo strumento esegue automaticamente la configurazione della PCR dispensando in ciascun pozzetto della **Q-PCR microplate**:

- **20 µL di Q-PCR Mix**

- **20 µL di DNA estratto / Q-PCR Standard / Controlli**

NOTA

Se non viene utilizzata tutta la Q—PCR Mix, conservare il volume rimanente al buio a -20 °C per non più di un mese. Congelare e scongelare la Q—PCR Mix per un massimo di **5 VOLTE**.

Una volta completata la configurazione della PCR da parte dello strumento:

- sigillare la **Q-PCR microplate** con un sigillo ottico
- trasferire la **Q-PCR microplate** nella piattaforma **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** e avviare la PCR. Salvare il file di esecuzione con un nome unico e riconoscibile (ad esempio “anno-mese-giorno-TARGET-EGSpA”).

NOTA

Al termine della PCR, la **Q-PCR microplate** deve essere smaltita nel rispetto di tutte le normative legali e ambientali. Per evitare la fuoriuscita dei prodotti della PCR, **non si deve rimuovere il sigillo ottico dalla Q-PCR microplate**.

13.3 Impostazioni generali per l'analisi dei risultati

Prima di eseguire l'analisi, fare riferimento alla documentazione dello strumento per:

- impostare manualmente l'intervallo di calcolo per la **Baseline** (livello di fluorescenza di fondo) dal ciclo 6 al ciclo 15 (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle);

NOTA

La fluorescenza FAM della sonda HSV1 in un campione ad alta concentrazione di DNA dell'HSV1 potrebbe cominciare a crescere prima del ciclo 15. In questo caso, abbassare l'intervallo di calcolo della **Baseline** al ciclo in cui la fluorescenza FAM del campione comincia a crescere (Results > Component).

- impostare manualmente le soglie per i rilevatori di fluorescenza (“detector”):

impostare il rilevatore FAM della **soglia** “HSV1” a **0,2**;

impostare il rilevatore VIC della **soglia** “IC” a **0,1**;

Il ciclo PCR in cui il livello di fluorescenza di un campione raggiunge il valore **soglia** determina il **ciclo soglia (Ct)** per quel campione.

Il software dello strumento automaticamente analizza i livelli di fluorescenza nei controlli, negli standard e nelle reazioni dei campioni e calcola i valori Ct.

13.4 Analisi qualitativa dei risultati

Il valore **Ct** di HSV1 del **Positive Control** viene utilizzato per validare la PCR. La sessione di PCR è valida quando i risultati ottenuti sono come quelli descritti nella seguente tabella:

Tabella 32

Reazione del Positive Control, Rilevatore FAM di “HSV1”	Risultato del saggio	Amplificazione/rilevazione
Ct ≤25	POSITIVO	CORRETTO

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Positive Control** è **Ct > 25** o **Ct Undetermined** (Ct Non determinato) per il Rilevatore FAM di “HSV1”, la sessione non è valida e deve essere ripetuta partendo dalla fase di PCR. Questo potrebbe indicare un problema durante la fase di preparazione della PCR, la fase di amplificazione o di rilevazione (per esempio: dispensazione errata o degradazione della miscela di reazione o del controllo positivo, impostazione errata della posizione del controllo positivo, impostazione errata del ciclo termico) che possono causare risultati non corretti.

NOTA

Quando il prodotto viene utilizzato per la quantificazione del DNA di HSV1, vengono impostate le reazioni del **Q - PCR Standard** al posto della reazione del **Positive Control**. In questo caso, convalidare l'amplificazione e il rilevamento facendo riferimento alla reazione di amplificazione del **Q - PCR Standard 10⁵ (Ct ≤ 25)**.

Per convalidare la PCR viene utilizzato il valore Ct di HSV1 del **Negative Control**. La sessione di PCR è valida quando i risultati ottenuti sono come quelli descritti nella seguente tabella:

Tabella 33

Reazione del Negative Control, Rilevatore FAM di "HSV1"	Risultato del saggio	Amplificazione/rilevazione
Ct indeterminato	NEGATIVO	CORRETTO

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Negative control** è diverso da **Ct Undetermined** (Ct Non determinato) per il Rilevatore FAM di "HSV1", la sessione non è valida e deve essere ripetuta partendo dalla fase di PCR. Questo potrebbe indicare che si è verificato un problema nella fase di amplificazione (contaminazione) che potrebbe portare a risultati non corretti e falsi positivi.

Il valore **Ct** di HSV1 in ciascun campione viene utilizzato per la rilevazione del DNA target mentre il valore **Ct** dell'Internal Control viene utilizzato per validare l'estrazione, la PCR e la rilevazione.

NOTA

Verificare con il software dello strumento (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) che il **Ct** di ciascun campione sia determinato da un rapido e regolare incremento dei valori di fluorescenza e non da fenomeni di picco o incremento del segnale di fondo (fondo irregolare o elevato).

