ELITechGroup
EMPOWERING IVD

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

AVVERTENZA del 28/10/2022

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«HSV2 ELITe MGB® Kit»
Ref. RTS032PLD

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Aggiornamento per l'uso del prodotto in associazione con lo strumento «ELITe BeGenius®» (REF INT040) e la matrice Liquido Cefalorachidiano;*
- *Introdotto il valore cut-off del Ct per il Controllo interno in associazione agli strumenti «ELITe InGenius®» (REF INT030) e «ELITe BeGenius®» (REF INT040)*

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

NOTA BENE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT

ELITechGroup
EMPOWERING IVD

ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALY
Uffici: Tel. +39-011 9/6 191 Fax +39-011 936 76 11
E. mail: emd.support@elitechgroup.com
sito WEB: www.elitechgroup.com

HSV2 ELITe MGB® Kit

reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF **RTS032PLD** CE **IVD** -20°C

SOMMARIO

USO PREVISTO	**pag. 2**
PRINCIPIO DEL SAGGIO	**pag. 2**
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	**pag. 3**
MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO	**pag. 3**
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO	**pag. 3**
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	**pag. 3**
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	**pag. 5**
ELITe InGenius	**page 6**
CAMPIONI E CONTROLLI	**page 6**
PROCEDURA ELITe InGenius	**page 7**
ELITe BeGenius	**page 14**
CAMPIONI E CONTROLLI	**page 14**
PROCEDURA ELITe BeGenius	**page 15**
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI ELITe InGenius and ELITe BeGenius	**page 20**
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	**pag. 29**
CAMPIONI E CONTROLLI	**pag. 29**
PROCEDURA	**pag. 31**
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	**pag. 39**
Roche cobas z 480 analyzer	**pag. 43**
CAMPIONI E CONTROLLI	**pag. 43**
PROCEDURA	**pag. 44**
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	**pag. 49**
BIBLIOGRAFIA	**pag. 51**
LIMITI DELLA PROCEDURA	**pag. 51**
PROBLEMI E SOLUZIONI	**pag. 52**
LEGENDA DEI SIMBOLI	**pag. 54**
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	**pag. 55**

USO PREVISTO

Il prodotto **«HSV2 ELITe MGB® Kit»** è parte di un saggio qualitativo e quantitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la **rilevazione e quantificazione del DNA del virus umano Herpes Simplex di tipo 2 (HSV2)** in campioni di DNA estratto da liquido cefalorachidiano (liquor), sangue intero raccolto in EDTA, plasma raccolto in EDTA.

Il prodotto trova impiego nella diagnosi e nel monitoraggio dell'infezione da HSV2 insieme ai dati clinici del paziente e agli esiti di altri esami di laboratorio.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

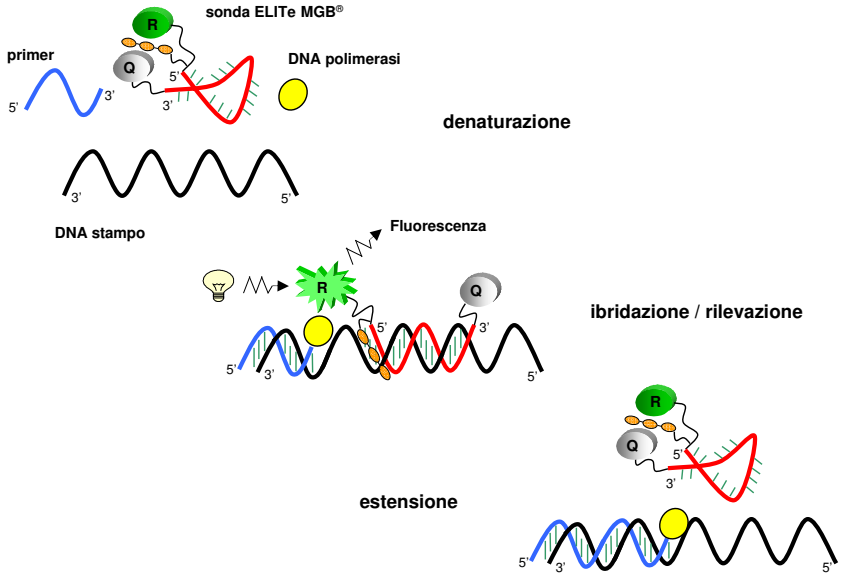
Il saggio prevede l'esecuzione di una reazione di amplificazione real time con un termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza (amplificazione real time).

In ogni pozzetto si effettuano due reazioni di amplificazione: una specifica per la regione del gene codificante la **glicoproteina G (gpG)** di HSV2 e una specifica per la regione del gene umano codificante la **beta Globina** (Controllo Interno di inibizione) utilizzando il DNA estratto dai campioni in esame. La sonda con tecnologia ELITe MGB® specifica per HSV2 marcata con il fluoroforo FAM è attivata quando ibrida con il prodotto specifico della reazione di amplificazione per HSV2. La sonda con tecnologia ELITe MGB® specifica per il Controllo Interno marcata con il fluoroforo AP525 (equivalente a VIC) è attivata quando ibrida con il prodotto della reazione di amplificazione per il Controllo Interno. L'emissione della fluorescenza aumenta con l'aumentare dei prodotti specifici della reazione di amplificazione ed è misurata e registrata dall'apparecchio. L'elaborazione dei dati permette di rilevare la presenza e il titolo del DNA di HSV2 nel campione di partenza.

A fine sessione è possibile eseguire l'analisi della curva di dissociazione (melting curve) ed identificare la temperatura di dissociazione (melting temperature) per confermare la presenza del target corretto o identificare la presenza di mutazioni.

Il saggio è stato validato sui sistemi riportati su questo manuale di istruzioni.

Nella figura di seguito è illustrato in sintesi il meccanismo di attivazione e di emissione della fluorescenza della sonda con tecnologia ELITe MGB®. Notare come la sonda non è idrolizzata durante il ciclo di amplificazione e può quindi essere utilizzata per l'analisi della curva di dissociazione.



DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **«HSV2 ELITe MGB Kit»**, fornisce la miscela di reazione completa e **pronta all'uso "HSV2 Q - PCR Mix**" per l'amplificazione real time in una soluzione stabilizzante, **prealiquotata in quattro provette**. Ogni provetta contiene **540 µL** di soluzione, sufficiente per **24 test** in associazione al sistema **«ELITe InGenius®»** e **«ELITe BeGenius®»** e **25 test** in associazione ad altri sistemi.

Gli oligonucleotidi di innesco e la sonda per HSV2 (stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo FAM e inattivata da un quencher non fluorescente) sono specifici per una regione del gene codificante la **gpG** di HSV2 (regione US4).

Gli oligonucleotidi di innesco e la sonda per il Controllo Interno (stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo AP525, equivalente a VIC, e inattivata da un quencher non fluorescente) sono specifici per la regione **promotore e 5' UTR** del **gene umano codificante la beta Globina**.

La miscela di reazione fornisce il tampone, il magnesio cloruro, i nucleotidi trifosfati, il fluoroforo AP593, usato invece del ROX o del CY5 come riferimento passivo per la normalizzazione della fluorescenza, l'enzima Uracil-N-glicosidasi (UNG) per l'inattivazione delle contaminazioni da prodotto di amplificazione, l'enzima DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

Il kit consente di effettuare **96 determinazioni in associazione con «ELITe InGenius»** e **«ELITe BeGenius»**, standard e controlli compresi.

Il prodotto consente di effettuare **100 determinazioni in associazione ad altri sistemi**, standard e controlli compresi.

MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei pericoli
HSV2 Q - PCR Mix	miscela completa di reazione	**4 x 540 µL**	**-**

MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o simili.
- Miscelatore vortex.
- Microcentrifuga da banco (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a dispensazione positiva (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Acqua ultrapura per biologia molecolare.
- Termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza 7300 Real-Time PCR System o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument calibrato come previsto dal fabbricante.
- Termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza cobas z 480 analyzer calibrato come previsto dal fabbricante.

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA dai campioni da analizzare, il controllo positivo di estrazione, il controllo positivo di amplificazione, i DNA standard a quantità nota e i consumabili **non** sono inclusi in questo prodotto.

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione real time e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare con lo strumento **«ELITe InGenius»** (ELITechGroup S.p.A., codice INT030), è richiesto l'impiego dei seguenti prodotti generici: cartucce di estrazione **«ELITe InGenius SP 200»** (ELITechGroup S.p.A., codice INT032SP200), e materiali di consumo per estrazione ed amplificazione da campioni biologici **«ELITe InGenius SP 200 Consumable Set»** (ELITechGroup S.p.A., codice SCH mINT032CS), **«ELITe InGenius Waste Box»** (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000), **«ELITe InGenius PCR Cassette»** (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR) e **«300 µL Filter Tips Axygen»** (Axygen BioScience Inc., CA, USA, codice TF-350-L-R-S).

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione real time e

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS032PLD

dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare sono richiesti lo strumento **«ELITe InGenius»** (ELITechGroup S.p.A., codice INT030) e i seguenti Assay protocols specifici (ELITechGroup S.p.A.):

- per il calibratore **«HSV2 ELITe_STD »**,
- per il controllo positivo di amplificazione **«HSV2 ELITe_PC»**,
- per il controllo negativo di amplificazione **«HSV2 ELITe_NC»**,
- per i campioni in analisi **«HVS2 ELITe _WB_200_100»**, **«HSV2 ELITe _PL_200_100»**. e **«HSV2 ELITe _CSF_200_100»**.

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione real time e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare con lo strumento **«ELITe BeGenius»** (ELITechGroup S.p.A., codice INT040), è richiesto l'impiego dei seguenti prodotti generici: cartucce di estrazione **«ELITe InGenius® SP 200»** (ELITechGroup S.p.A., codice INT032SP200), e materiali di consumo per estrazione ed amplificazione da campioni biologici **«ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set»** (ELITechGroup S.p.A., codice INT032CS), **«ELITe InGenius® Waste Box»** (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000), **«ELITe InGenius® PCR Cassette»** (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR) e **«1000 µL Filter Tips Tecan»** (Tecan, Switzerland, codice. 30180118).

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione real time e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare sono richiesti lo strumento **«ELITe BeGenius»** (ELITechGroup S.p.A., codice INT040) e i seguenti Assay Protocols specifici (ELITechGroup S.p.A.):

- per il calibratore **«HSV2 ELITe_Be_STD»**,
- per il controllo positivo di amplificazione **«HSV2 ELITe_Be_PC»**,
- per il controllo negativo di amplificazione **«HSV2 ELITe_Be_NC»**,
- per i campioni in analisi **«HSV2 ELITe_Be_WB_200_100», «HSV2 ELITe_Be_PL_200_100» e «HSV2 ELITe_Be_CSF_200_100»**.

Per l'estrazione automatica del DNA dai campioni da analizzare, è validato l'impiego del prodotto generico **«ELITe STAR 200 Extraction Kit»** (ELITechGroup S.p.A., codice INT011EX), kit di estrazione di RNA e DNA da campioni cellulari e non cellulari, con lo strumento **«ELITe STAR»** (ELITechGroup S.p.A., codice INT010).

Per l'estrazione automatica del DNA e la preparazione della micropiastra di amplificazione dei campioni da analizzare, è validato l'impiego del prodotto generico **«ELITe GALAXY 300 Extraction Kit»** (ELITechGroup S.p.A., codice INT021EX), kit di estrazione degli acidi nucleici da campioni biologici, con lo strumento **«ELITe GALAXY»** (ELITechGroup S.p.A., codice INT020).

Per l'estrazione automatica del DNA dai campioni da analizzare è anche validato l'impiego dei prodotti generici **«NucliSENS® easyMAG® Reagents»** (bioMérieux SA, codici 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), kit di estrazione degli acidi nucleici da campioni biologici con lo strumento **«NucliSENS® easyMAG®»** (bioMérieux SA, codice 200111).

Per l'estrazione automatica del DNA dai campioni da analizzare è anche validato l'impiego dei prodotti **«QIAsymphony® DNA Mini Kit»** (QIAGEN GmbH, code 931236) e **«QIAsymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit»** (QIAGEN GmbH, codice 937055), kit di estrazione degli acidi nucleici da campioni biologici, con lo strumento **«QIAsymphony® SP/AS»** (QIAGEN GmbH, codici 9001297, 9001301) e relativi prodotti generici.

Per l'estrazione automatica del DNA dai campioni da analizzare, è anche validato l'impiego del prodotto generico **«MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit»** (Roche, codice 07658036001), kit di estrazione degli acidi nucleici da campioni biologici, con lo strumento **«MagNA Pure 24 System»** (Roche, codice 07290519001).

Come controllo positivo di estrazione di acidi nucleici da campioni non cellulari e controllo di inibizione è richiesto l'impiego del prodotto generico **«CPE - Internal Control»** (ELITechGroup S.p.A., codice CTRCPE), una soluzione stabilizzata contenente due DNA plasmidici e RNA genomico di fago MS2.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento 7300 Real-Time PCR System, è richiesto l'impiego dei prodotti generici **«MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate»** (Life Technologies., codice N8010560) micropiastre con pozzetti da 0,2 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, è richiesto l'impiego dei prodotti generici **«MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL»** (Life Technologies., codice 4346906) micropiastre con pozzetti da 0,1 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento cobas z 480 analyzer, si consiglia l'impiego del prodotto generico **«AD-plate 0.3ml»** (Roche, codice 05232724001), micropiastre con pozzetti da 0,3 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Nel caso sia richiesta la rilevazione del DNA di HSV2 (analisi qualitativa) è richiesto l'impiego del

prodotto di ELITechGroup S.p.A. **«HSV2 - ELITe Positive Control»** (codice CTR032PLD), o del prodotto di ELITechGroup S.p.A. **«HSV2 - ELITe Positive Control RF»** (codice CTR032PLD-R) specifico per l'utilizzo con lo strumento cobas z 480 analyzer, controllo positivo di DNA plasmidico.

Nel caso sia richiesta la rilevazione e quantificazione del DNA di HSV2 è richiesto l'impiego del prodotto **«HSV2 ELITe Standard»** (ELITechGroup S.p.A., codice STD032PLD), quattro diluizioni di DNA plasmidico a quantità nota per ottenere la curva standard.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

Avvertenze e precauzioni generali

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

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

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi / la faccia.
Non pipettare a bocca alcuna soluzione.
Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree di lavoro.
Lavarsi bene le mani dopo avere maneggiato i campioni e i reagenti.
Eliminare i reagenti avanzati ed i rifiuti secondo le norme vigenti.
Leggere attentamente tutte le istruzioni fornite nel prodotto prima di eseguire il saggio.
Attenersi alle istruzioni fornite nel prodotto durante l'esecuzione del saggio.
Rispettare la data di scadenza del prodotto.
Utilizzare solo i reagenti presenti nel prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.
Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.
Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

Le procedure di biologia molecolare, come l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione di acidi nucleici, richiedono personale competente e addestrato per evitare il rischio di risultati errati, in particolare a causa della degradazione degli acidi nucleici dei campioni o della contaminazione dei campioni da parte di prodotti di amplificazione.

Per l'allestimento manuale è necessario disporre di aree separate per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione. Mai introdurre un prodotto di amplificazione nell'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.

Per l'allestimento manuale è necessario disporre di camici, guanti e strumenti dedicati per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione. Mai trasferire camici, guanti e strumenti dall'area per l'amplificazione/ rilevazione dei prodotti di amplificazione all'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.

I campioni devono essere dedicati esclusivamente a questo tipo di analisi. I campioni devono essere manipolati sotto una cappa a flusso laminare. Provette contenenti campioni diversi non devono mai essere aperte contemporaneamente. Le pipette utilizzate per manipolare i campioni devono essere dedicate solo a questo uso. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, esenti da DNasi ed RNasi, esenti da DNA ed RNA.

I reagenti devono essere manipolati sotto una cappa a flusso laminareLe pipette utilizzate per manipolare i reagenti devono essere dedicate solo a questo uso. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per gli aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, esenti da DNasi ed RNasi, esenti da DNA ed RNA.

I prodotti di amplificazione devono essere manipolati in modo da limitarne al massimo la dispersione nell'ambiente per evitare la possibilità di contaminazioni. Le pipette utilizzate per manipolare i prodotti di amplificazione devono essere dedicate solo a questo uso.

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

La **HSV2 Q - PCR Mix** deve essere conservata al buio a -20° C.

La **HSV2 PCR Mix** deve essere utilizzata entro un mese dalla prima apertura del tubo.

La **HSV2 Q - PCR Mix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **cinque volte**: ulteriori

cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

ELITe InGenius

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con **i** seguenti campioni clinici:

Sangue intero raccolto in EDTA

I campioni di sangue intero destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni, altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

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

Nota bene: l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con **ELITe InGenius** e con **ELITe InGenius Software** versione 1.1 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **HSV2 ELITe_WB_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Quando si usa il tubo primario, il volume del campione varia in base al tipo di tubo caricato. Fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione per ulteriori informazioni e per l'allestimento della procedura di estrazione.

Plasma raccolto in EDTA

I campioni di plasma destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni, altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

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

Nota bene: l'estrazione del DNA da campioni di plasma con **ELITe InGenius** e con **ELITe InGenius Software** versione 1.1 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **HSV2 ELITe_PL_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Quando si usa il tubo primario, il volume del campione varia in base al tipo di tubo caricato. Fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione per ulteriori informazioni e per l'allestimento della procedura di estrazione.

Liquido cefalorachidiano CSF (liquor)

I campioni di liquor destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti secondo le linee guida di laboratorio evitando la contaminazione con il sangue del paziente, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di quattro ore, altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi. Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: l'estrazione del DNA da campioni di liquor con **ELITe InGenius** e con **ELITe InGenius Software** versione 1.1 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **HSV2 ELITe_CSF_200_100.** Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Quando si usa il tubo primario, il volume del campione varia in base al tipo di tubo caricato, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione per ulteriori informazioni.

Altri campioni:

Al momento non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con altri campioni clinici come: sospensione di leucociti, sospensione di granulociti e liquido amniotico.

Sostanze interferenti

Il DNA estratto dal campione di partenza non deve contenere eparina per evitare fenomeni di inibizione e la comparsa di frequenti risultati non validi.

Quantità di DNA genomico umano elevate nel DNA estratto dal campione possono inibire la reazione di amplificazione.

Non sono disponibili dati riguardo eventuali fenomeni di inibizione da parte di farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

Controlli di amplificazione

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

come Calibratori, utilizzare i quattro livelli di concentrazione del **HSV2 ELITe Standard**, in associazione con il protocollo **«HSV2 ELITe_STD»**
come Controllo Positivo di amplificazione, utilizzare **HSV2 - ELITe Positive Control**, in associazione con il protocollo **«HSV2 ELITe_PC»**
come Controllo Negativo di amplificazione, utilizzare l'acqua ultrapura per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con il protocollo **«HSV2 ELITe_NC»**.

Nota bene: Il sistema **ELITe InGenius** richiede una curva di calibrazione e la validazione dei risultati di controllo dell'amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione memorizzato nel suo database.
Le curve di calibrazione, approvate e memorizzate nel database, scadranno dopo **60 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente l'impostazione della calibrazione.
La validazione dei risultati dei controlli dell'amplificazione, approvati e memorizzati nel database, scadrà dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario ri-eseguire i controlli positivi e negativi.

I calibratori e i controlli di amplificazione devono essere ritestati se capita uno dei seguenti eventi:
- Si utilizza un nuovo lotto di reagenti di amplificazione,
- I risultati delle analisi di controllo di qualità (vedi paragrafo successivo) sono fuori dalle specifiche,
- Viene eseguito un intervento di manutenzione sullo strumento.

Controlli di qualità

I controlli esterni di qualità devono essere utilizzati in conformità a leggi locali, statali, organizzazioni di accreditamento federali. I controlli esterni di qualità sono disponibili in commercio.

PROCEDURA ELITe InGenius

La procedura di utilizzo del prodotto **«HSV2 - ELITe MGB Kit»** con il sistema ELITe InGenius comprende tre fasi:
- Verifica che il sistema sia pronto
- Impostazione della sessione
- Esame e approvazione dei risultati

Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
- accendere **ELITe InGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**";
- verificare che i calibratori (Calibration-**HSV2 Q-PCR Standard**) siano processati, approvati e non scaduti (status). Questo può essere controllato dal menu "Calibration" nella Home page;
- verificare che i controlli di amplificazione (Controls - **HSV2 Positive Control, HSV2 Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (status). Questo può essere verificato dal menu "Control" nella Home page;
- scegliere il tipo di corsa, seguendo le istruzioni della Graphical User Interface (GUI) per impostare la sessione utilizzando i protocolli dei saggi forniti da ELITechGroup. Questi protocolli IVD sono stati validati specificamente con i kit ELITe MGB, le matrici e lo strumento ELITe InGenius.

I protocolli del saggio disponibili per analizzare i campioni con il prodotto **«HSV2 ELITe MGB Kit»** sono descritti nella tabella seguente.

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA
REF RTS032PLD

Protocolli dei saggi per «HSV2 ELITe MGB Kit»			
Nome	**Matrice**	**Unità di misura**	**Caratteristiche**
HSV2 ELITe MGB Kit_WB_200_100	Sangue Intero	copie/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Elutato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
HSV2 ELITe MGB Kit_PL_200_100	Plasma	copie/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Elutato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
HSV2 ELITe MGB Kit_CSF_200_100	Liquor	copie/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Elutato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL

Se il protocollo del saggio di interesse non è presente nel sistema, contattare il Servizio Clienti locale di ELITechGroup.

I protocolli per l'analisi qualitativa sono disponibili su richiesta.

Impostazione della sessione

HSV2 ELITe MGB Kit in associazione a **ELITe InGenius** può essere utilizzato per eseguire:
A. Corsa integrata (Extract + PCR),
B. Corsa di amplificazione (PCR only),
C. Corsa di Calibrazione (PCR only),
D. Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo (PCR only)

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

Nota bene: il sistema ELITe InGenius può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile inviare le informazioni di impostazione della sessione. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Le principali operazioni per l'impostazione dei quattro tipi di corsa sono descritte di seguito.

A Corsa integrata

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

1. Scongelare a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti i campioni da analizzare e trattarle secondo le linee guida del laboratorio e secondo quanto disposto nel paragrafo "Campioni e controlli".
2. Scongelare i tubi di HSV2 Q - PCR Mix per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Nota: Scongelare la miscela HSV2 Q - PCR Mix al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

3. Scongelare il tubo di CPE per la sessione. Ogni tubo è sufficiente per 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
4. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
5. Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
6. Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.

7. Selezionare il protocollo del test da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio HSV2 ELITe_WB_200_100).
8. Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
9. Selezionare la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position":
   se un tubo primario è utilizzato, selezionare "Primary Tube";
   se un tubo secondario è utilizzato, selezionare "Sonication Tube".
   Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare il CPE e la HSV2 Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'Inventory Area selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Caricare le "PCR Cassette", le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200", tutti i consumabili e i campioni da estrarre nella posizione indicata al punto 8, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Chiudere lo sportello dello strumento.
14. Premere "Start" per avviare la corsa.

Una volta completata la procedura, l'**ELITe InGenius** permette all'operatore di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Quando il sistema è inattivo, la porta può essere aperta (End of Run) e i materiali di consumo rimossi dallo strumento.

Nota bene: Alla fine della corsa il campione estratto rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 °C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

Nota bene: La PCR Mix può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 16 ore totali.

B Corsa di amplificazione

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

1. Scongelare i tubi di HSV2 Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Nota: Scongelare la miscela HSV2 Q - PCR Mix al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
3. Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
4. Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
5. Selezionare il protocollo del test da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio HSV2 ELITe_WB_200_100).
6. Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
7. Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione eluato nella colonna "Sample Position" sia "ExtraTube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Caricare HSV2 Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'Inventory Area selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare i campioni degli acidi nucleici estratti e le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per continuare l'operazione successiva.

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA
REF RTS032PLD

11. Chiudere la porta dello strumento,
12. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Una volta completata la procedura, l'**ELITe InGenius** permette all'operatore di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: Alla fine della corsa il campione estratto rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato identificato e conservato a -20 ° C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

Nota bene: La PCR Mix può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 16 ore totali.

C Corsa di calibrazione

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

1. Scongelare i tubi di HSV2 Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Nota: Scongelare la miscela HSV2 Q - PCR Mix al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Scongelare i tubi di HSV2 Q - PCR Standard (Cal1: HSV2 Q-PCR Standards 10^2, Cal2: HSV2 Q-PCR Standards 10^3, Cal3: HSV2 Q-PCR Standards 10^4, Cal4: HSV2 Q-PCR Standards 10^5). Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
4. Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
5. A partire dal "Track" di interesse, selezionare il protocollo di dosaggio da utilizzare nella colonna "Assay" (HSV2 ELITe_STD) e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per il HSV2 Q - PCR standard. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
6. Caricare HSV2 Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva
7. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'Inventory Area selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere l'operazione successiva.
8. Caricare i tubi di calibrazione e le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva. Fare attenzione a caricare gli standard nella corretta posizione, seguendo le istruzioni GUI
9. Chiudere la porta dello strumento,
10. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Una volta completata la procedura, l'**ELITe InGenius** permette all'operatore di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

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

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

Nota bene: La PCR Mix può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 16 ore totali.

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

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

1. Scongelare i tubi di HSV2 Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Nota: Scongelare la miscela HSV2 Q - PCR Mix al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Scongelare il prodotto HSV2 - Positive Control per l'amplificazione del Controllo Positivo. Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Trasferire almeno 50 µL di acqua ultrapura per biologia molecolare in una provetta di eluizione, fornita con ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
5. A partire dal "Track" di interesse, selezionare il protocollo di dosaggio da utilizzare nella colonna "Assay".
6. Selezionare HSV2 ELITe_PC per il controllo positivo e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per HSV2 Positive Control (Controllo Positivo),
7. Selezionare HSV2 ELITe_NC e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per il Controllo Negativo HSV2.
8. Fare clic su "Next" per continuare l'operazione successiva.
9. Caricare HSV2 Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'Inventory Area selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare la "PCR Cassette", Il Controllo Positivo e il tubo di controllo negativo seguendo le istruzioni GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Chiudere la porta dello strumento,
13. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Una volta completata la procedura, l'**ELITe InGenius** permette all'operatore di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota: Il Controllo Positivo deve essere eseguito come controllo di amplificazione, per impostare la carta di controllo. Quattro (4) valori controllo positivo, da 4 sedute diverse sono richiesti per impostare la carta di controllo. Dopo di che, i valori del controllo positivo sono utilizzati per monitorare la fase di amplificazione. Fare riferimento al manuale d'uso dello strumento per ulteriori dettagli.

Nota: Alla fine della corsa il Controllo Positivo rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 °C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

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

Nota: La PCR Mix può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 16 ore totali.

Esame e approvazione dei risultati

L'ELITe InGenius monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ogni reazione e applica automaticamente i parametri del protocollo di analisi per generare curve di PCR che vengono poi interpretate in risultati.

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

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

Nota: Il sistema **ELITe InGenius** può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA
REF RTS032PLD

è possibile inviare i risultati della sessione di lavoro al centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Nota Bene: Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento **ELITe InGenius**.

ELITe InGenius genera i risultati con **«HSV2 ELITe MGB Kit»** attraverso questa procedura:

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

A. Validazione della curva di calibrazione

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per HSV2 ("HSV2"), nelle reazioni di amplificazione del calibratore sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nel protocollo del saggio "HSV2 ELITe_STD ".

La curva di calibrazione, specifica per il lotto del reagente di amplificazione, è memorizzata nel database (Calibration) e può essere visualizzata e approvata da parte del personale con la qualifica di "Amministratore" o "Analyst", seguendo le istruzioni GUI.

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

Prima di analizzare ogni campione, è assolutamente obbligatorio generare e approvare la curva di calibrazione per il lotto di reagente di amplificazione utilizzato. La disponibilità di una curva di calibrazione e i risultati del controllo di amplificazione "Approved" (Status) sono visualizzati nella finestra "Calibration" del software ELITe InGenius.

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

Nota: Nel caso in cui la curva di calibrazione sia caricata insieme ai campioni ed il risultato non sia valido, l'intera sessione non sarà valida e l'amplificazione di tutti i campioni dovrà essere ripetuta.

B. Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per HSV2 ("HSV2") e dalla sonda specifica per il Controllo Interno ("IC"), nelle reazioni di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nei protocolli del saggio "HSV2 ELITe_PC" e "HSV2 ELITe_NC" I valori Ct risultanti vengono utilizzati per convalidare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, scadono dopo **15 giorni.**

Prima di analizzare un campione dopo l'approvazione della curva di calibrazione è necessario verificare la presenza di un risultato dell'amplificazione del Controllo Positivo approvato e valido per il lotto di PCR Mix che si intende utilizzare. La disponibilità del risultato del Controllo Positivo di amplificazione "Approved" (Status) è visualizzata nella finestra "Controls" della GUI. Se non è presente un risultato del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione approvato e valido, generarlo come descritto sopra.

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

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

Nota: Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo vengono trattati insieme con i campioni da analizzare ed il suo risultato non è valido, i campioni possono essere approvati, ma i risultati non sono validati. In questo caso anche l'amplificazione dei campioni deve essere ripetuta.

C. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per HSV2 ("HSV2") e dalla sonda specifica per il Controllo Interno ("IC"), in ogni reazione di amplificazione sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay Protocols HSV2 ELITe_WB_200_100, HSV2 ELITe_PL_200_100 and HSV2 ELITe_CSF_200_100.

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

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

1) Curva di calibrazione	**Status**
HSV2 Q-PCR Standard	APPROVED
2) Controllo Positivo	**Status**
HSV2 Positive Control	APPROVED
3) Controllo Negativo	**Status**
HSV2 Negative Control	APPROVED

Per ciascun campione il risultato del saggio è interpretato automaticamente dal sistema come stabilito dall'algoritmo dell'**ELITe InGenius software** e dai parametri del protocollo del saggio.

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

Risultato di una sessione sul campione	**Interpretazione**
HSV2: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL	**DNA di HSV2 rilevato** nell'intervallo di misurazione del saggio, quantità come mostrato.
HSV2: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL	**DNA di HSV2 rilevato** al di sotto del limite inferiore di quantificazione del saggio
HSV2: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL	**DNA di HSV2 rilevato** al di sopra del limite superiore di quantificazione del saggio
HSV2: DNA Not Detected or below LoD copies / mL	**DNA di HSV2 non rilevato o inferiore al Limite di Rilevazione** del saggio. Il campione è negativo per l'HSV2 DNA oppure la sua concentrazione è inferiore al Limite di Rilevazione (LoD) del saggio.
Invalid - Retest Sample	**Risultato del saggio non valido** a causa di un problema rilevato dal il Controllo Interno (estrazione errata, presenza di un inibitore o errore di campionamento). Il test dovrebbe essere ripetuto.

I campioni segnalati come "HSV2: DNA Detected, quantity below LLoQ", non sono adatti alla quantificazione. La concentrazione di DNA HSV2 rilevata nel campione è inferiore al livello in cui può essere accuratamente quantificata (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni"). Se il campione è stato diluito prima dell'estrazione o della PCR, può essere analizzato nuovamente senza diluizione.

I campioni segnalati come "HSV2: DNA Detected, quantity beyond ULoQ", non sono adatti alla quantificazione. La concentrazione di DNA HSV2 rilevata nel campione è superiore al livello in cui può essere accuratamente quantificata (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni"). Il campione può essere diluito prima dell'estrazione o della PCR e analizzato nuovamente per ottenere risultati entro l'intervallo lineare del test.

I campioni segnalati come "HSV2: DNA Not Detected or below LoD" sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA dell'HSV2. In questo caso il campione può essere negativo per il DNA di HSV2, oppure il DNA di HSV2 può essere presente ad una concentrazione inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni").

I campioni segnalati HSV2 positivi ad una concentrazione inferiore al LoD, quando vengono rilevatidal test, vengono riportati come "HSV2: DNA Detected, quantity below LLoQ" (vedere "Caratteristiche delle prestazioni").

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

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA
REF RTS032PLD

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

Nota bene: I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e gli altri risultati degli esami di laboratorio relativi al paziente.

I risultati della corsa del campione sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Result Display) da parte di personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst" seguendo le istruzioni della GUI. Dalla finestra "Result Display" è possibile stampare e salvare i risultati della sessione come "Sample Report" e "Track Report".

D. Refertazione dei risultati del campione

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

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

Il "Track Report" mostra i dettagli di una Sessione di lavoro per i "Track" selezionati.

I "Sample Report" e "Track Report" possono essere stampati e firmati dal personale autorizzato.

ELITe BeGenius

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con **i** seguenti campioni clinici:

Sangue intero raccolto in EDTA

I campioni di sangue intero destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni, altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi. Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con **ELITe BeGenius** e con **ELITe BeGenius Software** versione **2.0** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **HSV2 ELITe_Be_WB_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Quando si usa il tubo primario, il volume del campione varia in base al tipo di tubo caricato. Fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione per ulteriori informazioni e per l'allestimento della procedura di estrazione.

Plasma raccolto in EDTA

I campioni di plasma destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni, altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi. Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: l'estrazione del DNA da campioni di plasma con **ELITe BeGenius** e con **ELITe BeGenius Software** versione **2.0** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **HSV2 ELITe_Be_PL_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Quando si usa il tubo primario, il volume del campione varia in base al tipo di tubo caricato, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione per ulteriori informazioni e per l'allestimento della procedura di estrazione.

Liquido cefalorachidiano CSF (liquor)

I campioni di liquor destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti secondo le linee guida di laboratorio evitando la contaminazione con il sangue del paziente, trasportati a +2 / +8 °C e

conservati a +2 / +8 °C per un massimo di quattro ore, altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi. Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: l'estrazione del DNA da campioni di liquor con **ELITe BeGenius** e con **ELITe BeGenius Software** versione **2.0** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **HSV2 ELITe_Be_CSF_200_100.** Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** ed eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Quando si usa il tubo primario, il volume del campione varia in base al tipo di tubo caricato, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione per ulteriori informazioni.

Altri campioni:

Al momento non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con altri campioni clinici come: sospensione di leucociti, sospensione di granulociti e liquido amniotico.

Sostanze interferenti

Il DNA estratto dal campione di partenza non deve contenere eparina per evitare fenomeni di inibizione e la comparsa di frequenti risultati non validi.

Quantità di DNA genomico umano elevate nel DNA estratto dal campione possono inibire la reazione di amplificazione.

Non sono disponibili dati riguardo eventuali fenomeni di inibizione da parte di farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

Controlli di amplificazione

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

come Calibratori, utilizzare i quattro livelli di concentrazione del **HSV2 ELITe Standard**, in associazione con il protocollo **«HSV2 ELITe_Be_STD»**
come Controllo Positivo di amplificazione, utilizzare **HSV2 - ELITe Positive Control**, in associazione con il protocollo **«HSV2 ELITe_Be_PC»**
come Controllo Negativo di amplificazione, utilizzare l'acqua ultrapura per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con il protocollo **«HSV2 ELITe_Be_NC».**

Nota bene: Il sistema **ELITe BeGenius** richiede una curva di calibrazione e la validazione dei risultati di controllo dell'amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione memorizzato nel suo database.
Le curve di calibrazione, approvate e memorizzate nel database, scadranno dopo **60 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente l'impostazione della calibrazione.
La validazione dei risultati dei controlli dell'amplificazione, approvati e memorizzati nel database, scadrà dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario ri-eseguire i controlli positivi e negativi.

I calibratori e i controlli di amplificazione devono essere ritestati se capita uno dei seguenti eventi:
- Si utilizza un nuovo lotto di reagenti di amplificazione,
- I risultati delle analisi di controllo di qualità (vedi paragrafo successivo) sono fuori dalle specifiche,
- Viene eseguito un intervento di manutenzione sullo strumento.

Controlli di qualità

I controlli esterni di qualità devono essere utilizzati in conformità a leggi locali, statali, organizzazioni di accreditamento federali. I controlli esterni di qualità sono disponibili in commercio.

PROCEDURA ELITe BeGenius

La procedura di utilizzo del prodotto **«HSV2 - ELITe MGB Kit»** con il sistema **ELITe BeGenius** comprende tre fasi:
- Verifica che il sistema sia pronto
- Impostazione della sessione
- Esame e approvazione dei risultati

Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
- accendere **ELITe BeGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**";
- verificare che i calibratori (**HSV2 Q-PCR standard**) siano processati, approvati e non scaduti (status). Questo può essere controllato dal menu "Calibration" nella Home page;

- verificare che i controlli di amplificazione (**HSV2 Positive Control** e **HSV2 Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (status). Questo può essere verificato dal menu "Control" nella Home page;
- scegliere il tipo di corsa, seguendo le istruzioni della Graphical User Interface (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay protocol forniti da ELITechGroup S.p.A.. Questi protocolli IVD sono stati validati specificamente con i prodotti ELITe MGB Kit, le matrici e lo strumento **ELITe BeGenius**.

I protocolli dei saggi disponibili per analizzare i campioni con il prodotto **«HSV2 ELITe MGB Kit»** sono descritti nella tabella seguente.

Protocollo del saggio per «HSV2 ELITe MGB Kit»

Nome	Matrice	Unità di misura	Caratteristiche
HSV2 ELITe_Be_PL_200_100	Plasma	copie/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
HSV2 ELITe_Be_WB_200_100	Sangue Intero	copie/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
HSV2 ELITe_Be_CSF_200_100	CSF	copie/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL

Se il protocollo del saggio di interesse non è presente nel sistema, contattare il Servizio Clienti locale di ELITechGroup.

I protocolli per l'analisi qualitativa sono disponibili su richiesta.