I possibili risultati dei campioni (Results > Report) sono descritti nella seguente tabella:

Tabella 34

Reazione del campione		Idoneità del campione	Risultato del saggio	HSV1 DNA
Rilevatore FAM "HSV1"	Rilevatore VIC "IC"			
Ct indeterminato	Ct > 35 o Ct indeterminato	Non idoneo	Non valido	-
	Ct ≤ 35	Idoneo	Valido, negativo	NON RILEVATO
Ct determinato	Ct > 35 o Ct indeterminato	Idoneo	Valido, positivo	RILEVATO
	Ct ≤ 35	Idoneo	Valido, positivo	RILEVATO

Un risultato della reazione di amplificazione di un campione che ha **Ct Undetermined** (Ct Non determinato) per HSV1 e **Ct > 35 o Ct Undetermined** (Ct Non determinato) per l'Internal Control non è valido e indica un problema durante l'estrazione degli acidi nucleici o la PCR (per es. degradazione del DNA del campione, perdita del DNA durante l'estrazione, presenza di inibitori nel DNA estratto, amplificazione non efficiente o nulla), che potrebbe portare a risultati non corretti. Il campione non è idoneo all'analisi e il saggio deve essere ripetuto ripartendo dall'estrazione degli acidi nucleici di un nuovo campione.

Un risultato di **Ct Undetermined** (Ct Non determinato) per HSV1 e **Ct ≤ 35** per l'Internal Control è un risultato valido e indica che il DNA di HSV1 non è stato rilevato nel campione. Il campione potrebbe non contenere DNA di HSV1 oppure contenerne in concentrazioni inferiori al limite di rilevabilità del prodotto (vedere [14 Caratteristiche delle prestazioni pagina 42](#)). Un risultato di **Ct Determined (Ct ≤ 45)** (Ct Determinato, Ct ≤ 45) per HSV1 e **Ct > 35, Ct Undetermined** (Ct Non determinato) o **Ct ≤ 35** per l'Internal Control (IC) è un risultato valido e indica che il DNA di HSV1 è stato rilevato nel campione.

NOTA

Nel caso di Ct Determinato per HSV1 e Ct > 35 o Non determinato per L'Internal Control (IC), la reazione di amplificazione a bassa efficienza dell'IC potrebbe essere stata annullata dalla competizione con la reazione di amplificazione ad alta efficienza del DNA di HSV1. In questo caso il campione è comunque idoneo e il risultato positivo del saggio è valido.

NOTA

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati in associazione a tutte le osservazioni cliniche ed esiti degli esami di laboratorio rilevanti.

13.5 Analisi quantitativa dei risultati

Nelle reazioni di amplificazione dei quattro **Q - PCR Standard**, i valori **Ct** di HSV1 vengono utilizzati per calcolare la **curva Standard** (Results > Standard Curve) per la sessione di amplificazione, al fine di convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Tabella 35

Rilevatore della curva standard FAM "HSV1"	Intervallo di accettabilità	Amplificazione/rilevazione
Coefficiente di correlazione (R2)	$0,990 \leq R2 \leq 1,000$	CORRETTO

Se il valore del **Correlation coefficient (R2)** (Coefficiente di correlazione R2) non rientra nei limiti, la sessione non è valida e deve essere ripetuta partendo dalla fase di amplificazione. Questo potrebbe indicare un problema durante la fase di amplificazione o di rilevazione (per esempio: dispensazione errata o degradazione della miscela di reazione o degli standard, impostazione errata della posizione degli standard, impostazione errata del ciclo termico o cross-contaminazione) che possono causare risultati non corretti.

Tabella 36

Risultato campione del rivelatore FAM "HSV1"	copie di HSV1 per reazione
Quantità > 1×10^6	MAGGIORE DI 1×10^6
$1 \times 10^1 \leq$ Quantità $\leq 1 \times 10^6$	= Quantità
Quantità < 1×10^1	MINORE DI 10

I risultati (**Quantità**) relativi a ciascun campione (Results > Report) vengono utilizzati per calcolare le copie di HSV1 presenti nel campione di partenza (**Nc**) secondo questa formula:

Tabella 37

$$Nc = \frac{Ve \times \text{Quantità}}{Vc \times Va \times Ep}$$

dove:

Ve è il volume totale in **µL** del campione di DNA estratto (volume di eluizione)

Quantità è il numero di **copie/reazioni** del campione calcolato dal software dello strumento (risultato PCR)

Vc è il volume del campione utilizzato per l'estrazione degli acidi nucleici (volume di input) espresso nell'unità di misura richiesta.

Va è il volume in **µL** del campione di DNA estratto (eluato) utilizzato nella PCR.

Ep è l'efficienza della procedura (estrazione e PCR) **espressa in decimali**

Per convertire la quantità di campione da copie/mL a IU/mL, moltiplicare il valore di copie/mL per il **fattore di conversione (Fc)**. Il valore Fc è stato calcolato utilizzando materiale di riferimento certificato e calibrato (1° standard internazionale dell'OMS per il DNA dell'HSV-1, NIBSC cod. 16/368). (vedere [14 "Caratteristiche delle prestazioni" pagina 42](#))

Per comodità, di seguito sono riportate formule semplificate in cui sono stati calcolati $V_e/(V_c \times V_a \times E_p)$ e la rispettiva conversione in IU/mL.