Impostazione della sessione

Il prodotto **HSV2 ELITe MGB kit** in associazione a **ELITe BeGenius** può essere utilizzato per eseguire:

A. Corsa integrata (Extract + PCR),
B. Corsa di amplificazione (PCR only),
C. Corsa di Calibrazione (PCR only),
D. Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo (PCR only).

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

Nota bene: il sistema **ELITe BeGenius** può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile inviare le informazioni di impostazione della sessione. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Le principali operazioni per l'impostazione dei quattro tipi di corsa sono descritte di seguito.

A Corsa integrata

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

1. Scongelare i tubi di HSV2 Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Nota: Scongelare la miscela **HSV2 PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Scongelare un tubo di CPE per la sessione. Ogni tubo è sufficiente per 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
4. Rimuovere tutti i Rack dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
5. Selezionare il "run mode": "Extract + PCR".
6. Caricare i campioni nella cooling area dal rack per provette campione L5.
7. Inserire il Rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.

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

8. Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia di 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
9. Selezionare il protocollo del test da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio i.e. HSV2 ELITe_Be_PL_200_100). Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Se deve essere effettuata una seconda estrazione, ripetere i passaggi da 6 a 9 utilizzando il rack per provette campione L4.
11. Caricare i tubi di eluizione barcodati nella cooling area partendo dal rack per eluati L3.

Note: I tubi di eluizione possono essere etichettati per aumentare la tracciabilità.

12. Inserire il Rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Ripetere i passaggi 11 e 12 utilizzando il rack per reagenti/eluati L2.
14. Caricare il CPE e la HSV2 Q-PCR Mix nella cooling area.
15. Inserire il rack per reagente L1 nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
16. Caricare e controllare i Rack puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
17. Caricare il Rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
18. Caricare il rack per estrazione con le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200" e tutti i consumabili richiesti, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
19. Chiudere lo sportello dello strumento.
20. Premere "Start" per avviare la corsa.

Una volta completata la procedura, l'**ELITe BeGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: Alla fine della corsa il campione estratto rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 ° C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

Nota bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

B Corsa di amplificazione

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

1. Scongelare i tubi di HSV2 Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Nota: Scongelare la miscela **HSV2 PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA
REF RTS032PLD

2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home"
3. . Rimuovere i rack 1, 2 e 3 dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
4. Selezionare il "run mode": "PCR Only".
5. Caricare i campioni nella cooling area partendo dal rack per eluati L3.
6. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
7. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
8. Selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio HSV2 ELITe_Be_PL_200_100).
9. Caricare HSV2 Q-PCR Mix nella cooling area.
10. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare e controllare i rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Caricare il rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Chiudere la porta dello strumento,
14. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Una volta completata la procedura, l'**ELITe BeGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: Alla fine della corsa il campione estratto rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato identificato e conservato a -20 ° C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

Nota bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

C Corsa di calibrazione

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

1. Scongelare i tubi di HSV2 Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di utilizzo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Nota: Scongelare la miscela **HSV2 PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Scongelare i tubi di HSV2 ELITe Standard (Cal1: HSV2 Q-PCR Standards 10^2, Cal2: HSV2 Q-PCR Standards 10^3, Cal3: HSV2 Q-PCR Standards 10^4, Cal4: HSV2 Q-PCR Standards 10^5). Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home"
4. . Rimuovere i rack 1, 2 e 3 dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
5. Selezionare il "run mode": "PCR Only".
6. Caricare i calibratori nella cooling area nel rack per eluati L3.
7. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
9. Selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (HSV2 ELITe_Be_STD). Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare HSV2 Q-PCR Mix nella cooling area.
11. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.

12. Caricare e controllare i rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Caricare il rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
14. Chiudere la porta dello strumento,
15. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Una volta completata la procedura, l'**ELITe BeGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: Alla fine della corsa il campione estratto rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato identificato e conservato a -20 ° C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

Nota bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

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

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

1. Scongelare i tubi di HSV2 Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di utilizzo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Nota: Scongelare la miscela **HSV2 PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Scongelare il prodotto HSV2 - ELITe Positive Control per l'amplificazione del Controllo Positivo. Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Trasferire almeno 50 µL di acqua ultrapura per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito nell'ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
5. Rimuovere i rack 1, 2 e 3 dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
6. Selezionare il "run mode": "PCR Only".
7. Caricare il Controllo Positivo e il Controllo Negativo nella cooling area nel rack per eluati L3.
8. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
10. Selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (HSV2 ELITe_Be_PC e HSV2 ELITe_Be_NC). Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare HSV2 Q-PCR Mix nella cooling area.
12. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Caricare e controllare i rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
14. Caricare il rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
15. Chiudere la porta dello strumento,
16. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Una volta completata la procedura, l'**ELITe BeGenius** permette all'operatore di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota: Alla fine della corsa il campione estratto rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato identificato e conservato a -20 ° C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota: Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere

rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

Esame e approvazione dei risultati

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata " Results Display ". In questa schermata vengono visualizzati i risultati del campione/Calibratore/Controllo e le informazioni relative alla corsa. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report").**Nota Bene**: Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento **ELITe BeGenius.**

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

ELITe BeGenius genera i risultati con **HSV2 ELITe MGB Kit** attraverso la seguente procedura

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

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

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

La sensibilità analitica di questo saggio, come limite di rilevazione, permette di rilevare la presenza di circa 10 genomi Equivalenti nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio, come limite di rilevazione, è stata testata utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 20 µL in DNA genomico umano ad un titolo di 500 ng / 20 µL. Questo campione è stato amplificato in 24 replicati utilizzando i prodotti ELITechGroup S.p.A. su due diversi strumenti. I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
10 copie DNA plasmidico + 500 ng di DNA genomico umano	24	24	0

Il limite di rilevazione (LoD) del kit HSV2 ELITe MGB® è stato verificato in associazione a campioni di **Plasma** e **Sangue intero** raccolti in EDTA e **CSF** e ai sistemi **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** (in modalità "Extract+PCR").

Per sangue intero

Il limite di rilevazione di questo saggio è stato verificato testando 20 replicati di campione di sangue intero raccolto in EDTA positivizzato a 171 copie/mL su sistemi **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** in modalità "Extract + PCR". I campioni sono stati positivizzati utilizzando il materiale di riferimento "Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid" (ZeptoMetrix Corporation). Il limite di rilevazione è confermato se almeno 18 replicati su 20 danno un risultato positivo.

I risultati finali sono riassunti nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione per sangue intero e ELITe InGenius					
Campione	LoD	N	Valido	Positivo	Negativo
Sangue intero raccolto in EDTA	171 copies / mL	20	20	20	0

Limite di rilevazione per sangue intero e ELITe BeGenius					
Campione	LoD	N	Valido	Positivo	Negativo
Sangue intero raccolto in EDTA	171 copies / mL	20	20	20	0

Il valore LoD per il target HSV2 è stato confermato a 171 copie / mL per il sangue intero raccolto in EDTA.

Per Plasma

Il limite di rilevazione di questo saggio è stato verificato testando 20 replicati di campione di sangue intero raccolto in EDTA positivizzato a 119 copie/mL su sistemi **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** in modalità "Extract + PCR". I campioni sono stati positivizzati utilizzando il materiale di riferimento "Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid" (ZeptoMetrix Corporation). Il limite di rilevazione è confermato se almeno 18 replicati su 20 danno un risultato positivo.

I risultati finali sono riassunti nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione per plasma e ELITe InGenius					
Campione	**LoD**	**N**	**Valido**	**Positivo**	**Negativo**
Plasma raccolto in EDTA	119 copies / mL	20	20	20	0

Limite di rilevazione per plasma e ELITe BeGenius					
Campione	**LoD**	**N**	**Valido**	**Positivo**	**Negativo**
Plasma raccolto in EDTA	119 copies / mL	20	20	20	0

Il valore LoD per il target HSV2 è stato confermato a 119 copie / mL per plasma raccolto in EDTA.

Per liquido cefalorachidiano CSF (liquor)

Il limite di rilevazione di questo saggio è stato verificato testando 20 replicati di campione di CSF positivizzato a 119 copie/mL su sistemi **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** in modalità "Extract + PCR". I campioni sono stati positivizzati utilizzando il materiale di riferimento "Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid" (ZeptoMetrix Corporation).

Il limite di rilevazione è confermato se almeno 18 replicati su 20 danno un risultato positivo.

I risultati finali sono riassunti nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione per CSF e ELITe InGenius					
Campione	**LoD**	**N**	**Valido**	**Positivo**	**Negativo**
Liquido cefalorachidiano	119 copies / mL	20	20	20	0

Limite di rilevazione per CSF e ELITe BeGenius					
Campione	**LoD**	**N**	**Valido**	**Positivo**	**Negativo**
Liquido cefalorachidiano	119 copies / mL	20	20	20	0

Il valore LoD per il target HSV2 è stato confermato a 119 copie / mL per CSF.

Intervallo di misurazione lineare e Limite di quantificazione

L'intervallo di misurazione lineare del saggio in associazione a **sangue intero** e **plasma** collezionati in EDTA e **CSF** in associazione a **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** è stato verificato utilizzando un pannello di diluizioni di HSV2. Il pannello è stato preparato diluendo "Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid" (ZeptoMetrix Corporation) in matrice negativa per il DNA di HSV2.

Per sangue intero.

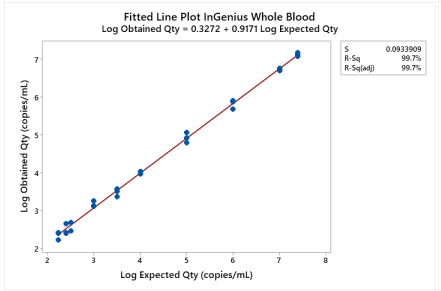
Il pannello consiste in 10 punti di diluizione da circa 2.5 x 10^7 copie/mL a circa 171 copie/mL. Ogni campione del panello è stato testato in 3 replicati.

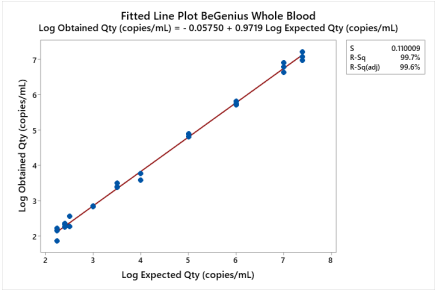
L'analisi dei dati ottenuti, eseguita mediante analisi di regressione lineare, ha dimostrato che il saggio in associazione con campioni di sangue intero mostra una risposta lineare per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione quadrato (R2) pari a 0,997 per **ELITe InGenius** e 0,997 per **ELITe BeGenius**.

I risultati sono riportati nelle figure seguenti.

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS032PLD





Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare (LLoQ) è stato fissato alla concentrazione LoD, che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard pari a 0,1081 Log copie / mL per **ELITe** InGenius e 0,1900 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**) e accurati (Errore pari a -0,1221 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,1591 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**): 171 copie / mL.

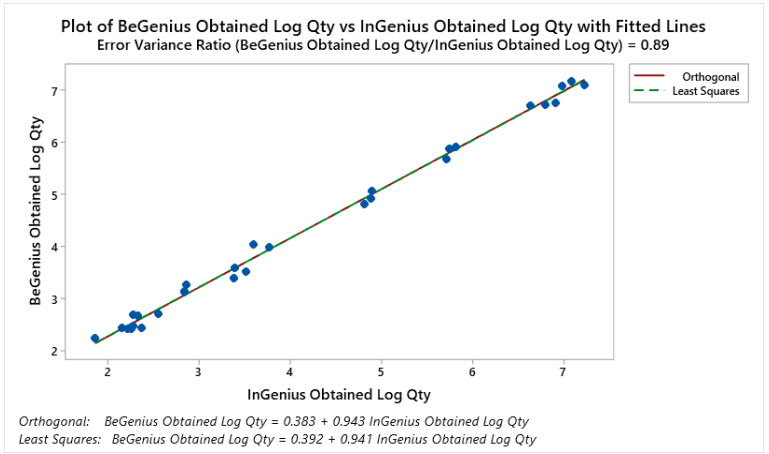
Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare (ULoQ) è stato fissato alla concentrazione più alta che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard pari a 0,0472 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,1191 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**) e accurati (Errore pari a 0,2744 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e -0,3029 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**): 25.000.000 copie / mL.

I risultati finali per sono riportati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare con campioni di sangue intero e ELITe InGenius e ELITe BeGenius		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
copies / mL	**171**	**25.000.000**

I risultati ottenuti con **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** sono stati analizzati tramite regressione ortogonale e lineare allo scopo di calcolare la correlazione tra i due metodi.

I risultati sono riportati nella figura seguente.



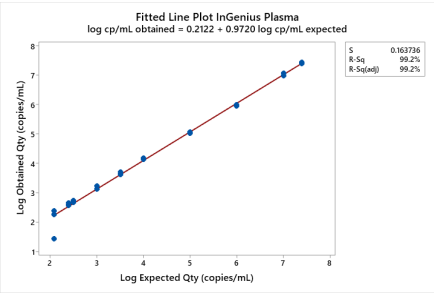
In questo test, l'analisi di regressione ortogonale ha generato una pendenza di 0,943 (95% IC: 0,919 0,967) e un intercetta di 0,383 (95% IC: 0,276; 0,491). La regressione lineare ha generato un R2 di 0,996.

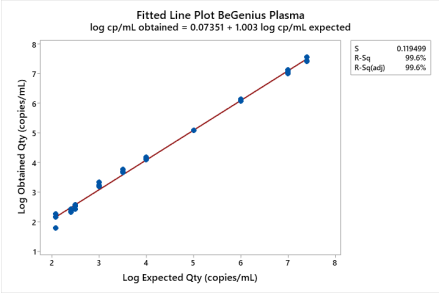
Per plasma

Il pannello consiste in 10 punti di diluizione da circa 2.5 x 10^7 copie/mL a circa 119 copie/mL. Ogni campione del panello è stato testato in 3 replicati.

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita mediante analisi di regressione lineare, ha dimostrato che il saggio in associazione con campioni di plasma collezionato in EDTA mostra una risposta lineare per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione quadrato (R2) pari a 0,992 per **ELITe InGenius** e 0,996 per **ELITe BeGenius**.

I risultati sono riportati nelle figure seguenti.





Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare (LLoQ) è stato fissato alla concentrazione LoD, che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard pari a 0,2529 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,2931 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**) e accurati (Errore pari a 0,0503 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,0005 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**): 119 copie / mL.

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare (ULoQ) è stato fissato alla concentrazione più alta che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard pari a 0,0234 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,0761 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**) e accurati (Errore pari a -0,0258 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e -0,0646 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**): 25.000.000 copie / mL.

I risultati finali per sono riportati nella tabella seguente.

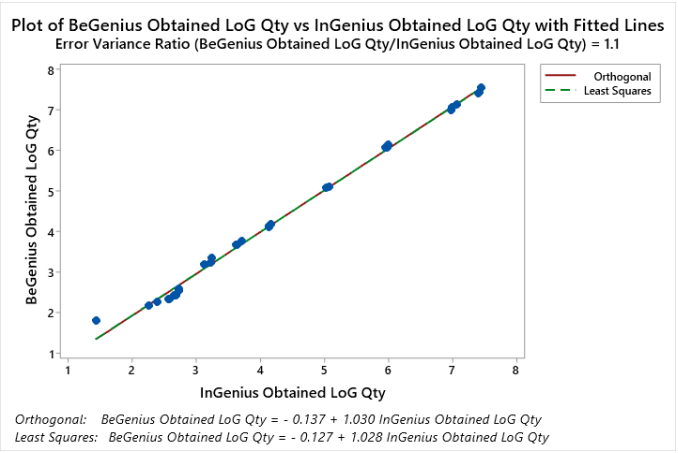
Intervallo di misurazione lineare con campioni di plasma e ELITe InGenius e ELITe BeGenius		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
copie / mL	**119**	**25.000.000**

I risultati ottenuti con **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** sono stati analizzati tramite regressione ortogonale e lineare allo scopo di calcolare la correlazione tra i due metodi.

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS032PLD

I risultati sono riportati nella figura seguente.



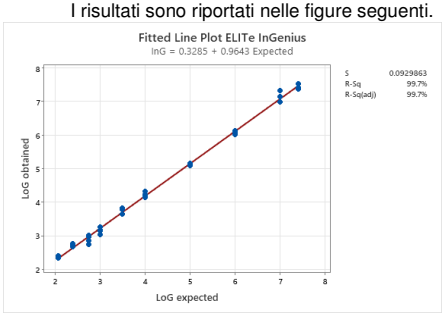
In questo test, l'analisi di regressione ortogonale ha generato una pendenza di 1,030 (95% IC: 1,005; 1,056) e un intercetta di -0,137 (95% IC: -0,257; -0,017). La regressione lineare ha generato un R2 di 0,996.

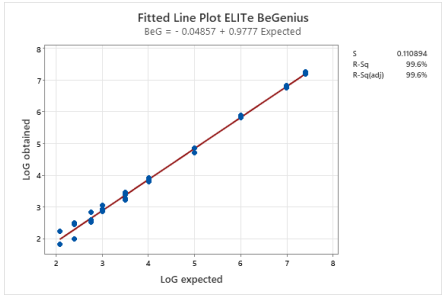
Per liquido cefalorachidiano CSF (liquor)

Il pannello consiste in 10 punti di diluizione da circa 2.5 x 10^7 copie/mL a circa 119 copie/mL. Ogni campione del panello è stato testato in 4 replicati. Due replicati sono stati esclusi (outliers).

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita mediante analisi di regressione lineare, ha dimostrato che il saggio in associazione con campioni di CSF mostra una risposta lineare per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione quadrato (R2) pari a 0,997 per **ELITe InGenius** e 0,996 per **ELITe BeGenius**.

I risultati sono riportati nelle figure seguenti.





Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare (LLoQ) è stato fissato alla concentrazione LoD, che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard pari a 0,0261 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,2349 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**) e accurati (Errore pari a -0,2938 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,1138 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**): 119 copie / mL.

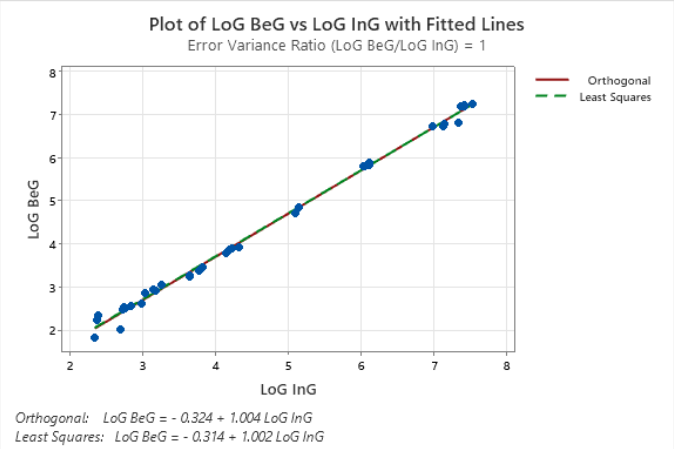
Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare (ULoQ) è stato fissato alla concentrazione più alta che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard pari a 0,0637 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,0277 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**) e accurati (Errore pari a -0,0345 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,1823 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**): 25.000.000 copie / mL.