Tabella 38

Matrice	Metodo di estrazione degli acidi nucleici	$V_e/(V_c \times V_a \times E_p)$	Formula per quantificare Nc (copie/mL)	Fc (IU/copie)	Formula per quantificare Nc (IU/mL)
Sangue intero	ELITE GALAXY	35	35 x Quantità	0,2	7 x Quantità

14 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

14.1 Limite di rilevabilità (LoD)

Il limite di rilevabilità (LoD) del saggio in associazione al sangue intero raccolto in EDTA è stato verificato sugli strumenti ELITE GALAXY e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR, analizzando un pannello di matrici negative all'HSV-1 inoculate con materiale di riferimento certificato ("QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel", Qnostics, Ltd). È stata eseguita l'analisi di regressione con modello Probit sui risultati ed è stato stimato il LoD come la concentrazione del campione che ha una probabilità del 95% di risultare positivo.

Tabella 39 Limite di rilevabilità con ELITE GALAXY (IU/mL)

Matrice	Positività al 95%	Intervallo di confidenza del 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
Sangue intero	42	27	100

Il livello di rilevabilità (LoD) espresso in copie/mL per ciascuna matrice è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico riportato al paragrafo [14.6 Conversione in Unità Internazionali \(IU\) pagina 43](#).

Si riporta di seguito la sensibilità analitica espressa in copie/mL.

Tabella 40 Limite di rilevabilità con ELITE GALAXY (copie/mL)

Matrice	Positività al 95%	Intervallo di confidenza del 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
Sangue intero	211	135	498

14.2 Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare del saggio è stato determinato con sangue intero sugli strumenti **ELITE GALAXY** e **ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR** utilizzando un pannello di diluizioni di un DNA plasmidico contenente il prodotto dell'amplificazione.

L'intervallo di misurazione lineare in copie/mL è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico riportato al paragrafo [14.6 Conversione in Unità Internazionali \(IU\) pagina 43](#).

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 41 Intervallo di misurazione lineare per campioni di sangue intero

Unità di Misura	Limite inferiore	Limite superiore
IU/mL	2	200.000
copie / reazione	10	1.000.000

14.3 Inclusività: Efficienza della rilevazione e della quantificazione su differenti genotipi

L'inclusività del saggio, come efficienza della rilevazione per differenti genotipi di *Herpes Simplex Virus Type 1* è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nei database dei nucleotidi. L'analisi ha dimostrato la conservazione della sequenza e l'assenza di mutazioni significative. Pertanto, si prevede la rilevazione efficiente di differenti ceppi o isolati.

14.4 Microrganismi potenzialmente interferenti Cross-reattività

La potenziale crossreattività con altri microrganismi che si possono rilevare nei campioni clinici di plasma è stata valutata mediante analisi *in silico*. L'analisi non ha evidenziato omologie significative con altri organismi diversi da quello di interesse (virus, procarioti, funghi, fagi, invertebrati e uomo). Pertanto, non si prevede nessuna crossreattività.

14.5 Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata valutata su ABI 7500 mediante l'analisi di un pannello di campioni positivamente con un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione dell'HSV-1, e di un campione negativo.

La tabella sottostante riporta una sintesi della riproducibilità inter-lotto (su dieci lotti).

Tabella 42 Riproducibilità inter-lotto su ABI 7500

Campione	HSV1				
	N	Media Ct	SD	% CV	% Concordanza
100.000 target	30	22,84	0,35	1,53	100%
50.000 target + 150.000 IC	30	23,63	0,34	1,45	100%
5.000 target + 150.000 IC	30	26,68	0,46	1,71	100%
500 target + 150.000 IC	30	30,08	0,52	1,72	100%
10 target + 150.000 IC	90	36,04	0,81	2,26	100%
150000 IC	30	22,44	0,35	1,58	100%
6000 IC	90	27,85	0,38	1,36	100%

Nel test di riproducibilità, HSV1 ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct del target espressa come %CV inferiore a 5%.

14.6 Conversione in Unità Internazionali (IU)

Il fattore di conversione per esprimere i risultati quantitativi in unità internazionali (IU)/mL a partire da copie/mL, calcolato per gli strumenti ELITE GALAXY e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR su campioni di sangue intero con EDTA, è stato confermato utilizzando il materiale di riferimento certificato e calibrato del 1° standard internazionale dell'OMS per il DNA dell'HSV-1, cod. NIBSC 16/368, Regno Unito.

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Tabella 43 Fattore di conversione alle Unità Internazionali

Strumento	Fc (IU/copie)
ELITE GALAXY	0,2

14.7 Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici negativi, è stata valutata analizzando, in associazione con ELITE GALAXY e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, dei campioni certificati negativi o presunti negativi al DNA dell'HSV1.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

Tabella 44 Specificità diagnostica:

Campioni	N	Positivi	Negativi	Specificità diagnostica in %
Sangue intero raccolto in EDTA e negativo per il DNA dell'HSV1	57	0	57	100

14.8 Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, intesa come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando, in combinazione con **ELITE GALAXY** e lo strumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR, campioni inoculati con materiale di riferimento dell'HSV-1.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

Tabella 45

Campioni	N	Positivi	Negativi	Sensibilità diagnostica in %
Sangue intero raccolto in EDTA e positizzato per il DNA dell'HSV1	54	54	0	100

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 nel Fascicolo Tecnico del prodotto "HSV1 ELITE MGB Kit", FTP 031PLD.

15 BIBLIOGRAFIA

E. Aurelius et al. (1993) *J. Med. Virology* 39: 179 - 186

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

16 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto esclusivamente con i seguenti campioni clinici: sangue intero raccolto in EDTA (tutti gli strumenti), plasma raccolto in EDTA e liquido cerebrospinale (ELITE InGenius ed ELITE BeGenius).

Non utilizzare questo prodotto con DNA estratto da campioni eparinizzati: l'eparina inibisce la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e causa risultati non validi.

Con questo prodotto non utilizzare DNA contaminato con emoglobina, destrano, Ficoll®, etanolo o 2-propanolo: queste sostanze inibiscono la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e possono causare risultati non validi.

Non utilizzare questo prodotto con DNA estratto contenente un'elevata quantità di DNA genomico umano che potrebbe inibire la reazione di amplificazione degli acidi nucleici.

Non sono disponibili dati relativi all'inibizione causata da farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

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

La metodica PCR real time utilizzata in questo prodotto ha un'elevata sensibilità analitica che la rende soggetta a contaminazioni da campioni clinici positivi, da controlli positivi e dai prodotti della PCR. Le contaminazioni crociate possono produrre risultati falsi positivi. Il formato del prodotto è progettato per limitare le contaminazioni crociate. Tuttavia, le contaminazioni crociate si possono evitare solo attenendosi alle buone prassi di laboratorio e seguendo le presenti istruzioni per l'uso.

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

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

Questo prodotto richiede l'uso di dispositivi di protezione individuale e di strumenti dedicati alla preparazione delle sessioni di lavoro per evitare risultati falsi positivi.

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

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 del target non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione, ma non si può escludere che il DNA del target abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto ([11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius ed ELITe BeGenius pagina 25](#)). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

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

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

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

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

17 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

ELITe InGenius ed ELITE BeGenius

Tabella 46

Reazione con Q-PCR Standard, curva standard o Positive Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore di impostazione dello strumento.	Controllare la posizione dei componenti Q-PCR Mix, Q-PCR Standard e Positive Control. Controllare i volumi dei componenti Q-PCR Mix, Q-PCR Standards e Positive Control.
Degradazione della Q-PCR Mix.	Non utilizzare la Q-PCR Mix per più di 5 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'Inventory Area, nel Cool Block o nella Cooler Unit). Non utilizzare la Q-PCR Mix per più di 3 sessioni consecutive (7 ore nell'Inventory Area, nel Cool Block o nella Cooler Unit). Non lasciare la Q-PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix.
Degradazione dei componenti Q-PCR Standard o del Positive Control.	Non utilizzare il Q-PCR Standard per più di 4 sessioni indipendenti (2 ore ciascuna nell'Extraction Area o nella Cooler Unit). Non utilizzare il Positive Control per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'Extraction Area o nella Cooler Unit). Utilizzare nuove aliquote dei Q-PCR Standard o del Positive Control.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 47

Reazione del controllo negativo non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix e di Negative Control. Controllare i volumi di Q-PCR Mix e Negative Control.
Contaminazione del Negative Control.	Non utilizzare il Negative Control per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix.
Contaminazione dell'Extraction Area, dei Rack, dell'Inventory Block o della Cooler Unit.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire le provette e i puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 48

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della Q-PCR Mix, dell'Internal Control e del campione. Controllare i volumi di Q-PCR Mix, Internal Control e campione.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la Q-PCR Mix per più di 5 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'Inventory Area o nella Cooler Unit). Non utilizzare la Q-PCR Mix per più di 3 sessioni consecutive (7 ore nell'Inventory Area, nel Cool Block o nella Cooler Unit). Non lasciare la Q-PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix.

Tabella 48 (segue)

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
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 eluito con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "PCR Only" (Solo PCR). Ripetere l'estrazione del campione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "Extract + PCR" (Estrazione + PCR).
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 49

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

Tabella 50

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

Tabella 51

Alto tasso anormale di risultati positivi nella stessa sessione (reazioni con valori Ct tardivi simili)	
Possibili cause	Soluzioni
Contaminazione da campione a campione durante le fasi pre-analitiche.	<p>Pulire la micropipetta, con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o un detergente per DNA/RNA, dopo aver pipettato ciascun campione.</p> <p>Non utilizzare le pipette Pasteur. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzate con puntali con filtro per aerosol.</p> <p>Introdurre campioni nelle ultime posizioni degli strumenti, come indicato dalla GUI. Seguire la sequenza di caricamento indicata dal software.</p>
Contaminazione ambientale del laboratorio.	<p>Pulire tutte le superfici che vengono a contatto con l'operatore e i campioni (incluse le pipette) con soluzione fresca di ipoclorito di sodio (candeggina) al 3% o detergente per DNA/RNA.</p> <p>Eseguire un ciclo di decontaminazione con U.V.</p> <p>Utilizzare una nuova provetta di Q-PCR Mix e/o di Internal Control.</p>