I risultati finali per sono riportati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare con campioni di CSF e ELITe InGenius e ELITe BeGenius		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
copie / mL	**119**	**25.000.000**

I risultati ottenuti con **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** sono stati analizzati tramite regressione ortogonale e lineare allo scopo di calcolare la correlazione tra i due metodi.

I risultati sono riportati nella figura seguente.



In questo test, l'analisi di regressione ortogonale ha generato una pendenza di 1,004 (95% IC: 0,9822; 1,0267) e un intercetta di 0,324 (95% IC: -0,4334; -0,2147). La regressione lineare ha generato un R2 di 0,995.

Ripetibilità

La Ripetibilità dei risultati ottenuti con il prodotto HSV2 ELITe MGB Kit in associazione con i sistemi **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** è stata testata mediante analisi di un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA. Il pannello includeva un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento per HSV2 "Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid, (Zeptometrix) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 513 copie/mL e di 10 x LoD (circa 1710 copie/mL).

La Ripetibilità Intra – Sessione su **ELITe InGenius** è stata ottenuta mediante l'analisi di campioni in otto replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore, nello stesso giorno. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate.

La Ripetibilità Inter – Sessione su **ELITe InGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore, in due giorni diversi. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate.

I valori Ct del target e del Controllo Interno sono stati utilizzati per calcolare la %CV al fine di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Una sintesi dei risultati è riportata nelle tabelle seguenti.

Ripetibilità Intra – Sessione ELITe InGenius								
Campione	**HSV2**				**Controllo interno**			
	Pos. / Rep.	**Ct media**	**DS**	**% CV**	**Pos. / Rep.**	**Ct media**	**DS**	**% CV**
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A:	N.A.	24 / 24	22.91	0.51	2.24
3 x LoD	8 / 8	35.65	0.87	2.45				
10 x LoD	8 / 8	33.96	0.20	0.58				

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS032PLD

Ripetibilità Inter – Sessione ELITe InGenius								
Campione	**HSV2**				**Controllo interno**			
	Pos. / Rep.	**Ct media**	**DS**	**% CV**	**Pos. / Rep.**	**Ct media**	**DS**	**% CV**
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	23.40	0.82	3.49
3 x LoD	16 / 16	35.87	0.71	1.99				
10 x LoD	16 / 16	33.92	0.22	0.66				

Nel test di ripetibilità su **ELITe InGenius**, il test ha rilevato il target HSV2 come previsto e ha mostrato valori bassi di %CV di Ct che non superavano il 5% per il controllo interno.

La Ripetibilità Intra – Sessione su **ELITe BeGenius** è stata ottenuta mediante l'analisi di campioni in otto replicati, in una sessione al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore, nello stesso giorno. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate.

La Ripetibilità Inter – Sessione su ELITe **BeGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in una sessione al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore, in due giorni diversi. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate. I valori Ct del target e del Controllo Interno sono stati utilizzati per calcolare la %CV al fine di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Una sintesi dei risultati è riportata nelle tabelle seguenti

Ripetibilità Intra – Sessione ELITe BeGenius								
Campione	**HSV2**				**Controllo interno**			
	Pos. / Rep.	**Ct media**	**DS**	**% CV**	**Pos. / Rep.**	**Ct media**	**DS**	**% CV**
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	27.16	0.87	3.19
3 x LoD	8 / 8	37.58	0.67	1.78				
10 x LoD	8 / 8	35.25	0.56	1.58				

Ripetibilità Intra – Sessione ELITe BeGenius								
Campione	**HSV2**				**Controllo interno**			
	Pos. / Rep.	**Ct media**	**DS**	**% CV**	**Pos. / Rep.**	**Ct media**	**DS**	**% CV**
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	26.87	0.94	3.49
3 x LoD	16 / 16	37.59	0.66	1.75				
10 x LoD	16 / 16	35.41	0.84	2.37				

Nel test di ripetibilità su **ELITe BeGenius**, il test ha rilevato il target HSV2 come previsto e ha mostrato valori bassi di %CV di Ct che non superavano il 5% per il controllo interno.

Riproducibilità

La Riproducibilità dei risultati ottenuti con il prodotto HSV2 ELITe MGB Kit in associazione con i sistemi **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** è stata testata mediante analisi di un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA. Il pannello includeva un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento per HSV2 "Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid, (Zeptometrix) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 513 copie/mL e di 10 x LoD (circa 1710 copie/mL).

La Riproducibilità Inter – Strumento su **ELITe InGenius** è stata ottenuta mediante l'analisi di campioni in otto replicati, in una sessione al giorno, in due giorni differenti, con lo stesso lotto di prodotto, con due strumenti differenti, da due differenti operatori. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate sul sistema **ELITe InGenius** in modalità "Extract + PCR".

La Riproducibilità Inter – Lotto su **ELITe InGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in due sessioni al giorno, con due differenti lotti di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate sul sistema **ELITe InGenius** in modalità "Extract + PCR".

I valori Ct del target e del Controllo Interno sono stati utilizzati per calcolare la %CV al fine di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Una sintesi dei risultati è riportata nelle tabelle seguenti

Riproducibilità Inter – Strumento ELITe InGenius								
Campione	**HSV2**				**Controllo interno**			
	Pos. / Rep.	**Ct media**	**DS**	**% CV**	**Pos. / Rep.**	**Ct media**	**DS**	**% CV**
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	23.91	0.35	1.45
3 x LoD	8 / 8	36.33	0.55	1.51				
10 x LoD	8 / 8	34.46	0.26	0.86				

Riproducibilità Inter – Strumento ELITe InGenius								
Campione	**HHV8**				**Controllo interno**			
	Pos. / Rep.	**Ct media**	**DS**	**% CV**	**Pos. / Rep.**	**Ct media**	**DS**	**% CV**
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	24.18	0.42	1.76
3 x LoD	8 / 8	36.45	0.46	1.26				
10 x LoD	8 / 8	34.66	0.26	0.76				

Nel test di riproducibilità su **ELITe InGenius**, il test ha rilevato il target HSV2 come previsto e ha mostrato valori bassi di %CV di Ct che non superavano il 5% per il controllo interno.

La Riproducibilità Inter – Strumento su **ELITe BeGenius** è stata ottenuta mediante l'analisi di campioni in otto replicati, in una sessione al giorno, in due giorni differenti, con lo stesso lotto di prodotto, con due strumenti differenti, da due differenti operatori. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate sul sistema **ELITe BeGenius** in modalità "Extract + PCR".

La Riproducibilità Inter – Lotto su **ELITe BeGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in due sessioni al giorno, con due differenti lotti di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate sul sistema **ELITe BeGenius** in modalità "Extract + PCR".

I valori Ct del target e del Controllo Interno sono stati utilizzati per calcolare la %CV al fine di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Una sintesi dei risultati è riportata nelle tabelle seguenti

Riproducibilità Inter – Strumento ELITe BeGenius								
Campione	**HSV2**				**Controllo interno**			
	Pos. / Rep.	**Ct media**	**DS**	**% CV**	**Pos. / Rep.**	**Ct media**	**DS**	**% CV**
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	28.32	0.41	1.46
3 x LoD	8 / 8	37.43	0.42	1.15				
10 x LoD	8 / 8	35.88	0.25	0.75				

Riproducibilità Inter – Strumento ELITe BeGenius								
Campione	**HSV2**				**Controllo interno**			
	Pos. / Rep.	**Ct media**	**DS**	**% CV**	**Pos. / Rep.**	**Ct media**	**DS**	**% CV**
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	27.86	0.66	2.37
3 x LoD	8 / 8	36.90	0.58	1.59				
10 x LoD	8 / 8	35.17	0.49	1.39				

Nel test di riproducibilità su **ELITe BeGenius**, il test ha rilevato il target HSV2 come previsto e ha mostrato valori bassi di %CV di Ct che non superavano il 5% per il controllo interno.

Sensibilità analitica: riproducibilità con materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica del saggio, come riproducibilità dei valori di un materiale di riferimento calibrato, è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento il pannello calibrato «AcroMetrix® HSV2$_{tc}$ Panel» (Acrometrix, Life Technologies; Stati Uniti). Ciascun campione del pannello è stato testato in 2 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con «**ELITe InGenius**» e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS032PLD

Prove con materiale di riferimento certificato e ELITe InGenius				
Campione	Titolo nominale copie / mL	Titolo nominale Log_{10} copie / mL	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log_{10} copie / mL
HSV2 DNA 1E6	10^6	6,000	2/2	6,035
HSV2 DNA 1E5	10^5	5,000	2/2	5,067
HSV2 DNA 1E4	10^4	4,000	2/2	3,978
HSV2 DNA 1E3	10^3	3,000	2/2	3.190
HSV2 DNA 1E2	10^2	2,000	2/2	1,711

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati come positivi ad un titolo che rientra nell'intervallo atteso ± 0,5 Log.

Ulteriori test sono stati eseguiti utilizzando come materiale di riferimento QCMD 2014 Herpes Simplex virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Regno Unito) un panello di diluizioni di HSV2. Ciascun campione del pannello è stato testato in 2 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con «**ELITe InGenius**» e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento e ELITe InGenius		
Campione	Stato del Campione	Positivi / Replicati
HSVDNA14-01	HSV1 positivo, HSV2 negativo	0/2
HSVDNA14-02	HSV1 e HSV2 negativo	0/2
HSVDNA14-03	HSV1 positivo, HSV2 negativo	0/2
HSVDNA14-04	HSV1 positivo, HSV2 negativo	0/2
HSVDNA14-05	HSV1 positivo, HSV2 negativo	0/2
HSVDNA14-06	HSV2 Rilevato frequentemente	2/2
HSVDNA14-07	HSV2 Rilevato	2/2
HSVDNA14-08	HSV2 Rilevato frequentemente	2/2
HSVDNA14-09	HSV1 positivo, HSV2 negativo	0/2
HSVDNA14-10	HSV1 e HSV2 negativo	0/2

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni di sangue intero raccolto in EDTA, plasma raccolto in EDTA e liquido cefalorachidiano positivi per il DNA di HSV2. in associazione a **ELITe InGenius**. Poiché **ELITe BeGenius** presenta 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**.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando 23 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi per il DNA di HSV2, positivizzati con materiale di riferimento calibrato e certificato (HSV2 Molecular Q Panel-Medium, Qnostics Ltd, Regno Unito) ad un titolo di 750 copie / mL; 30 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di HSV2 positivizzati con il campione HSV2 ELITe-IQC High (ELITech Group S.p.A.) ad un titolo di 750 copie /mL e 20 campioni di liquido cefalorachidiano negativi per il DNA di HSV2 positivizzati con il campione HSV2 ELITe-IQC High (ELITech Group S.p.A.) ad un titolo di 750 copie / mL.

Ciascun campione è stato testato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con l'**ELITe InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	**N**	**positivi**	**negativi**
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di HSV2	23	22	1
Plasma raccolto in EDTA positivizzato per il DNA per HSV2	30	30	0
Liquido cefalorachidiano positivizzato per il DNA per HSV2	20	20	0

Tutti i campioni di plasma e liquido cefalorachidiano sono risultati validi e positivi. Tutti i campioni di sangue intero sono risultati validi, 22 sono stati confermati come positivi. Un campione è risultato negativo discrepante probabilmente a causa di inibizione.

La sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 99%.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni di sangue intero raccolto il EDTA, plasma raccolto in EDTA e liquido cefalorachidiano negativi per il DNA di HSV2. in associazione a **ELITe InGenius**. Poiché **ELITe BeGenius** presenta 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**.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando 34 campioni di sangue intero raccolto in EDTA di donatori sani presumibilmente negativi per il DNA di HSV2, 39 campioni di plasma raccolto in EDTA di donatori sani presumibilmente negativi per il DNA di HSV2 e 22 campioni di liquido cefalorachidiano di donatori sani presumibilmente negativi per il DNA di HSV2. Ciascun campione è stato testato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con l'**ELITe InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A.I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di HSV2	34	0	34
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di HSV2	39	0	39
Liquido cefalorachidiano negativo per il DNA di HSV2	22	0	22

Tutti i campioni di sangue intero, di plasma e liquido cefalorachidiano sono risultati validi e negativi.
Per il Controllo Interno è stato definito un cut-off del valore di Ct uguale a 35.
La sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument
ABI 7300 Real-Time System

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con **DNA estratto** dai seguenti campioni clinici: liquido cefalorachidiano (liquor), sangue intero raccolto in EDTA, plasma raccolto in EDTA.

Liquido cefalorachidiano

I campioni di liquido cefalorachidiano destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti secondo le indicazioni del laboratorio evitando la contaminazione con il sangue del paziente, trasportati a +2 / +8° C e conservati a +2 / +8° C per un massimo di quattro ore altrimenti devono essere congelati e conservati a -20°C per un massimo di trenta giorni oppure a -70° C per tempi più lunghi.

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti.

Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione dell'acido nucleico.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di liquido cefalorachidiano con **ELITe STAR**, con **versione di software 3.4.13** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **"UUNI_E100S200_ELI"** che utilizza 200 µL di campione e eluisce l'estratto in 100 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su «**ELITe STAR**». Un volume minimo di 700 µL è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **200 µL** di **CPE** nei tubi di Proteinase-Carrier come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di liquido cefalorachidiano con **ELITe GALAXY**, con **versione di software 1.3.1** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **xNA Extraction (Universal)** che utilizza 300 µL di campione e eluisce l'estratto in 200 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su «**ELITe GALAXY**». Un volume minimo di 400-650 µL, a seconda della classe del tubo utilizzata, è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **10 µL** / **campione** di **CPE**. Al CPE deve essere aggiunto l'**IC + Carrier solution** come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS032PLD

riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Nota bene: Quando si esegue l'estrazione del DNA da liquido cefalorachidiano con lo strumento **«NucliSENS® easyMAG®»** utilizzare il protocollo di estrazione **Generic 2.0.1** e seguire queste indicazioni: dispensare **500 µL** di campione nella Strip da 8 pozzetti ed avviare l'estrazione. Al termine dei 10 minuti di incubazione aggiungere **5 µL** di **CPE** per il controllo interno prima di aggiungere **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** e proseguire con l'estrazione. Recuperare il DNA con **100 µL** di tampone di eluizione.

Sangue intero raccolto in EDTA

I campioni di sangue intero destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni, altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti.

Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con **ELITe STAR** con **versione di software 3.4.13** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **UUNI_E100S200_ELI** che utilizza 200 µL di campione e eluisce l'estratto in 100 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su «**ELITe STAR**». Un volume minimo di 700 µL è sempre necessario per ogni campione.
Aggiungere **200 µL** di **CPE** nei tubi di Proteinase-Carrier come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.
Nota bene: quando **si** esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con **ELITe GALAXY**, con **versione di software 1.3.1** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **xNA Extraction (Universal)** che utilizza 300 µL di campione e eluisce l'estratto in 200 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su «**ELITe GALAXY**». Un volume minimo di 400-650 µL, a seconda della classe del tubo utilizzata, è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **10 µL** / **campione** di **CPE**. Al CPE deve essere aggiunto l'**IC + Carrier solution** come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da sangue intero con il kit **«EXTRAblood»** seguire le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso: partire da **200 µL** di campione (2 milioni di cellule al massimo), recuperare il DNA con **100 µL** di tampone di eluizione.

Plasma raccolto in EDTA

I campioni plasma destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

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

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con **ELITe STAR**, con **versione di software 3.4.13** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **UUNI_E100S200_ELI** che utilizza 200 µL di campione e eluisce l'estratto in 100 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su «**ELITe STAR**». Un volume minimo di 700 µL è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **200 µL** di **CPE** nei tubi di Proteinase-Carrier come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con **ELITe GALAXY**, con **versione di software 1.3.1** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **xNA Extraction (Universal)** che utilizza 300 µL di campione e eluisce l'estratto in 200 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su «**ELITe GALAXY**». Un volume minimo di 400-650 µL, a seconda della classe del tubo utilizzata, è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **10 µL** / **campione** di **CPE**. Al CPE deve essere aggiunto l'**IC + Carrier solution** come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Nota bene: Quando si esegue l'estrazione del DNA da plasma con lo strumento **«NucliSENS® easyMAG®»** utilizzare il protocollo di estrazione **Generic 2.0.1** e seguire queste indicazioni: dispensare **500 µL** di

campione nella Strip da 8 pozzetti ed avviare l'estrazione. Al termine dei 10 minuti di incubazione aggiungere **5 µL** di **CPE** per il controllo interno prima di aggiungere **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** e proseguire con l'estrazione. Recuperare il DNA con **100 µL** di tampone di eluizione.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con lo strumento **«QIAsymphony® SP/AS»** e il kit **«QIAsymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit»,** con **versione di software 3.5**, utilizzare il protocollo di estrazione **"Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC"** e seguire queste indicazioni: lo strumento è in grado di utilizzare direttamente il tubo primario, il volume di campione prelevato per l'estrazione è **500 µL**, è sempre richiesto un volume minimo di 100 µL. Preparare la soluzione contente il buffer AVE ed il carrier RNA secondo le istruzioni nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit di estrazione. Aggiungere alla soluzione **6 µL** di **CPE** per ciascun campione richiesto. Caricare sullo strumento nella posizione prevista per le provette "controllo interno" le provette contenenti la soluzione, come indicato nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit; indicare la posizione in cui verranno dispensati gli eluati e specificare il volume di eluizione a **85 µL**. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Sostanze interferenti

Il DNA estratto dal campione di partenza non deve contenere eparina, emoglobina, destrano, Ficoll®, etanolo o 2-propanolo per evitare fenomeni di inibizione e la comparsa di frequenti risultati non validi.

Quantità di DNA genomico umano elevate nel DNA estratto dal campione possono inibire la reazione di amplificazione.

Non sono disponibili dati riguardo eventuali fenomeni di inibizione da parte di farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

Controlli di amplificazione

È assolutamente necessario convalidare ciascuna sessione di amplificazione allestendo una reazione per il controllo negativo e una reazione per il controllo positivo.

Per il controllo negativo utilizzare acqua ultrapura per biologia molecolare (non fornita nel prodotto) da aggiungere alla reazione al posto del DNA estratto dal campione.

Per il controllo positivo utilizzare il prodotto **«HSV2 - ELITe Positive Control»** oppure il prodotto **«HSV2 ELITe Standard»**.

Controlli di qualità

È consigliato convalidare l'intera procedura di analisi di ciascuna sessione, estrazione ed amplificazione, utilizzando un campione negativo e un campione positivo già testati oppure del materiale di riferimento calibrato.