Piattaforma aperta**Tabella 52**

Reazione con Q-PCR Standard, curva standard o Positive Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata distribuzione nei pozzetti della micropiastra.	Controllare i volumi della PCR Mix, dei Q-PCR Standards e del Positive Control dispensati nella micropiastra (Q-PCR microplate).
Degradazione della Q-PCR Mix.	<p>Non congelare e scongelare la Q-PCR Mix più di 5 volte.</p> <p>Non lasciare la Q-PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti.</p> <p>Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix.</p>
Degradazione dei Q-PCR Standard o del Positive Control.	<p>Non congelare e scongelare il Q-PCR Standard più di 4 volte.</p> <p>Utilizzare nuove aliquote dei Q-PCR Standard o del Positive Control.</p>
Errata impostazione dello strumento.	<p>Controllare la posizione della PCR Mix, dei Q-PCR Standards e del Positive Control sullo strumento.</p> <p>Controllare le impostazioni del ciclo termico sullo strumento.</p>

Tabella 53

Reazione del Negative Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix e di Negative Control. Controllare i volumi di Q-PCR Mix e Negative Control.
Micropiastra coperta male.	Prestare attenzione quando si sigilla la Q-PCR microplate con il sigillo ottico.
Contaminazione del Negative Control.	Non utilizzare il Negative Control per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix.
Contaminazione dell'area di preparazione, dei rack e della micropipetta.	Pulire le superfici e gli strumenti con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire le provette e i puntali in uso.

Tabella 54

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della Q-PCR Mix, dell'Internal Control e del campione. Controllare i volumi di Q-PCR Mix, Internal Control e campione.
Degradazione della PCR Mix.	Non congelare e scongelare la Q-PCR Mix più di 5 volte. Non lasciare la Q-PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix.
Degradazione del template di Internal Control.	Utilizzare una nuova aliquota di Internal Control.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione del campione eluito con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare. Ripetere l'estrazione del campione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare.

Tabella 55

Fluorescenza di fondo irregolare o elevata nelle reazioni	
Possibili cause	Soluzioni
Errata distribuzione del campione.	Controllare i volumi dei reagenti e dei campioni dispensati nella micropiastra (Q-PCR microplate).
Errore di impostazione al basale.	Impostare l'intervallo di calcolo della "baseline" in un ambito di cicli in cui la fluorescenza di fondo sia già stabilizzata (controllare le registrazioni "Results", "Component") e la fluorescenza del segnale non abbia ancora cominciato a crescere, per esempio dal ciclo 6 al ciclo 15.

Tabella 56

Curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	Soluzioni
Assenza di un picco definito. Picco definito, ma differente rispetto a quello di altri campioni e degli Standard o del Positive Control.	Controllare che il valore Ct del target sia inferiore a 30. Elevate quantità di prodotti di amplificazione alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di melting. Ripetere la reazione di amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Il target nel campione deve essere sequenziato per confermare la mutazione.

18 LEGENDA DEI SIMBOLI



Numero di catalogo.



Limite superiore di temperatura.



Codice del lotto.



Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).



Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*.



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



Identificazione unica del dispositivo



Contenuto sufficiente per "N" test.



Consultare le istruzioni per l'uso.



Contenuto.



Conservare al riparo dalla luce del sole.



Fabbricante.

19 AVVISO PER L'UTILIZZATORE

Qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiedono l'utilizzatore e/o il paziente. Per informare ELITechGroup S. p. A., fabbricante del presente dispositivo, si prega di utilizzare il seguente indirizzo e-mail: egspa.vigilance@elitechgroup.com.

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

20 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 USA con numero di brevetto 7319022, 7348146, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8163910, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 e da brevetti EP numero di brevetto 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 inoltre sono state presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

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

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

Appendix A HSV1 ELITe MGB Kit utilizzato in associazione alle piattaforme della serie ®



ATTENZIONE

Il presente documento è una versione sintetica del manuale di istruzioni ufficiale. Fare riferimento al documento completo prima dell'uso: www.elitechgroup.com

Usò previsto

Il prodotto **HSV1 ELITe MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico *in vitro* destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come saggio di Real Time PCR quantitativa degli acidi nucleici per la **rilevazione e la quantificazione del DNA del virus dell'Herpes Simplex tipo 1 (HSV1)**, estratto da campioni clinici.

Il saggio è stato validato in associazione con gli strumenti **ELITe InGenius®** ed **ELITe BeGenius®**, che sono sistemi automatizzati e integrati per l'estrazione, la Real Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni umani di liquido cerebrospinale (CSF), sangue intero raccolto in EDTA e plasma raccolto in EDTA.

Infine il saggio è stato validato in associazione con il sistema automatico di estrazione e configurazione della PCR denominato **ELITe GALAXY** e con la piattaforma di Real Time PCR denominata **ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, utilizzando campioni umani di sangue intero raccolto in EDTA.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio delle infezioni da HSV1 in pazienti con sospetta infezione o sottoposti a monitoraggio per infezioni da HSV1.

I risultati devono essere interpretati in combinazione con tutte le osservazioni cliniche e i risultati di laboratorio pertinenti.


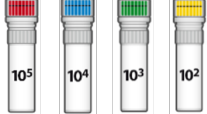

Sequenza amplificata

Sequenza	Gene	Fluoroforo	Canale
Target	Glicoproteina D (gpD)	FAM	HSV1
Internal Control	Gene della beta globina umana	AP525	IC

Matrice validata

- Sangue intero con EDTA
- Plasma raccolto in provette con EDTA
- CSF

Contenuto del Kit e prodotti correlati

HSV1 ELITe MGB Kit	HSV1 ELITe Standard	HSV1 - ELITe Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
PCR Mix pronta per l'uso 4 provette da 540 µl 96 reazioni per kit 5 cicli di congelamento/ scongelamento	Pronta per l'uso a 4 livelli: 10 ⁵ copie/rxn, 10 ⁴ copie/rxn, 10 ³ copie/rxn, 10 ² copie/rxn. 2 set di 4 provette da 200 µL 4 cicli di congelamento/scongelamento	Controllo positivo pronto per l'uso 2 provette da 160 µl 8 reazioni per kit 4 cicli di congelamento/ scongelamento

Validità massima: **24 mesi**Temperatura di conservazione: **-20 °C**

Altri prodotti richiesti ma non forniti nel kit

<ul style="list-style-type: none"> Strumento ELITe InGenius: INT030. Strumento ELITe BeGenius: INT040. ELITe InGenius SP 200: INT032SP200. 	<ul style="list-style-type: none"> CPE - Internal Control: CTRCPE ELITe InGenius ed ELITe BeGenius Consumable Set (vedere le Istruzioni per l'uso di ELITe InGenius ed ELITe BeGenius).
---	---

Protocollo ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

› Volume del campione	200 µL	› Volume di eluato in PCR	20 µL
› Volume di CPE	10 µL	› Volume Q—PCR Mix	20 µL
› Volume eluizione totale	100 µL	› Frequenza dei controlli	15 giorni

Prestazioni di ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Matrice	Limite di rilevabilità		Sensibilità diagnostica	Specificità diagnostica
	IU/mL	Copie/mL		
Sangue intero	46	230	100%	100%
Plasma	25	250	100%	100%
CSF	25	250	100%	100%

Preparazione dei campioni

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

Tipo di campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto/conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2/+8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Sangue intero	EDTA	≤1 d	≤3 d	≤30 d	≤30 d
Plasma	EDTA	≤1 d	≤3 d	≤30 d	≤30 d
CSF	-	≤4 ore	≤4 ore	≤30 gg	≤30 gg

C EDTA, acido etilendiamminotetraacetico; d, giorno.

Procedure di ELITE InGenius

L'interfaccia grafica utente (GUI) del software ELITE InGenius fornisce istruzioni passo-passo per configurare la sessione. Tutti i passaggi di estrazione, Real-Time PCR e interpretazione dei risultati vengono eseguiti in automatico. Sono disponibili due modalità operative: sessione completa (Extract + PCR) o PCR Only.

Prima dell'analisi

1. Accendere ELITE InGenius. Inserire username e password. Selezionare la modalità "Closed" (chiuso).	2. Verificare i calibratori: Q-PCR Standard nel menu "Calibration". Verificare i controlli: Positive Control e Negative Control nel menu "Controls". Nota: Tutti devono essere eseguiti, approvati e non scaduti.	3. Scongelare la PCR Mix e le provette CTRCPE . Mescolare delicatamente con agitatore vortex. Centrifugare per 5 sec.
---	--	---

Procedura 1 - Sessione completa: Extract + PCR (ad es. campioni)

1. Selezionare "Perform Run" sul touch screen	2. Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: "200 µL", eluizione: "100 µL"	3. Scansionare i codici a barre dei campioni con un lettore di codici a barre manuale o digitare l'ID campione
4. Selezionare l'"Assay Protocol" di interesse: HSV1 ELITE_WB_200_100 oppure HSV1 ELITE_PL_200_100 oppure HSV1 ELITE_CSF_200_100	5. Selezionare il metodo "Extract + PCR" e la posizione del campione: Provetta primaria o Extraction Tube	6. Caricare la miscela PCR Mix e l'Internal Control (IC) nell'Inventory Block
7. Caricare: PCR Cassette, cartuccia di estrazione, provetta di eluizione, cassetta per puntali, rack per provette di estrazione e rack per campioni primari	8. Chiudere lo sportello. Avviare la sessione	9. Visualizzare, approvare e archiviare i risultati

NOTA

Se è necessaria una modalità "Extract Only", fare riferimento al manuale d'istruzioni dello strumento per la procedura.