PROCEDURA

Impostazione della sessione di amplificazione real time
(Da eseguire nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione)

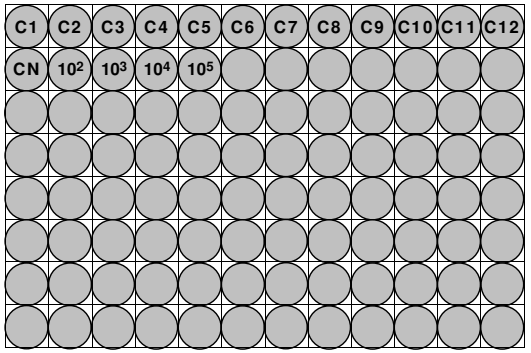
Se si utilizza uno strumento **7300 Real-Time PCR System**:

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
- accendere il thermal cycler per real time, accendere il computer di controllo, avviare il software dedicato e aprire una sessione "absolute quantification";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per HSV2 con il "reporter" = "FAM" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "HSV2";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per il controllo interno con il "reporter" = "VIC" (AP525 è equivalente al VIC) e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "CI";
- per ciascun pozzetto in uso della micropiastra, impostare (Well Inspector) i "detector" (tipo di fluorescenza da misurare), il "passive reference" = "ROX" (AP593 è usato invece del ROX, normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campione, controllo negativo di amplificazione, controllo positivo di amplificazione o standard con la relativa quantità nota). Compilare il **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale di istruzioni per l'uso trascrivendo queste informazioni oppure stampare l'organizzazione della micropiastra. Il **Piano di lavoro** dovrà essere seguito con attenzione durante il trasferimento nei pozzetti della miscela di reazione e dei campioni.

Nota bene: per la determinazione del titolo del DNA nel campione di partenza è necessario allestire una serie di reazioni con i **Q - PCR Standard** (10^5 copie, 10^4 copie, 10^3 copie, 10^2 copie) per ottenere la **Curva standard**.

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA
REF RTS032PLD

Vedere sotto, a titolo di esempio, come organizzare un'analisi quantitativa di 12 campioni.



Legenda: C1 - **C12**: Campioni da analizzare; **CN**: Controllo negativo di amplificazione;
10^2: Standard 10^2 copie; **10^3**: Standard 10^3 copie; **10^4**: Standard 10^4 copie; **10^5**: Standard 10^5 copie.

Riferendosi alla documentazione dello strumento, impostare sul software dedicato (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:
- aggiungere nella fase di amplificazione il passaggio (Add Step) di **estensione a 72°C**;

Nota bene: l'acquisizione della fluorescenza (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve rimanere impostata nel passaggio di ibridazione a 60°C.
- modificare i tempi come indicato nella tabella "**Ciclo termico**";
- impostare un numero di cicli pari a **45**;
- impostare il valore di volume per la simulazione software del trasferimento termico alla reazione ("Sample volume") a **30 µL**;
- opzionale: aggiungere la fase di dissociazione (Add Dissociation Stage) e impostare le temperature da **40°C** a **80°C**.

Ciclo termico		
Fase	**Temperature**	**Tempi**
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 (opzionale)	95 °C	15 sec.
	40 °C	30 sec.
	80 °C	15 sec.

Se si utilizza uno strumento **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
- accendere il thermal cycler per real time, accendere il computer di controllo, avviare il software dedicato e aprire una sessione "absolute quantification" e impostare "Run mode: Fast 7500";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per HSV2 con il "reporter" = "FAM" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "HSV2";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per il controllo interno con il "reporter" = "VIC" (AP525 è equivalente al VIC) e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "CI";
- per ciascun pozzetto in uso della micropiastra, impostare (Well Inspector) i "detector" (tipo di fluorescenza da misurare), il "passive reference" = "CY5" (AP593 è usato invece del CY5, normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campione, controllo negativo di amplificazione, controllo positivo di amplificazione o standard con la relativa quantità nota). Compilare il **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale di istruzioni per l'uso trascrivendo queste informazioni. Il **Piano di lavoro** dovrà essere seguito con attenzione durante il trasferimento

nei pozzetti della miscela di reazione e dei campioni.

Nota bene: per la determinazione del titolo del DNA nel campione di partenza è necessario allestire una serie di reazioni con i **Q - PCR Standard** (10^5 copie, 10^4 copie, 10^3 copie, 10^2 copie) per ottenere la **Curva standard**.

La modalità di organizzazione di un'analisi quantitativa di alcuni campioni è illustrata a titolo di esempio nella sezione relativa alla procedura riferita allo strumento **7300 Real-Time PCR System**.

Riferendosi alla documentazione dello strumento, impostare sul software dedicato (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:
- aggiungere nella fase di amplificazione il passaggio (Add Step) di **estensione a 72 °C**;

Nota bene: l'acquisizione della fluorescenza (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve rimanere impostata nel passaggio di ibridazione a 60 °C.
- modificare i tempi come indicato nella tabella "**Ciclo termico**";
- impostare un numero di cicli pari a **45**;
- impostare il valore di volume per la simulazione software del trasferimento termico alla reazione ("Sample volume") a **30 µL**;
- opzionale: aggiungere la fase di dissociazione (Add Dissociation Stage) e impostare le temperature da **40 °C** a **80 °C**.

Ciclo termico		
Fase	**Temperature**	**Tempi**
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 (opzionale)	95 °C	15 sec.
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 sec.
	60 °C	15 sec.

Allestimento dell'amplificazione
(Da eseguire nell'area di estrazione / allestimento della reazione di amplificazione)

Prima di iniziare la sessione è necessario:
- prelevare e scongelare le provette con i campioni da analizzare. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare le provette di **HSV2 Q - PCR Mix** necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **25 reazioni**. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare la provetta di **HSV2 - Positive Control** o le provette di **HSV2 Q - PCR Standard**. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare l'**Amplification microplate** che sarà utilizzata nella sessione facendo attenzione a maneggiarla con guanti senza polvere e a non danneggiare i pozzetti.

1. Trasferire, depositandoli accuratamente sul fondo senza creare bolle, **20 µL** di miscela di reazione **HSV2 Q - PCR Mix** nei pozzetti dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**.

Nota bene: Se non si utilizza tutta la miscela di reazione, conservare il volume rimasto al buio a - 20°C per un massimo di un mese. Congelare e scongelare la miscela di reazione per un massimo di **5 VOLTE**.

2. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **DNA estratto** del primo campione nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il campione pipettando per tre volte il **DNA estratto** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con tutti gli altri **DNA estratti**.
3. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **acqua ultrapura per biologia molecolare** (non fornita nel prodotto) nel pozzetto dell'**Amplification microplate** del controllo negativo di amplificazione come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo negativo pipettando per tre volte l' **acqua ultrapura per biologia molecolare** nella miscela di

reazione. Fare attenzione a non creare bolle.

4. In base al tipo di risultato richiesto (qualitativo o quantitativo), seguire una delle due opzioni:

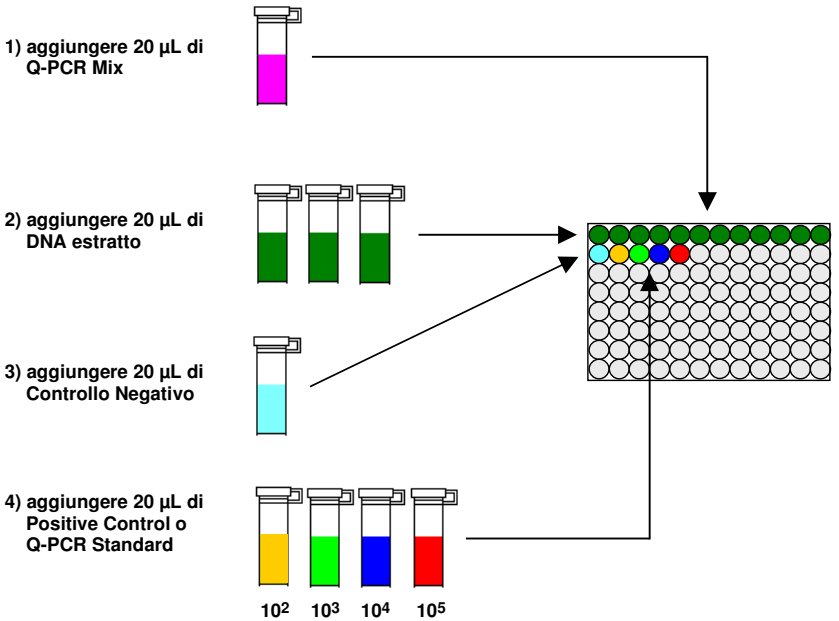
   - Quando è richiesto un risultato **qualitativo** dell'analisi (rilevazione del DNA di HSV2): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **HSV2 - Positive Control** nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo positivo pipettando per tre volte l'**HSV2 - Positive Control** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.

   - Quando è richiesto un risultato **quantitativo** dell'analisi (quantificazione del DNA di HSV2): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **HSV2 Q - PCR Standard 10^2** nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene lo standard pipettando per tre volte l'**HSV2 Q - PCR Standard 10^2** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con gli **HSV2 Q - PCR Standard 10^3, 10^4, 10^5**.

5. Sigillare accuratamente l'**Amplification microplate** con l'**Amplification Sealing Sheet**.
6. Trasferire l'**Amplification microplate** nel thermal - cycler per real time nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione ed avviare il ciclo termico di amplificazione salvando l'impostazione della sessione con un identificativo univoco e riconoscibile (per es. "anno-mese-giorno-HSV2-EGSpA").

Nota bene: Al termine del ciclo termico l'**Amplification microplate** con i prodotti di reazione deve essere rimossa dallo strumento ed eliminata in modo da non generare contaminazioni ambientali. **Non sollevare mai l'Amplification Sealing Sheet dall'Amplification microplate** in modo da evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

Nella figura di seguito è illustrata in sintesi la procedura di allestimento delle reazioni di amplificazione.



Nota bene: se l'allestimento dell'amplificazione è eseguito tramite lo strumento «**QIAsymphony® SP/AS**», inserire la micropiastra contenente gli estratti, i reagenti e la micropiastra di amplificazione negli alloggiamenti dedicati, usando gli appositi adattatori, quindi seguire quanto previsto dal manuale di istruzioni d'uso del preparatore automatico ed i passaggi richiesti dal software.

Nota bene: se l'allestimento dell'amplificazione è eseguito tramite lo strumento **«ELITe GALAXY»**, caricare la micropiastra di eluizione, la miscela completa di reazione e la micropiastra di amplificazione come previsto dal manuale di istruzioni d'uso dello strumento e seguendo quanto richiesto dalla GUI.

Analisi qualitativa dei risultati

I valori registrati della fluorescenza emessa dalla sonda specifica per HSV2 (detector FAM "HSV2") e dalla sonda specifica per il Controllo Interno (detector VIC "CI") nelle reazioni di amplificazione devono essere analizzati dal software dello strumento.

Prima di eseguire l'analisi, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
- impostare manualmente (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) l'intervallo di calcolo del **Livello di fluorescenza di fondo** (**Baseline**) dal ciclo 6 al ciclo 15;

Nota bene: Nel caso di un campione positivo ad alto titolo di HSV2, la fluorescenza FAM della sonda specifica per HSV2 può cominciare a crescere prima del ciclo 15. In questo caso l'intervallo di calcolo del **Livello di fluorescenza di fondo** deve essere adattato dal ciclo 6 al ciclo in cui la fluorescenza FAM comincia a crescere come rilevato dal software dello strumento (Results > Component).

Se si è utilizzato uno strumento **7300 Real-Time PCR System**:

- impostare manualmente la **Soglia** (**Threshold**) per il detector FAM "HSV2" a **0,1**;
- impostare manualmente la **Soglia** (**Threshold**) per il detector VIC "CI" a **0,05**.

Se si è utilizzato uno strumento **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

- impostare manualmente la **Soglia** (**Threshold**) per il detector FAM "HSV2" a **0,2**;
- impostare manualmente la **Soglia** (**Threshold**) per il detector VIC "CI" a **0,1**.

I valori di fluorescenza emessi dalle sonde specifiche nella reazione di amplificazione e il valore **Soglia** di fluorescenza sono utilizzati per determinare il **Ciclo Soglia** (**Ct**, **Threshold cycle**), cioè il ciclo in cui è stato raggiunto il valore **Soglia** di fluorescenza.

Nella reazione di amplificazione con il **Positive Control***, il valore del **Ct** per HSV2 (Results > Report) è utilizzato per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione Positive Control detector FAM "HSV2"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct ≤ 25	**POSITIVO**	**CORRETTA**

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Positive Control** è **Ct > 25** o **Non determinato** (**Undetermined**) per HSV2, non è stata rilevata in modo corretto la presenza di DNA bersaglio. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (dispensazione errata della miscela di reazione o del controllo positivo, 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. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

***Nota bene:** Quando questo prodotto è utilizzato per la quantificazione del DNA di HSV2, al posto della reazione con il **Positive Control** è stata allestita la serie di reazioni con i **Q - PCR Standard**. In questo caso per convalidare l'amplificazione e la rilevazione si deve fare riferimento alla reazione di amplificazione del **Q - PCR Standard 10^5** (**Ct ≤ 25**).

Nella reazione di amplificazione del **Controllo negativo**, il valore di **Ct** per HSV2 (Results > Report) è utilizzato per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione Controllo negativo detector FAM "HSV2"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct Non determinato	**NEGATIVO**	**CORRETTA**

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Controllo negativo** è diverso da **Ct Non determinato** (**Undetermined**) per HSV2, è stata rilevata la presenza di DNA bersaglio. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (contaminazione) che possono causare risultati non corretti e falsi positivi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

Nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione**, il valore di **Ct** per HSV2 è utilizzato per rilevare la presenza di DNA bersaglio, mentre il valore di **Ct** per il Controllo Interno è utilizzato per convalidare l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione.

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

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF **RTS032PLD**

Questo prodotto è in grado di rilevare una quantità minima di 10 copie di DNA del gene della gpG di HSV2 per reazione di amplificazione, corrispondenti ai genomi Equivalenti per reazione, (limite di rilevazione, vedi Caratteristiche delle prestazioni).

I risultati come **Ct** delle reazioni di amplificazione di ciascun **campione** (Results > Report) sono utilizzati come descritto nella tabella seguente:

Reazione del campione		Idoneità del campione	Risultato del saggio	DNA di HSV2
detector FAM "HSV2"	**detector VIC "CI"**			
Ct Non determinato	**Ct > 35 o Ct Non determinato**	**non idoneo**	**non valido**	**-**
	Ct ≤ 35	**idoneo**	**valido, negativo**	**NON RILEVATO**
Ct Determinato	**Ct > 35 o Ct Non determinato**	**idoneo**	**valido, positivo**	**RILEVATO**
	Ct ≤ 35	**idoneo**	**valido, positivo**	**RILEVATO**

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per HSV2 e **Ct > 35** o **Ct Non determinato** per il Controllo Interno, non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA del Controllo Interno. In questo caso si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (amplificazione non efficiente o nulla) o nella fase di estrazione (perdita del DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'estratto) che possono causare risultati errati e falsi negativi. Il campione non è idoneo, il saggio non è valido e deve essere ripetuto a partire dall'estrazione di un nuovo campione.

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per HSV2 e **Ct ≤ 35** per il Controllo Interno, il DNA di HSV2 non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA di HSV2 sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi Caratteristiche delle prestazioni). In questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli esiti di altri esami di laboratorio relativi al paziente.

Nota bene: Quando nella reazione di amplificazione relativa ad un campione è stata rilevata la presenza di DNA di HSV2, l'amplificazione del Controllo Interno può dare come risultato un Ct > 35 o Ct Non determinato. Infatti la reazione di amplificazione a bassa efficienza del Controllo Interno può essere annullata dalla competizione con la reazione di amplificazione ad alta efficienza di HSV2. In questo caso il campione è comunque idoneo e il risultato positivo del saggio è valido.

Analisi quantitativa dei risultati

Dopo avere eseguito la procedura per l'analisi qualitativa dei risultati è possibile svolgere l'analisi quantitativa dei risultati relativi ai campioni positivi.

I valori di **Ct** per HSV2 nelle reazioni di amplificazione dei quattro **Q - PCR standard** sono utilizzati per calcolare la **Curva standard** (Results > Standard Curve) della sessione di amplificazione e per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Curva Standard detector FAM "HSV2"	Intervallo di accettabilità	Amplificazione / Rilevazione
Coefficiente di Correlazione (R2)	**0,990 ≤ R2 ≤ 1,000**	**CORRETTA**

Se il valore del **Coefficiente di correlazione** (**R2**) non rientra nei limiti, si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (dispensazione errata della miscela di reazione o degli standard, degradazione della miscela di reazione o degli standard, impostazione errata della posizione degli standard, impostazione errata del ciclo termico) che possono causare risultati non corretti. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

I valori di **Ct** per HSV2 nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione** e la **Curva standard** della sessione di amplificazione sono utilizzati per calcolare la **Quantità** (**Quantity**) di DNA bersaglio presente nelle reazioni di amplificazione relative ai campioni.

Questo prodotto è in grado di quantificare da 1.000.000 a 10 copie di DNA del gene della gpG di HSV2 per reazione di amplificazione, corrispondenti ai genomi Equivalenti per reazione (intervallo di misurazione lineare, vedi Caratteristiche delle prestazioni), come descritto nella tabella seguente:

Risultato del campione detector FAM "HSV2"	genomi Equivalenti di HSV2 per reazione
Quantità > 1 x 10^6	**SUPERIORI A 1.000.000**
1 x 10^1 ≤ Quantità ≤ 1 x 10^6	**= Quantità**
Quantità < 1 x 10^1	**INFERIORI A 10**

I risultati (**Quantità**) relativi a ciascun **campione** (Results > Report) sono utilizzati per calcolare i genomi Equivalenti (**copie**) di HSV2 presenti nel campione di partenza (**Nc**) secondo questa formula:

$$\text{Nc (copie)} = \frac{\text{Ve x Quantità}}{\text{Vc x Va x Ep}}$$

Dove:
Vc è la quantità del campione usato nell'estrazione in rapporto all'unità di misura richiesta,
Ep è l'efficienza della procedura, estrazione ed amplificazione, **espressa in decimali**,
Ve è il volume totale ottenuto dall'estrazione **espresso in µL**,
Va è il volume del prodotto di estrazione usato nella reazione di amplificazione **espresso in µL**,
Quantità è il risultato della reazione di amplificazione relativa al campione **espresso in copie per reazione**.