Procedura 2: PCR Only (ad es. eluati, standard, controlli)

1. Selezionare "Perform Run" sul touch screen	2. Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: "200 µL", eluizione: "100 µL"	3. Scansionare i codici a barre dei campioni con un lettore di codici a barre manuale o digitare l'ID campione
4. Selezionare l'"Assay Protocol" di interesse: HSV1 ELITE_PC e HSV1 ELITE_NC, oppure HSV1 ELITE_STD oppure HSV1 ELITE_WB_200_100 oppure HSV1 ELITE_PL_200_100 oppure HSV1 ELITE_CSF_200_100.	5. Selezionare il metodo "PCR Only" e impostare la posizione del campione "Elution Tube".	6. Caricare la miscela PCR Mix nell'Inventory Block
7. Caricare: rack PCR Cassette e provette contenenti la soluzione di eluizione con gli acidi nucleici estratti	8. Chiudere lo sportello. Avviare la sessione	9. Visualizzare, approvare e archiviare i risultati

Procedure di ELITE BeGenius

L'interfaccia grafica utente (GUI) del software ELITE BeGenius fornisce istruzioni passo-passo per configurare la sessione. Tutti i passaggi di estrazione, Real-Time PCR e interpretazione dei risultati vengono eseguiti in automatico. Sono disponibili due modalità operative: sessione completa (Extract + PCR) o PCR Only.

Prima dell'analisi

1. Accendere ELITE BeGenius. Inserire username e password. Selezionare la modalità "Closed" (chiuso).	2. Verificare i calibratori: Q-PCR Standard nel menu "Calibration". Verificare i controlli: Positive Control e Negative Control nel menu "Controls". Nota: Tutti devono essere eseguiti, approvati e non scaduti.	3. Scongela la PCR Mix e le provette CTRCPE . Mescolare delicatamente con agitatore vortex. Centrifugare per 5 sec.
---	--	---

Procedura 1 - Sessione completa: Extract + PCR (ad es. campioni)

1. Selezionare "Perform Run" sul touch screen, quindi fare clic sul run mode «Extract + PCR»	2. Inserire il "Sample Rack" contenente i campioni con il codice a barre nella "Cooler Unit". La scansione del codice a barre è già attiva	3. Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: "200 µL", Eluizione: "100 µL"
4. Selezionare l'"Assay Protocol" di interesse: HSV1 ELITE_Be_WB_200_100 oppure HSV1 ELITE_Be_PL_200_100 oppure HSV1 ELITE_Be_CSF_200_100 Nota: se si esegue una seconda estrazione, ripetere i passaggi da 2 a 4	5. Stampare le etichette per identificare con il codice a barre gli Elution Tube vuoti. Caricare i tubi nell'Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit.	6. Caricare la PCR Mix e l'Internal Control nel Reagent/Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit.
7. Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" e l'"Extraction Rack" con le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200" e i materiali di consumo per l'estrazione richiesti.	8. Chiudere lo sportello. Avviare la sessione	9. Visualizzare, approvare e archiviare i risultati

NOTA

Se è necessaria una modalità "Extract Only", fare riferimento al manuale d'istruzioni dello strumento per la procedura.

Procedura 2: PCR Only (ad es. eluati, standard, controlli)

<p>1. Selezionare "Perform Run" sul touch screen e fare clic sulla modalità di esecuzione "PCR Only".</p>	<p>2. Caricare le provette di acidi nucleici estratti o le provette con i controlli dotate di codice a barre nel rack di eluizione e inserirlo nella Cooler Unit</p>	<p>3. Per i controlli: per ogni "Position" inserire "Reagent name" e "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni). Per gli eluati: per ogni "Position" inserire i dati relativi a "Sample ID", "Sample matrix", "Extraction kit" ed "Extracted eluate vol." (volume eluato).</p>
<p>4. Selezionare l'"Assay Protocol" di interesse: HSV1 ELITE_Be_PC e HSV1 ELITE_Be_NC, oppure HSV1 ELITE_Be_STD oppure HSV1 ELITE_Be_WB_200_100 oppure HSV1 ELITE_Be_PL_200_100 oppure HSV1 ELITE_Be_CSF_200_100</p>	<p>5. Caricare la miscela di reazione completa nel Reagent/Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit.</p>	<p>6. Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette".</p>
<p>7. Chiudere lo sportello. Avviare la sessione</p>	<p>8. Visualizzare, approvare e archiviare i risultati</p>	

Appendix B HSV1 ELITe MGB Kit utilizzato in associazione con ABI 7500 Instrument



ATTENZIONE

Il presente documento è una versione sintetica del manuale di istruzioni ufficiale. Fare riferimento al documento completo prima dell'uso: www.elitechgroup.com

Usò previsto

Il prodotto **HSV1 ELITe MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico *in vitro* destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come saggio di Real Time PCR quantitativa degli acidi nucleici per la **rilevazione e la quantificazione del DNA del virus dell'Herpes Simplex tipo 1 (HSV1)**, estratto da campioni clinici.

Il saggio è stato validato in associazione con gli strumenti **ELITe InGenius®** ed **ELITe BeGenius®**, che sono sistemi automatizzati e integrati per l'estrazione, la Real Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni umani di liquido cerebrospinale (CSF), sangue intero raccolto in EDTA e plasma raccolto in EDTA.

Infine il saggio è stato validato in associazione con il sistema automatico di estrazione e configurazione della PCR denominato **ELITe GALAXY** e con la piattaforma di Real Time PCR denominata **ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, utilizzando campioni umani di sangue intero raccolto in EDTA.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio delle infezioni da HSV1 in pazienti con sospetta infezione o sottoposti a monitoraggio per infezioni da HSV1.