Quando si utilizzano campioni di sangue intero, plasma raccolti in EDTA o di liquido cefalorachidiano e il sistema di estrazione **«ELITe STAR»** e si vuole ottenere il risultato **espresso in copie / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero, plasma e liquido cefalorachidiano e «ELITe STAR»
Nc (copie / mL) = 28 x Quantità

Quando si utilizzano campioni di sangue intero, plasma raccolti in EDTA o di liquido cefalorachidiano e il sistema di estrazione **«ELITe GALAXY»** e si vuole ottenere il risultato **espresso in copie / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero, plasma e liquido cefalorachidiano e «ELITe GALAXY»
Nc (copie / mL) = 35 x Quantità

Quando si utilizzano campioni di sangue intero raccolto in EDTA e il kit di estrazione «**EXTRAblood**» e si vuole ottenere il risultato **espresso in copie / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e «EXTRAblood»
Nc (copie / mL) = 25 x Quantità

Quando si utilizzano campioni di plasma raccolto in EDTA o di liquido cefalorachidiano e il sistema di estrazione «**NucliSENS® easyMAG®**» e si vuole ottenere il risultato **espresso in copie / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per plasma, liquido cefalorachidiano e «NucliSENS® easyMAG®»
Nc (copie / mL) = 10 x Quantità

Quando si utilizzano campioni di plasma raccolto in EDTA e il sistema di estrazione «**QIAsymphony® SP/AS**» e si vuole ottenere il risultato **espresso in copie / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per plasma e «QIAsymphony® SP/AS»
Nc (copie / mL) = 12 x Quantità

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS032PLD

Calcolo dei limiti dell'intervallo di misurazione lineare

I limiti dell'intervallo di misurazione lineare come copie / mL di campione, quando si utilizza una particolare metodica di estrazione, possono essere calcolati a partire dall'intervallo di misurazione lineare della reazione di amplificazione secondo questa formula:

$$\text{Limite inferiore (copie / mL)} = \frac{\text{Ve x 10 copie}}{\text{Vc x Va x Ep}}$$

$$\text{Limite superiore (copie / mL)} = \frac{\text{Ve x 1.000.000 copie}}{\text{Vc x Va x Ep}}$$

Quando si utilizza il kit di estrazione «**EXTRAblood**» con campioni di sangue intero raccolto in EDTA la formula diventa:

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (copie / mL) con «EXTRAblood»
Limite inferiore (copie / mL) = 25 x 10 copie **Limite superiore (copie / mL) = 25 x 1.000.000 copie**
da 250 a 25.000.000 copie / mL

Quando si utilizza il sistema di estrazione **«ELITe STAR»** con campioni di sangue intero, plasma raccolto in EDTA o di liquido cefalorachidiano la formula diventa:

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (copie / mL) con «ELITe STAR»
Limite inferiore (copie / mL) = 28 x 10 copie **Limite superiore (copie / mL) = 28 x 1.000.000 copie**
da 280 a 28.000.000 copie / mL

Quando si utilizza il sistema di estrazione **«ELITe GALAXY»** con campioni di sangue intero, plasma raccolto in EDTA o di liquido cefalorachidiano, la formula diventa:

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (copie / mL) con «ELITe GALAXY»
Limite inferiore (copie / mL) = 35 x 10 copie **Limite superiore (copie / mL) = 35 x 1.000.000 copie**
da 350 a 35.000.000 copie / mL

Quando si utilizza il sistema di estrazione «**NucliSENS® easyMAG®**» con campioni di plasma raccolto in EDTA o di liquido cefalorachidiano la formula diventa:

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (copie / mL) con «NucliSENS® easyMAG®»
Limite inferiore (copie / mL) = 10 x 10 copie **Limite superiore (copie / mL) = 10 x 1.000.000 copie**
da 100 a 10.000.000 copie / mL

Quando si utilizza il sistema di estrazione «**QIAsymphony® SP/AS**» con campioni di plasma raccolto in EDTA la formula diventa:

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (copie / mL) con «QIAsymphony® SP/AS»
Limite inferiore (copie / mL) = 12 x 10 copie **Limite superiore (copie / mL) = 12 x 1.000.000 copie**
da 120 a 12.000.000 copie / mL

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

La sensibilità analitica di questo saggio permette di rilevare la presenza di circa 10 molecole di DNA bersaglio nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio, come limite di rilevazione, è stata testata utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 20 µL in DNA genomico umano ad un titolo di 500 ng / 20 µL. Questo campione è stato impiegato in 50 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
10 copie DNA plasmidico + 500 ng di DNA genomico umano	50	50	0

La sensibilità analitica del saggio è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di HSV2 entro la concentrazione limite usato in associazione a campioni di sangue intero e **«ELITe GALAXY»**. Il pannello è stato preparato diluendo il campione HSV08-12 del "QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel" (Qnostics, Ltd, Regno Unito)" in sangue intero raccolto in EDTA e negativo per il DNA di HSV2. Le concentrazioni virali variavano da 10 copie / mL a 560 copie / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in dodici replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **«ELITe GALAXY»** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è il 95%. La sensibilità analitica è riportata come copie/mL nella tabella seguente:

Limite di rilevazione con campioni di sangue intero e ELITe GALAXY (copie / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	**171 copie / mL**	112 copie / mL	505 copie / mL

La sensibilità analitica del saggio è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di HSV2 entro la concentrazione limite usato in associazione a campioni di plasma e **«ELITe GALAXY»**. Il pannello è stato preparato diluendo il campione HSV08-12 del "QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel" (Qnostics, Ltd, Regno Unito)" in plasma raccolto in EDTA e negativo per il DNA di HSV2. Le concentrazioni virali variavano da 10 copie / mL a 560 copie / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in dodici replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **«ELITe GALAXY»** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è il 95%.

La sensibilità analitica è riportata come copie/mL nella tabella seguente:

Limite di rilevazione con campioni di plasma e ELITe GALAXY (copie / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	**119 copie / mL**	75 copie / mL	547 copie / mL

Sensibilità analitica: intervallo di misurazione lineare

La sensibilità analitica di questo saggio permette di quantificare un titolo da 1.000.000 a 10 molecole di DNA bersaglio nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio, come intervallo di misurazione lineare, è stata determinata utilizzando un pannello di diluizioni (1 $\log_{10}$ tra una diluizione e la successiva) di DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione, la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. I punti del pannello da 10^7 molecole per reazione a 10^1 molecole per reazione sono stati impiegati in 9 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita con la regressione lineare, ha dimostrato che il saggio presenta una risposta lineare per tutti i punti del pannello (coefficiente di correlazione lineare superiore a 0,99).

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a 10^6 molecole per reazione, corrispondenti ai genomi Equivalenti per reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più alta, (10^5 molecole / 20 µL).

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a 10 molecole per reazione, corrispondenti ai genomi Equivalenti per reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più bassa, (10^2 molecole / 20 µL).

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare (copie / reazione)	
Limite superiore	1.000.000 copie / reazione
Limite inferiore	10 copie / reazione

A pagina 26 sono calcolati i limiti dell'intervallo di misurazione lineare espressi in copie / mL riferiti al kit di estrazione utilizzato.

Sensibilità analitica: Precisione e Accuratezza

La precisione del saggio, come variabilità dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione, ha permesso di ottenere un Coefficiente di Variazione percentuale (CV %) medio delle quantità misurate di circa il 18,6% nell'intervallo da 10^6 molecole a 10^1 molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

L'accuratezza del saggio, come differenza tra la media dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione e il valore teorico della concentrazione del campione, ha permesso di ottenere un'Inaccuratezza percentuale media delle quantità misurate di circa il 14,4% nell'intervallo da 10^6 molecole a 10^1 molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La precisione e l'accuratezza sono state determinate utilizzando i dati ottenuti nelle prove per lo studio dell'intervallo di misurazione lineare.

Sensibilità analitica: riproducibilità con pannello di materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica del saggio, come riproducibilità dei risultati a confronto con i risultati ottenuti con altre metodiche e in diversi laboratori, è stata verificata con un pannello per proficiency test.

Le prove sono state eseguite utilizzando come materiale di riferimento calibrato un panel di diluizioni di HSV2 entro la concentrazione limite (QCMD 2009 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con **«ELITe STAR»** ed amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e «ELITe STAR»				
Campione	Virus	Consensus dei saggi commerciali Log_{10} conc. virale	Deviazione Standard	Media dei risultati Log_{10} copie / mL
HSV09-01	HSV1	2,215	0,789	-
HSV09-02	HSV2	2,236	0,938	1,687
HSV09-03	HSV2	3,293	0,915	3,700
HSV09-04	HSV2	2,314	0,898	2,329
HSV09-05	Negativo	NA	-	-
HSV09-06	HSV1	2,402	0,665	-
HSV09-07	HSV1	4,189	0,599	-
HSV09-08	HSV2	2,389	0,827	2,352
HSV09-09	Negativo	NA	-	-
HSV09-10	HSV1	3,205	0,767	-

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente. I risultati quantitativi ottenuti rientrano nell'intervallo definito dal Consensus ± 1 Deviazione Standard.

Ulteriori test sono stati effettuati utilizzando materiale di riferimento calibrato un panel di diluizioni di HSV2 entro il limite di concentrazione (QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito). Ogni campione è stato testato in duplicato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **«ELITe GALAXY»** ed amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati in copie/mL sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e «ELITe GALAXY»				
Campioni	Consensus dei saggi commerciali Log_{10} virus conc.	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log_{10} copie / mL
HSV12-01	Negativo, NA	-	0/2	-
HSV12-02	HSV1, 3,910	0,582	0/2	-
HSV12-03	HSV2, 1,948	0,305	1/2	2,128
HSV12-04	HSV1, 3,680	0,547	0/2	-
HSV12-05	HSV2, 1,352	0,629	0/2	-
HSV12-06	HSV1, 2,318	0,441	0/2	-
HSV12-07	HSV1, 2,014	0,296	0/2	-
HSV12-08	HSV2, 3,424	1,098	2/2	3,634
HSV12-09	Negativo, NA	-	0/2	-
HSV12-10	HSV2, 3,417	1,042	2/2	3,861

Tutti i campioni negativi sono stati rilevati correttamente. I campioni positivi entro il limite di rilevazione teorico del sistema (350 copie / mL) sono stati correttamente rilevati nell'intervallo definito dal Consensus ± 1 Deviazione Standard. Un campione inferiore al limite di rilevazione teorico del sistema (22,5 copie / mL) è stato riportato negativo. I campioni con titolo inferiore al limite di rilevazione possono essere stocasticamente riportati come positivi o negativi.

Sensibilità diagnostica: efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi / sottotipi

La sensibilità diagnostica del saggio, come efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi / sottotipi, è stata valutata per confronto di sequenze con banche dati nucleotidiche.

L'esame delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco e della sonda fluorescente sull'allineamento delle sequenze disponibili in banca dati del gene codificante la gpG di HSV2 ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni clinici di sangue intero raccolto in EDTA positivizzati con il DNA di HSV2.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 20 campioni di sangue intero raccolto in EDTA da donatori presumibilmente negativi (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lione, Francia), positivizzati a basso titolo per il DNA di HSV2 con del QCMD 2008 Herpes simplex virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione di sangue intero è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con **«EXTRAblood»** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di HSV2	20	20	0

Tutti i campioni positivizzati per il DNA di HSV2 sono stati rilevati correttamente come positivi.
La sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale a 100%.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando 22 campioni di liquido cefalorachidiano negativi per il DNA di HSV2, positivizzati a basso titolo per il DNA di HSV2 aggiungendo il campione di ELITechGroup S.p.A., IQC032RH, 30 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi, positivizzati a basso titolo per il DNA di HSV2 aggiungendo il campione HSV08-12 (QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel , Qnostics Ltd, Regno Unito) e 30 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi, positivizzati a basso titolo per il DNA di HSV2 aggiungendo il campione HSV08-12 (QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con **«ELITe STAR»** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Liquido cefalorachidiano positivizzato per il DNA di HSV2	22	22	0
Plasma raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di HSV2	30	30	0
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di HSV2	30	29	0

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS032PLD

Un campione positivo di sangue intero per HSV2 è risultato non valido. La sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando 21 campioni di liquido cefalorachidiano negativi per il DNA di HSV2, positivizzati a basso titolo per il DNA di HSV2 aggiungendo il campione HSV2MQP01 - High sample (Molecular Q Panel HSV2MQP01, Qnostics Ltd, Regno Unito), 30 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi, positivizzati a basso titolo per il DNA di HSV2 aggiungendo il campione HSV08-12 (QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel , Qnostics Ltd, Regno Unito) e 32 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi, positivizzati a basso titolo per il DNA di HSV2 aggiungendo il campione HSV08-12 (QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito) e il campione HSV10-01 (QCMD 2010 Herpes Simplex Virus EQA Panel , Qnostics Ltd, Regno Unito) . Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con **«ELITe GALAXY»** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Liquido cefalorachidiano positivizzato per il DNA di HSV2	21	21	0
Plasma raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di HSV2	30	30	0
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di HSV2	32	32	0

Tutti i campioni sono stati rilevati positivi per il DNA di HSV2. La sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

Specificità analitica: assenza di crossreattività con marcatori potenzialmente interferenti

La specificità analitica del saggio, come assenza di crossreattività con altri marcatori potenzialmente interferenti, è stata valutata per confronto di sequenze con banche dati nucleotidiche.

L'esame dell'allineamento delle sequenze degli oligonucleotidi di innesco e della sonda fluorescente con le sequenze disponibili in banca dati di organismi diversi da HSV2, tra cui quelle dei genomi completi di HSV1 e VZV, i virus erpetici umani più simili a HSV2, ha dimostrato la loro specificità e l'assenza di omologie significative.

La specificità analitica del saggio, come assenza di crossreattività con altri marcatori potenzialmente interferenti, è stata verificata utilizzando un pannello per proficiency test.

La specificità analitica è stata verificata utilizzando come materiale di riferimento calibrato un pannello comprensivo di campioni positivi per HSV1 e VZV (QCMD 2007 Herpes simplex virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.
I risultati ottenuti sono riportati al paragrafo "Sensibilità analitica: riproducibilità con pannello di materiale di riferimento certificato".
Nessuna crossreattività è stata rilevata con i campioni positivi per il DNA di HSV1 e VZV.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni clinici di sangue intero raccolto in EDTA negativi per il DNA di HSV2.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 24 campioni di sangue intero raccolto in EDTA da donatori presumibilmente negativi per il DNA di HSV2 (Biological Sample Library Europe S.A.S., Francia). Ciascun campione di sangue intero è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con **«EXTRAblood»** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di HSV2	24	0	24

Tutti i campioni sono stati rilevati negativi per il DNA di HSV2. La specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando 24 campioni di liquido cefalorachidiano negativi per il DNA di HSV2, 30 campioni di plasma raccolto in EDTA, negativi per il DNA di HSV2 e 30 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi per il DNA di HSV2 (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con **«ELITe STAR»** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Liquido cefalorachidiano negativo per il DNA di HSV2	24	0	24
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di HSV2	30	0	30
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di HSV2	30	0	30

Tutti i campioni sono stati rilevati negativi per il DNA di HSV2. La specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando 22 campioni di liquido cefalorachidiano negativi per il DNA di HSV2, 34 campioni di plasma raccolto in EDTA, negativi per il DNA di HSV2 e 36 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi per il DNA di HSV2 (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con **«ELITe GALAXY»** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Liquido cefalorachidiano negativo per il DNA di HSV2	22	0	22
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di HSV2	34	0	34
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di HSV2	36	0	36

Tutti i campioni sono stati rilevati negativi per il DNA di HSV2. La specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

Nota bene: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "HSV2 ELITe MGB Kit", FTP RTS032PLD.

Roche cobas z 480 analyzer

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con **DNA estratto** dai seguenti campioni clinici:

Sangue intero raccolto in EDTA

I campioni di sangue intero destinati all'estrazione del DNA devono essere raccolti in EDTA ed identificati secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni. I campioni possono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi. Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con lo strumento **«MagNA Pure 24 System»**, con **versione di software 1.0** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **"Pathogen200"** e seguire queste indicazioni: dispensare **350 µL** di campione nel MagNA Pure Tube 2.0 mL, caricare il tubo sullo strumento e avviare l'estrazione. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** 20 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL. Il **CPE** deve essere diluito 1:2 in acqua ultrapura per biologia molecolare. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Plasma raccolto in EDTA

I campioni di plasma destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti.

Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS032PLD

dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con lo strumento **«MagNA Pure 24 System»**, con **versione di software 1.0** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **"Pathogen200"** e seguire queste indicazioni: dispensare **350 µL** di campione nel MagNA Pure Tube 2.0 mL, caricare il tubo sullo strumento e avviare l'estrazione. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** 20 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL. Il **CPE** deve essere diluito 1:2 in acqua ultrapura per biologia molecolare. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Sostanze interferenti

Il DNA estratto dal campione di partenza non deve contenere eparina, emoglobina, destrano, Ficoll®, etanolo o 2-propanolo per evitare fenomeni di inibizione e la comparsa di frequenti risultati non validi.

Quantità di DNA genomico umano elevate nel DNA estratto dal campione possono inibire la reazione di amplificazione.

Non sono disponibili dati riguardo eventuali fenomeni di inibizione da parte di farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

Controlli di amplificazione

È assolutamente necessario convalidare ciascuna sessione di amplificazione allestendo una reazione per il controllo negativo e una reazione per il controllo positivo.

Come controllo negativo utilizzare acqua ultrapura per biologia molecolare (non fornita nel kit) da aggiungere alla reazione al posto del DNA estratto dal campione.

Per il controllo positivo utilizzare il prodotto **«HSV2 - ELITe Positive Control»** o in alternativa **«HSV2 – ELITe Positive Control RF»** oppure il prodotto **«HSV2 ELITe Standard»**.

Controlli di qualità

È consigliato convalidare l'intera procedura di analisi di ciascuna sessione, estrazione ed amplificazione, utilizzando un campione negativo e un campione positivo già testati oppure del materiale di riferimento calibrato.

PROCEDURA

Impostazione della sessione di amplificazione real time
(Da eseguire nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione)

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
- accendere il computer di controllo, accendere il thermal cycler per real time, avviare il software dedicato e, dalla finestra principale, aprire una sessione "New Experiment";
- impostare il volume di reazione ("Reaction Volume") a 40 µL;
- assegnare un identificativo a ogni campione ("Sample Editor");
- definire il Ciclo termico della reazione secondo la tabella seguente:

Ciclo termico		
Fase	**Temperature**	**Tempi**
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 (opzionale)	95 °C	15 sec.
	40 °C	30 sec.
	80 °C	15 sec.

Nota bene: l'acquisizione della fluorescenza avviene in modo singolo, impostare le Ramp Rate (°C/s) a 4,4°C/s.

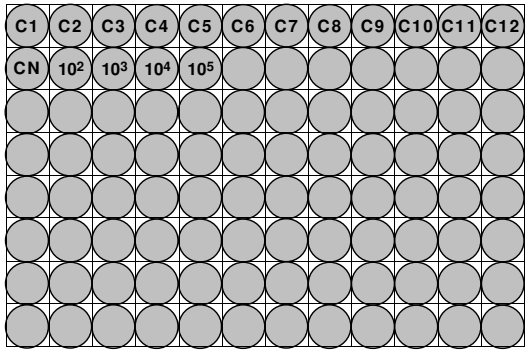
- selezionare i canali di detezione del segnale: il "detector" per la sonda per HSV2 con il "canale FAM 465-510" e il "detector" per la sonda per il controllo interno CI con il "canale VIC 540-580";

Compilare il **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale di istruzioni per l'uso trascrivendo queste informazioni oppure stampare l'organizzazione della micropiastra. Il **Piano di lavoro** dovrà essere

seguito con attenzione durante il trasferimento nei pozzetti della miscela di reazione e dei campioni.

Nota bene: per la determinazione del titolo del DNA nel campione di partenza è necessario allestire una serie di reazioni con i **Q - PCR Standard** (10^5 copie, 10^4 copie, 10^3 copie, 10^2 copie) per ottenere la **Curva standard**.

Si illustra di seguito, a titolo di esempio, come può essere organizzata l'analisi quantitativa di 12 campioni.



Legenda: C1 - **C12**: Campioni da analizzare; **CN**: Controllo negativo di amplificazione;
10^2: Standard 10^2 copie; **10^3**: Standard 10^3 copie; **10^4**: Standard 10^4 copie; **10^5**: Standard 10^5 copie.

Allestimento dell'amplificazione
(Da eseguire nell'area di estrazione / allestimento della reazione di amplificazione)

Prima di iniziare la sessione è necessario:
- prelevare e scongelare le provette con i campioni da analizzare. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare le provette di **HSV2 Q - PCR Mix** necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **25 reazioni**. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare la provetta di **HSV2 – Positive Control** o in alternativa **HSV2 – ELITe Positive Control RF** o le provette di **HSV2 Q - PCR Standard**. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare l'**AD-plate** che sarà utilizzata nella sessione facendo attenzione a maneggiarla con guanti senza polvere e a non danneggiare i pozzetti.

1. Trasferire, depositandoli accuratamente sul fondo senza creare bolle, **20 µL** di miscela di reazione **HSV2 Q - PCR Mix** nei pozzetti dell'**AD-plate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**.

Nota bene: Se non si utilizza tutta la miscela di reazione, conservare il volume rimasto al buio a -20 °C per un massimo di un mese. Congelare e scongelare la miscela di reazione per un massimo di **5 VOLTE**.

2. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **DNA estratto** del primo campione nel corrispondente pozzetto dell'**AD-plate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il campione pipettando per tre volte il **DNA estratto** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con tutti gli altri **DNA estratti**.
3. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **Acqua ultrapura per biologia molecolare** (non fornita nel prodotto) nel pozzetto dell'**AD-plate** del controllo negativo di amplificazione come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo negativo pipettando per tre volte l'**Acqua ultrapura per biologia molecolare** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.
4. In base al tipo di risultato richiesto (qualitativo o quantitativo), seguire una delle due opzioni:

   - Quando è richiesto un risultato **qualitativo** dell'analisi (rilevazione del DNA di HSV2): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **HSV2 – Positive Control** o in alternativa **HSV2 – ELITe Positive Control RF** nel corrispondente pozzetto dell'**AD-plate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo positivo pipettando per tre volte il **HSV2 – Positive Control** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.

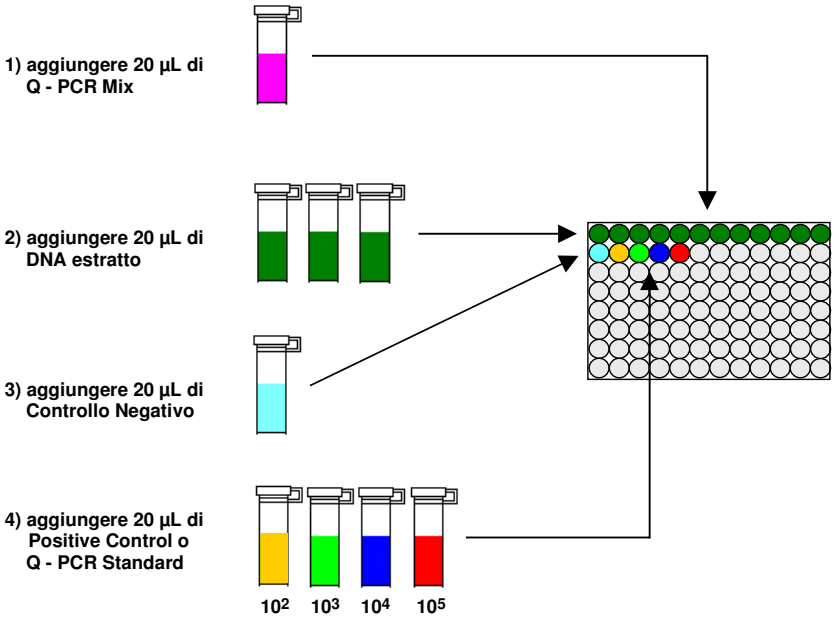
   - Quando è richiesto un risultato **quantitativo** dell'analisi (quantificazione del DNA di HSV2): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **HSV2 Q - PCR Standard 10^2** nel

corrispondente pozzetto dell'**AD-plate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene lo standard pipettando per tre volte il **HSV2 Q - PCR Standard 10^2** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con i **HSV2 Q - PCR Standard 10^3, 10^4, 10^5**.

5. Sigillare accuratamente l'**AD-plate** con il **Sealing Film.**
6. Trasferire l'**AD-plate** nel thermal - cycler per real time nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione ed avviare il ciclo termico di amplificazione salvando l'impostazione della sessione con un identificativo univoco e riconoscibile (per es. "anno-mese-giorno-HSV2-EGSpA").

Nota bene: Al termine del ciclo termico l'**AD-plate** con i prodotti di reazione deve essere rimossa dallo strumento ed eliminata in modo da non generare contaminazioni ambientali. **Non sollevare mai** il **Sealing Film dall'Amplification microplate** in modo da evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

Nella figura di seguito è illustrata in sintesi la procedura di allestimento delle reazioni di amplificazione.



Analisi qualitativa dei risultati

I valori registrati della fluorescenza emessa dalla sonda specifica per HSV2 (detector "HSV2") e dalla sonda specifica per il Controllo Interno (detector "CI") nelle reazioni di amplificazione devono essere analizzati dal software dello strumento.

Selezionare il menù "Analysis" e scegliere il tipo "Absolute Quant/Fit Points" (n°2 punti)

Selezionare il gruppo di campioni su cui applicare l'analisi

Prima di eseguire l'analisi, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
- impostare manualmente (bottone Background) l'intervallo di calcolo del **Livello di fluorescenza di fondo** (**Background**) dal ciclo 2 al ciclo 6;

Selezionare il detector (bottone Filter Comb) su cui applicare l'analisi

Per campioni di **Plasma**

- impostare manualmente **Soglia** (**Threshold**) e **Noiseband** per il detector FAM "HSV2" a **0,55**;
- impostare manualmente **Soglia** (**Threshold**) e **Noiseband** per il detector VIC "CI" a **1,2**

Per campioni di **Sangue intero**

- impostare manualmente **Soglia** (**Threshold**) e **Noiseband** per il detector FAM "HSV2" a **0,80**;
- impostare manualmente **Soglia** (**Threshold**) e **Noiseband** per il detector VIC "CI" a **1,5**

I valori di fluorescenza emessi dalle sonde specifiche nella reazione di amplificazione e il valore **Soglia** e **Noiseband** sono utilizzati per determinare il **Ciclo Soglia** (**Ct**, **Threshold cycle**), cioè il ciclo in cui è stato raggiunto il valore **Soglia** di fluorescenza.

Nella reazione di amplificazione con il **Positive Control***, il valore di **Ct** per HSV2 (result > Report) è utilizzato per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione Positive Control detector "HSV2"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Positive Control** è **Ct > 25** o **Ct Non determinato** (**Undetermined**), il DNA bersaglio non è stato rilevato correttamente. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (dispensazione errata della miscela di reazione o degli standard, 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. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

***Nota bene**: Quando questo prodotto è utilizzato per la quantificazione del DNA di HSV2, al posto della reazione con il **Positive Control** è stata allestita la serie di reazioni con i **Q-PCR Standard**. In questo caso per convalidare l'amplificazione e la rilevazione si deve fare riferimento alla reazione di amplificazione del **Q-PCR Standard 10^5 (Ct ≤ 25).**

Nella reazione di amplificazione del **Controllo negativo**, il valore di **Ct** per HSV2 (finestra Analysis) è utilizzato per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione Controllo negativo detector "HSV2"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct Non determinato	NEGATIVO	CORRETTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Controllo negativo** è diverso da **Ct Non determinato** (**Undetermined**) per HSV2, è stata rilevata la presenza di DNA bersaglio. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (contaminazione) che possono causare risultati non corretti e falsi positivi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

Nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione**, il valore di **Ct** per HSV2 è utilizzato per rilevare la presenza di DNA bersaglio, mentre il valore di **Ct** per il Controllo Interno è utilizzato per convalidare l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione.

Nota bene: Verificare con il software dello strumento (finestra Analysis) che il **Ct** sia determinato da un rapido e regolare incremento dei valori di fluorescenza e non da fenomeni di picco o incremento graduale del segnale di fondo (fondo irregolare o elevato).

I risultati come **Ct** delle reazioni di amplificazione di ciascun **campione** (finestra Analysis) sono utilizzati come descritto nella tabella seguente:

Reazione del campione		Idoneità del campione	Risultato del saggio	DNA di HSV2
detector "HSV2"	detector "CI"			
Ct Non determinato	Ct > 35 o Ct Non determinato	non idoneo	non valido	-
	Ct ≤ 35	idoneo	valido, negativo	NON RILEVATO
Ct Determinato	Ct > 35 o Ct Non determinato	idoneo	valido, positivo	RILEVATO
	Ct ≤ 35	idoneo	valido, positivo	RILEVATO

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per HSV2 e **Ct > 35** o **Ct Non determinato** per il Controllo Interno, non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA del Controllo Interno. In questo caso si sono verificati problemi nella fase di amplificazione

(amplificazione non efficiente o nulla) o nella fase di estrazione (degradazione del DNA del campione, campione con numero di cellule insufficienti, perdita del DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nel DNA estratto) che possono causare risultati errati e falsi negativi. Il campione non è idoneo, il saggio non è valido e deve essere ripetuto a partire dall'estrazione di un nuovo campione.

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per HSV2 e **Ct ≤ 35** per il Controllo Interno, il DNA di HSV2 non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA di HSV2 sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi Caratteristiche delle prestazioni). In questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli esiti di altri esami di laboratorio relativi al paziente.

Nota bene: Quando nella reazione di amplificazione relativa ad un campione è stata rilevata la presenza di DNA di HSV2, l'amplificazione del Controllo Interno può dare come risultato un Ct > 35 o Ct Non determinato. Infatti la reazione di amplificazione a bassa efficienza del Controllo Interno può essere annullata dalla competizione con la reazione di amplificazione ad alta efficienza di HSV2. In questo caso il campione è comunque idoneo e il risultato positivo del saggio è valido.

Analisi quantitativa dei risultati

Dopo avere eseguito la procedura per l'analisi qualitativa è possibile svolgere l'analisi quantitativa dei risultati relativi ai campioni positivi.

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Q - PCR Standard 10^5** è **Ct > 25** o **Ct Non determinato** (**Undetermined**) o i valori di Ct nelle reazioni di amplificazione dei quattro Q - PCR standard non sono posizionati regolarmente sulla retta standard, il DNA bersaglio non è stato rilevato correttamente. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (dispensazione errata della miscela di reazione o degli standard, degradazione della miscela di reazione o degli standard, impostazione errata della posizione degli standard, impostazione errata del ciclo termico) che possono causare risultati non corretti. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

I valori di **Ct** per HSV2 nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione** e la **Curva standard** (bottone **Standard Curve**) della sessione di amplificazione sono utilizzati per calcolare la **Quantità** (**Quantity**) di DNA bersaglio presente nelle reazioni di amplificazione relative ai campioni.

Questo prodotto è in grado di quantificare da 1.000.000 a circa 10 copie per reazione, da 25.000.000 a 250 copie per mL usando il sistema di estrazione **MagNA Pure 24** (vedi Caratteristiche delle prestazioni), come descritto nella tabella seguente:

Risultato del campione detector FAM "HSV2"	copie di HSV2 per reazione
Quantità > 1 x 10^6	SUPERIORI A 1.000.000
1,0 x 10^1 ≤ Quantità ≤ 1 x 10^6	= Quantità
Quantità < 1,0 x 10^1	INFERIORI A 10

I risultati (**Quantità**) relativi a ciascun **campione** (finestra Analysis) sono utilizzati per calcolare le copie di HSV2 presenti nel campione di partenza (**Nc**) secondo questa formula:

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

Dove:
Vc è la quantità del campione usato nell'estrazione in rapporto all'unità di misura richiesta;
Ep è l'efficienza della procedura, estrazione ed amplificazione, **espressa in decimali**,
Ve è il volume totale ottenuto dall'estrazione **espresso in µL**;
Va è il volume del prodotto di estrazione usato nella reazione di amplificazione **espresso in µL**;
Quantità è il risultato della reazione di amplificazione relativa al campione **espresso in copie per reazione**.

Quando si utilizzano campioni di sangue intero e plasma raccolti in EDTA e il sistema di estrazione **MagNA Pure 24** e si vuole ottenere il risultato **espresso in copie / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e plasma e MagNA Pure 24
Nc (copie / mL) = 25 x Quantità

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

La sensibilità analitica di questo saggio, come limite di rilevazione, permette di rilevare la presenza di circa 10 copie nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio, come limite di rilevazione, è stata testata utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 20 µL in 150.000 copie di pBETAGLOBINA / 20 µL. Questo campione è stato impiegato in 27 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
10 copie DNA plasmidico + 150.000 copie di pBETAGLOBINA	27	27	0

Sensibilità analitica: intervallo di misurazione lineare

La sensibilità analitica di questo saggio, come intervallo di misurazione lineare, permette di quantificare da circa 1.000.000 a circa 10 copie nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio è stata valutata utilizzando un pannello di diluizioni (1 Log_{10} tra una diluizione e la successiva) di DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione, la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. I punti del pannello da 10^7 molecole per reazione a 10^1 molecole per reazione sono stati impiegati in 9 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. L'analisi dei dati ottenuti, eseguita con la regressione lineare, ha dimostrato che il saggio presenta una risposta lineare per tutti i punti del pannello (coefficiente di correlazione lineare superiore a 0,99).

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a circa 10 copie / reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più bassa (10^2 copie / 20 µL).

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a 10^6 copie / reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più alta (10^5 copie / 20 µL).

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare con MagNA Pure 24		
	Limite inferiore	Limite superiore
copie / mL	**250**	**25.000.000**
copie / reazione	**10**	**1.000.000**

Le trasformazioni da copie / mL a copie / reazione e viceversa sono state calcolate come illustrato a pagina 39.

Sensibilità analitica: Precisione e Accuratezza

La precisione del saggio, come variabilità dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione, ha permesso di ottenere un Coefficiente di Variazione percentuale (CV %) di Ct inferiore al 1% nell'intervallo da 10^6 molecole a 10^1 molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La precisione del saggio, come variabilità dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione, ha permesso di ottenere un Coefficiente di Variazione percentuale (CV %) medio delle quantità misurate di circa il 9% nell'intervallo da 10^6 molecole a 10^1 molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

L'accuratezza del saggio, come differenza tra la media dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione e il valore teorico della concentrazione del campione, ha permesso di ottenere un'inaccuratezza percentuale media delle quantità logaritmiche misurate di circa il 6,4% nell'intervallo da 10^6 molecole a 10^1 molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La precisione e l'accuratezza sono state determinate utilizzando i dati ottenuti nelle prove per lo studio dell'intervallo di misurazione lineare.

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS032PLD

Sensibilità analitica: riproducibilità con materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica del saggio, come riproducibilità dei valori di un materiale di riferimento calibrato, è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento il pannello calibrato «HSV2 Molecular 'Q' Panel» (Qnostics, Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato testato in 2 replicati eseguendo l'estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e «MagNA Pure 24»	
Campione	**Positivi / Replicati**
HSV2MQP01-High	2/2
HSV2MQP01-Medium	2/2
HSV2MQP01-Low	2/2
HSV2MQP01-Negative	0/2

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati.

La sensibilità analitica del saggio, come riproducibilità dei valori di un materiale di riferimento calibrato, è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento il pannello calibrato QCMD 2017 Herpes Simplex Virus DNA Panel (HSVDNA17S Qnostics Ltd, Regno Unito) un panello di diluizioni di HSV2. Ciascun campione del pannello è stato testato in 2 replicati eseguendo l'estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e «MagNA Pure 24»		
Campione	Stato del Campione	Positivi / Replicati
HSVDNA17S-01	HSV1 positivo, HSV2 negativo	0/2
HSVDNA17S -02	HSV1 positivo, HSV2 negativo	0/2
HSVDNA17S -03	HSV1 positivo, HSV2 negativo	0/2
HSVDNA17S -04	HSV1 positivo, HSV2 negativo	0/2
HSVDNA17S -05	HSV1 positivo, HSV2 negativo	0/2
HSVDNA17S -06	HSV2 Rilevato frequentemente	2/2
HSVDNA17S -07	HSV2 Rilevato frequentemente	2/2
HSVDNA17S -08	HSV2 Rilevato frequentemente	2/2
HSVDNA17S -09	HSV2 Rilevato	2/2
HSVDNA17S -10	HSV2 Rilevato frequentemente	2/2

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 30 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi per il DNA di HSV2, che sono stati positivizzati per il DNA di HSV2 aggiungendo "HSV2MQP01-High" (Qnostics Ltd, Regno Unito) e 30 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di HSV2, che sono stati positivizzati per il DNA di HSV2 aggiungendo "HSV2MQP01-High" (Qnostics Ltd, Regno Unito).

Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di HSV2	30	30	0
Plasma raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di HSV2	30	30	0

Tutti i campioni sono stati rilevati positivi per il DNA di HSV2. La sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 40 campioni di sangue intero raccolto in EDTA presunti negativi per il DNA di HSV2 e 34 campioni di plasma raccolto in EDTA presunti negativi per il DNA di HSV2.

Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA presunto negativo per il DNA di HSV2	40	0	40
Plasma raccolto in EDTA presunto negativo per il DNA di HSV2	34	0	34

Tutti i campioni sono stati rilevati negativi per il DNA di HSV2. La specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

Nota bene: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nella Sezione 7 del Fascicolo Tecnico di Prodotto "HSV2 ELITe MGB Kit", FTP RTS032PLD.

BIBLIOGRAFIA

E. Aurelius et al. (1993) *J. Med. Virology* 39: 179 - 186
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare con questo prodotto soltanto il DNA estratto dai seguenti campioni clinici: sangue intero raccolto in EDTA, liquido cefalorachidiano, plasma raccolto in EDTA.