I risultati devono essere interpretati in combinazione con tutte le osservazioni cliniche e i risultati di laboratorio pertinenti.


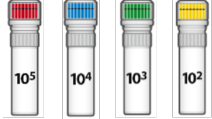

Sequenza amplificata

Sequenza	Gene	Fluoroforo	Canale
Target	Glicoproteina D (gpD)	FAM	HSV1
Internal Control	Gene della beta globina umana	AP525	IC

Matrice validata

- Sangue intero con EDTA

Contenuto del Kit e prodotti correlati

HSV1 ELITe MGB Kit	HSV1 ELITe Standard	HSV1 - ELITe Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
PCR Mix pronta per l'uso 4 provette da 540 µL 96 reazioni per kit 5 cicli di congelamento/ scongelamento	Pronta per l'uso a 4 livelli: 10 ⁵ copie/reaz., 10 ⁴ copie/reaz., 10 ³ copie/ reaz., 10 ² copie/reaz. 2 set di 4 provette da 200 µL 8 cicli di congelamento/scongelamento	Positive Control pronto per l'uso 2 provette da 160 µL 8 reazioni per kit 8 cicli di congelamento/ scongelamento

Validità massima: **24 mesi**

Temperatura di conservazione: **-20 °C**

Altri prodotti richiesti ma non forniti nel kit

<ul style="list-style-type: none"> • ELITE GALAXY: INT020 • ELITE GALAXY 300 extraction kit: INT021EX • ABI 7500 Fast Dx Real—Time PCR Instrument 	<ul style="list-style-type: none"> • CPE - Internal Control: CTRCPE • Acqua per biologia molecolare
---	---

Prestazioni di 7500 Real-Time PCR Instrument

Matrice	Limite di rilevabilità	Specificità diagnostica	Sensibilità diagnostica	Linearità (IU/mL)	Formula per quantificare (copie/mL)	Fattore di conversione da copie/mL a IU/ mL
Sangue intero	42,2 UI/mL	100%	100%	2,0 – 2,0 x 10 ⁵	35 x Quantità	0,2

Procedure di 7500 Real-Time PCR Instrument

La procedura riportata di seguito riassume le fasi principali dell'analisi del campione con il flusso di lavoro PCR convenzionale: sistemi di estrazione convalidati, impostazioni dello strumento PCR, configurazione PCR e interpretazione dei risultati.

Estrazione - Sistemi validati

Estrazione	Matrice validata	Volume di campione processato	Volume di campione min.	Volume di eluato totale	Volume CPE dell'Internal Control
ELITE Galaxy	WB	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL

Amplificazione - Impostazioni di 7500 Fast Dx

1. Accendere il termociclatore
2. Impostare il rilevatore (detector) di "HSV1" con "FAM" e quencher su "none"
3. Impostare il rilevatore di "Internal Control" con "VIC" e quencher "none"
4. Impostare la fluorescenza passiva su "Cy5"
5. Impostare il profilo termico come indicato. L'acquisizione della fluorescenza deve essere impostata durante la fase di ibridazione a 60 °C.

Fase	Temperatura	Durata
Decontaminazione	50 °C	2 min
Denaturazione iniziale	94 °C	2 min
Amplificazione Rilevazione 45 cicli	94 °C	10 s
	60 °C	30 s
	72 °C	20 s

L'analisi della curva di melting è facoltativa, consultare le istruzioni per l'uso complete.

Amplificazione - Preparazione della PCR (eseguita da ELITE GALAXY)

Per eseguire la configurazione della sessione PCR:

1. Scongellare le provette di Q PCR-Mix e di Positive Control/Q-PCR Standard

2. Agitare delicatamente e centrifugare
3. Preparare il **Negative Control** (non fornito)
4. Preparare la **Q-PCR microplate**
5. Lo strumento esegue automaticamente la configurazione della PCR dispensando in ciascun pozzetto della **Q-PCR microplate 20 µL** della **PCR Mix** e **20 µL** di **DNA estratto / Q-PCR Standard / Controls**.

Una volta completata la configurazione della PCR da parte dello strumento:

1. sigillare la **Q-PCR microplate** con un sigillo ottico
2. trasferire la **Q-PCR microplate** nella piattaforma **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** e avviare la PCR. Salvare il file di esecuzione con un nome unico e riconoscibile (ad esempio "anno-mese-giorno-TARGET-EGSpA").

Amplificazione - Soglia per l'analisi qualitativa

Strumento	HSV1 FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0,2	0,1

Interpretazione

Risultati quantitativi		
Valore Ct dell'HSV1	Valore Ct dell'Internal Control	Interpretazione
Determinato	—	Positivi
Non determinato	Ct ≤35	Negativi
	Ct >35 o Non determinato	Non valido*

**Ripetere il test partendo dall'estrazione*

Risultati quantitativi
Il valore Ct dell'HSV1 ottenuto per ciascun campione e la curva standard generata vengono utilizzati per calcolare la quantità di DNA target nella reazione.
Gli intervalli di quantificazione del campione vanno da circa 10 a 10 ⁶ copie/reazione.

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