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

Non utilizzare con questo prodotto DNA estratto contaminato da 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 con questo prodotto DNA estratto contenente elevate quantità di DNA genomico umano che possono inibire la reazione di amplificazione degli acidi nucleici.

Non sono disponibili dati riguardo le prestazioni di questo prodotto con il DNA estratto dai seguenti campioni clinici: sospensioni di leucociti e sospensioni di granulociti, liquido amniotico.

Utilizzare questo prodotto solo con gli strumenti validati e i campioni clinici associati indicati nella sessione "Campioni e Controlli".

Non sono disponibili dati riguardo eventuali fenomeni di inibizione da parte di 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 quindi necessario porre particolare cura durante queste fasi e seguire attentamente le istruzioni fornite con i prodotti per l'estrazione degli acidi nucleici.

La metodica di amplificazione real time degli acidi nucleici utilizzata in questo prodotto, a causa della sua elevata sensibilità analitica, è soggetta a contaminazione da parte di campioni clinici positivi per HSV2, dei controlli positivi e degli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le contaminazioni portano a risultati falsi positivi. Le modalità di realizzazione del prodotto sono in grado di limitare le contaminazioni; tuttavia questi fenomeni possono essere evitati solo con una buona pratica delle tecniche di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni fornite in questo manuale.

Questo prodotto richiede personale competente e addestrato alla manipolazione di campioni biologici in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati pericolosi per evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e aree di lavoro adeguate alla manipolazione di campioni biologici in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati pericolosi per evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede personale competente e addestrato per le procedure di biologia

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA
REF RTS032PLD

molecolare, come l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione di acidi nucleici, per evitare risultati errati.

Questo prodotto richiede aree separate per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e strumenti dedicati per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

A causa delle differenze intrinseche alle diverse tecnologie, si raccomanda di eseguire studi di correlazione per stimare queste differenze prima di passare a un nuovo prodotto.

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il DNA di HSV2 non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA di HSV2 sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi Caratteristiche delle prestazioni); in questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

Un risultato non valido ottenuto con questo prodotto indica che non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA del Controllo Interno; in questo caso l'analisi del campione dovrà essere ripetuta a partire dall'estrazione con possibili ritardi nell'ottenimento del risultato.

Eventuali polimorfismi nella regione del genoma virale in cui ibridano gli oligonucleotidi di innesco e la sonda del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione e la quantificazione del DNA di HSV2.

Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli altri esami di laboratorio relativi al paziente.

Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, esiste un rischio residuo di ottenere risultati non validi, falsi positivi e falsi negativi con questo prodotto. Questo rischio residuo non può essere eliminato o ridotto ulteriormente. Questo rischio residuo in situazioni particolari, come le diagnosi prenatali e di urgenza, può contribuire a decisioni errate con conseguenze potenzialmente gravi per il paziente.

PROBLEMI E SOLUZIONI

DNA bersaglio non rilevato nella reazione di Positive Control o dei Q - PCR Standard oppure Coefficiente di correlazione della Curva standard non valido	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errore nella dispensazione nella micropiastra.	Dispensare con cura i reagenti nella micropiastra seguendo il piano di lavoro. Controllare i volumi di miscela di reazione dispensati. Controllare i volumi di controllo positivo o standard dispensati.
Preparazione scorretta della sessione con ELITe InGenius.	Controllare la posizione della miscela di reazione, del Positive Control e dei Q - PCR Standard. Controllare i volumi della miscela di reazione, del Positive Control e dei Q - PCR Standard.
Degradazione della sonda.	Utilizzare una nuova aliquota di miscela di reazione.
Degradazione del controllo positivo o standard.	Utilizzare una nuova aliquota di controllo positivo o standard.
Errore nell'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione delle reazioni del controllo positivo o standard impostata sullo strumento. Controllare il ciclo termico impostato sullo strumento.
Errore dello strumento.	Contattare il Servizio tecnico di ELITechGroup.

DNA bersaglio rilevato nella reazione di Controllo negativo	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errore nella dispensazione nella micropiastra.	Evitare di spargere il contenuto delle provette dei campioni. Cambiare sempre puntale tra un campione e l'altro. Dispensare con cura campioni, controllo negativo e controllo positivo o standard nella micropiastra seguendo il piano di lavoro.

Preparazione scorretta della sessione con ELITe InGenius.	Controllare la posizione della miscela di reazione e del Negative Control. Controllare i volumi della miscela di reazione e del Negative.
Errore durante l'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione di campioni, controllo negativo e controllo positivo o standard impostata sullo strumento.
Micropiastra sigillata male.	Sigillare con attenzione la micropiastra.
Contaminazione dell'acqua ultrapura per biologia molecolare.	Utilizzare una nuova aliquota di acqua.
Contaminazione della miscela di reazione.	Utilizzare una nuova aliquota di miscela di reazione.
Contaminazione dell'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.	Pulire superfici e strumenti con detergenti acquosi, lavare camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare il Servizio tecnico di ELITechGroup.

DNA bersaglio e Controllo Interno non rilevato nelle reazioni dei campioni	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errore nella dispensazione nella micropiastra.	Dispensare con cura i reagenti nella micropiastra seguendo il piano di lavoro. Controllare i volumi di miscela completa di reazione dispensati. Controllare i volumi di campioni dispensati.
Preparazione scorretta della sessione con ELITe InGenius.	Controllare la posizione della miscela di reazione e dei campioni. Controllare i volumi della miscela di reazione reazione e dei campioni.
Degradazione del controllo interno.	Utilizzare nuove aliquote di controllo interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR only". Ripetere l'estrazione e l'amplificazione del campione.
Problemi di conservazione dei reagenti.	Verificare che la miscela di reazione non sia rimasta esposta a temperatura ambiente per oltre 30 minuti.
Problemi durante la fase di estrazione	Verificare che la miscela di reazione non sia rimasta esposta a temperatura ambiente per oltre 30 minuti.
Errore dello strumento.	Contattare il Servizio tecnico di ELITechGroup.

Presenza di fluorescenza di fondo irregolare o elevata nelle reazioni	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errore nella dispensazione del campione.	Mescolare con cura, pipettando per tre volte, campioni, controllo negativo e controllo positivo o standard nella miscela di reazione. Evitare di creare bolle.
Errore nell'impostazione della "baseline".	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. Impostare il calcolo automatico della "baseline" selezionando l'opzione "Auto Baseline".

HSV2 ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS032PLD

Presenza di curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	**Soluzioni**
Assenza di un picco definito. Picco definito ma diverso da quello degli altri campioni e degli standard o del controllo positivo.	Controllare che il Ct del detector FAM sia minore di 30. Quantità elevate di prodotto di amplificazione presenti alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di dissociazione. Ripetere l'amplificazione del campione per confermare la presenza di un DNA bersaglio con una possibile mutazione. Per confermare la presenza di una mutazione il DNA bersaglio presente nel campione dovrebbe essere sequenziato.

Per ELITe InGenius: Errore 30103	
Possibili cause	**Soluzioni**
Elevata concentrazione del target nel campione.	Se si osserva nel plot PCR una amplificazione significativa: - ripetere l'amplificazione con il campione diluito in acqua ultrapura per biologia molecolare, impostando la sessione "PCR only" o - ripetere l'estrazione diluendo il campione primario in acqua ultrapura per biologia molecolare, impostando la sessione "Extract + PCR".

LEGENDA DEI SIMBOLI

REF	Numero di catalogo.
	Limite superiore di temperatura.
LOT	Codice del lotto.
	Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).
IVD	Dispositivo medico diagnostico in vitro.
CE	Conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98\79\CE relativa ai dispositivi medici diagnostici *in vitro*.
	Contenuto sufficiente per "N" test.
	Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.
CONT	Contenuti.
	Tenere lontano dalla luce solare.
	Fabbricante.

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

Questo prodotto contiene reagenti prodotti da Life Technologies Corporation e sono venduti in base al contratto di licenza tra ELITechGroup S.p.A. e suoi affiliati e Life Technologies Corporation. Il prezzo di acquisto di questo prodotto include i diritti - limitati e non trasferibili - di utilizzare solo questa quantità di prodotto, unicamente per attività dell'acquirente che siano direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sull'acquisto di una licenza per questo prodotto per scopi diversi da quelli definiti sopra, contattare il Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Val Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefono: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. Email: outlicensing@thermofisher.com.

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

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

"ELITe MGB®", il logo "ELITe MGB®" e ELITe InGenius e ELITe BeGenius sono registrati come marchi commerciali nell'Unione Europea.

«NucliSENS® easyMAG®» sono marchi registrati della bioMérieux.

«QIAsymphony®» è un marchio registrato della QIAGEN GmbH.

«Ficoll®» è un marchio registrato di GE Healthcare.

HSV2 ELITe MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS032PLD

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

A. Intended use

The «**HSV2 ELITe MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.
The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITe InGenius®** and **ELITe BeGenius®**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV2	Glicoprotein G (gpG)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

› **Whole Blood** EDTA, **Plasma** EDTA**, CSF**

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix
X 4
Ready-to-use PCR Master Mix 4 tubes of 540 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles per tube

› Maximum shelf-life: 24 months
› Storage temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

› **ELITe InGenius®** instrument: INT030
› **ELITe BeGenius®** instrument: INT040
› **ELITe InGenius SP200** extraction cartridge: INT032SP200
› **ELITe InGenius PCR Cassette** amplification cartridge: INT035PCR
› **ELITe InGenius SP200 Consumable Set** consumable for extraction: INT032CS
› **HSV2 - ELITe Standard:** STD032PLD
› **HSV2 - ELITe Positive Control:** CTR032PLD
› **CPE – Internal Control:** CTRCPE
› **ELITe InGenius Waste Box:** F2102-000
› **300 µL Filter Tips Axygen:** TF-350-L-R-S
› **1000 µL Filter Tips Tecan :** 30180118

F. Protocol

› Sample volume	200 µL
› CPE Internal Control volume	10 µL
› Total eluate volume	100 µL
› PCR eluate input volume	20 µL
› Q-PCR Mix volume	20 µL
› Unit of quantitative result	Copies/mL
› Frequency of controls	15 days
› Frequency of calibration	60 days

G. Performance ELITe InGenius® and ELITe BeGenius®

Matrix	Limit of Detection	Linearity Range	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	**171 cp / mL**	**171 – 25,000,000**	**96%** 22/23*	**100%** 34/34*
Plasma	**119 cp /mL**	**119 – 25,000,000**	**100%** 30/30*	**100%** 39/39*
CSF	**119 cp /mL**	**119 – 25,000,000**	**100%** 20/20*	**100%** 22/22*

**confirmed samples/ tested samples*

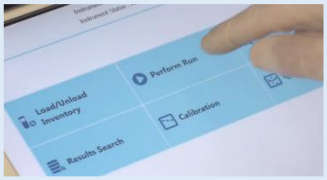
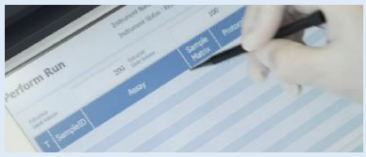
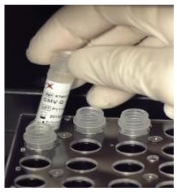
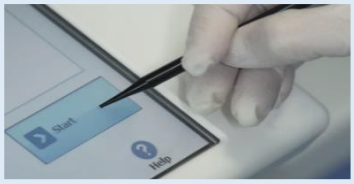
H. Procedures ELITe InGenius®

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

Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius Identification with username and password Select the mode “Closed”	**2.** Verify calibrators: HSV2 Q-PCR Standard in the “Calibration menu” Verify controls: HSV2 positve and negative controls in the “Control menu” *N.B:* Both have been run, approved and not expired	**3.** Thaw the Q- PCR-Mix and the Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select “Perform Run” on the touch screen 	**2.** Verify the extraction volume: Input: “200 µL”, eluate: “100 µL” 	**3.** Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID
4. Select the “Assay protocol” of interest 	**5.** Select the sample position: Primary tube or extraction tube 	**6.** Load the Q-PCR Mix and the Internal Control in the inventory block 
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, extraction tube and primary sample racks 	**8.** Close the door Start the run 	**9.** View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

L. Procedures ELITe BeGenius®

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

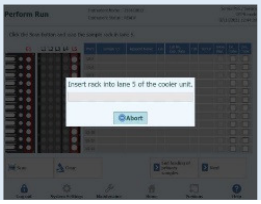
Before analysis

1. Switch on ELITe BeGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	**2.** Verify calibrators: HSV2 Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: HSV2 pos. and neg. controls in the "Control menu" *NB:* Both have been run, approved and not expired	**3.** Thaw the HSV2 Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec

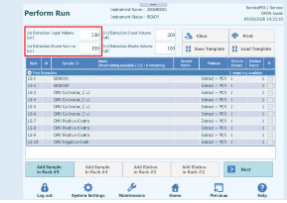
Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

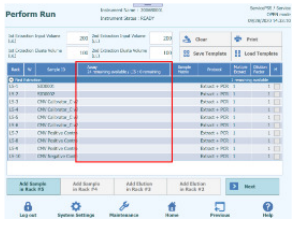
2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active



3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"

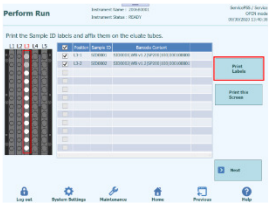


4. Select the "Assay protocol" of interest



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

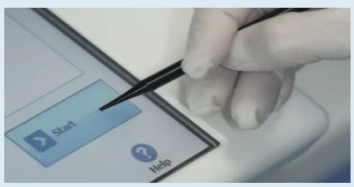
5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area



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

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

8. Close the door. Start the run



9. View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

HSV2 ELITe MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTS032PLD

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

A. Intended use

The «**HSV2 ELITe MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.
The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITe STAR** (ELITechGroup), **ELITe GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIAsymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV2	Glicoprotein G (gpG)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA › **Plasma** EDTA › **Cerebrospinal fluid**

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix
X 4
Ready-to-use PCR Master Mix 4 tubes of 540 µL 100 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles per tube

› Maximum shelf-life: 24 months
› Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

› **7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument**
› **ELITe STAR:** INT010
› **ELITe STAR 200 extraction kit:** INT011EX
› **ELITe GALAXY:** INT020
› **ELITe GALAXY 300 extraction kit:** INT021EX
›
› **HSV2 ELITe Standard:** STD032PLD
› **HSV2 - ELITe Positive Control:** CTR032PLD
› **CPE - Internal Control:** CTRCPE
› **easyMAG** - Generic protocol 2.0.1
› **QIAsymphony** - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit
› **Molecular biology grade water**

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITe STAR - ABI	Whole blood	**10 gEq/reaction**	**100%** (30/30)*	**100%** (30/30)*
	Plasma	**10 gEq/reaction**	**100%** (30/30)*	**100%** (30/30)
	CSF	**10 gEq/reaction**	**100%** (22/22)*	**100%** (24/24)*
ELITe GALAXY - ABI	Whole blood	**171 gEq/mL**	**100%** (32/32)*	**100%** (36/36)*
	Plasma	**119 gEq/mL**	**100%** (30/30)*	**100%** (34/34)*
	CSF	**10 gEq/reaction**	**100%** (21/21)*	**100%** (22/22)*

**confirmed samples/tested samples*

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITe Star	WB, Plasma,CSF	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL
ELITe Galaxy	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	CSF,Plasma	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIAsymphony	Plasma	500 µL	700 µL	85 µL	10 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

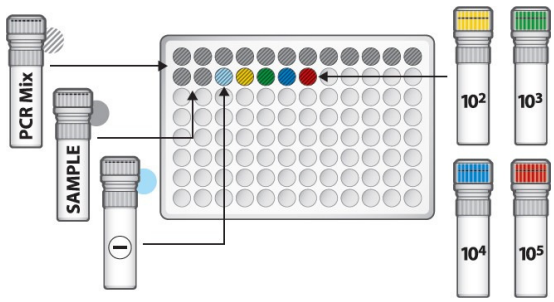
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV2" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridation step at 60°C

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection *45 cycles*	94°C 60°C 72°C	10 sec 30 sec 20 sec

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set -up

1. Thaw HSV2 Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet **20 µL** of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, **20 µL** of extracted DNA in sample wells, **20 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **20 µL** of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells
   Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification – Baseline and Threshold for qualitative analysis

Instrument	Baseline	HSV2 FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	6 - 15	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	6 - 15	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

HSV2 Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	_	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The HSV2 Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.
The sample quantification ranges from approximately 10 to 10^6 cp/reaction or approximately from 100 to 10^7 cp/mL.

HSV2 ELITe MGB® Kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Ref.: RTS032PLD

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

A. Intended use

The «**HSV2 ELITe MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for **the detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas – Z 480 analyzer (Roche)** and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV2	**Glicoprotein G (gpG)**	**FAM**
Internal Control	**human beta globin gene**	**AP525**

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA › **Plasma** EDTA

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix

X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
100 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

› Maximum shelf-life: 24 months
› Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

› **Cobas – Z 480 analyzer PCR Instrument**
› **MagNA Pure 24 System,** software 1.0
› **HSV2 - ELITe Positive Control:** CTR032PLD
› **HSV2 ELITe Standard:** STD032PLD
› **CPE Internal Control:** CTRCPE

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	**10 cp/reaction**	**100%** (30/30)*	**100%** (40/40)*
	Plasma	**10 cp/reaction**	**100%** (30/30)*	**100%** (34/34)*

**confirmed samples/tested samples*

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
MagNA Pure 24	WB, Plasma	200 µL	350 µL	100 µL	20 µL

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments PCR instruments

1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV2" detector with "FAM" and quencher "465 - 510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "540 -580"

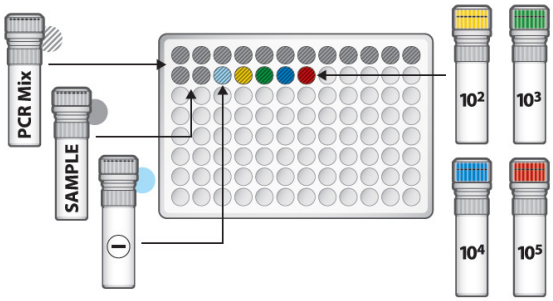
Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection *45 cycles*	94°C 60°C 72°C	10 sec 30 sec 20 sec

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw HSV2 Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet **20 µL** of Q-PCR Mix in all microplate wells in use
4. Add, **20 µL** of extracted DNA in sample wells, **20 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **20 µL** of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells

   Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification – Background and Threshold for qualitative analysis*

Instrument	Matrix	Background	HSV2 FAM	Internal Control VIC
Cobas-Z 480 PCR instruments	Plasma	2 - 6	0.55	1.2
Cobas-Z 480 PCR instruments	WB	2 - 6	0.8	1.5

**manually set the Threshold and Noiseband*

Interpretation - Qualitative results

HSV-1 Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The HSV2 Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction. The sample quantification ranges from approximately 10 to 10^6 copies/reaction or approximately from 100 to 10^7 copies/mL.

PIANO DI LAVORO

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												