

Istruzioni per l'uso

# HHV7 ELITe MGB® Kit

---

reagenti per la Real-Time PCR del DNA



REF RTS037PLD

UDI 08033891484590



**CRONOLOGIA REVISIONI**

Rev.	Avviso di modifica	Data (gg/mm/aa)
07	Nuovo paragrafo: "11.4: Incertezza della curva standard" Aggiornamento dei paragrafi: "Altri prodotti richiesti", "Materiali richiesti ma non inclusi nel prodotto", "8.1: Campioni", "Simboli" e "Avviso per l'acquirente" Nuova impostazione grafica e del contenuto delle Istruzioni per l'uso (IFU).	31/10/25
06	Aggiornamento delle CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI: Valori LoD, LLoD e ULoD confermati sulla matrice; ripetibilità e riproducibilità calcolate sulla matrice; valore di cut-off interno modificato da 36 a 35.	23/01/24
05	Aggiornamento del paragrafo CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI per la definizione del valore limite Ct dell'HHV7 pari a 35 per la matrice del sangue intero.	24/02/22
04	Utilizzando lo strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR è ora necessario impostare manualmente la soglia per il rilevatore FAM "HHV7" su 0,2.	05/10/17
00 — 03	Sviluppo di nuovi prodotti e modifiche correlate	-

**NOTA**

La revisione delle presenti istruzioni per l'uso è compatibile anche con la versione precedente del kit.

---

## INDICE

---

<b>1 USO PREVISTO</b> .....	<b>4</b>
<b>2 PRINCIPIO DEL SAGGIO</b> .....	<b>4</b>
<b>3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO</b> .....	<b>4</b>
<b>4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO</b> .....	<b>5</b>
<b>5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO</b> .....	<b>5</b>
<b>6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI</b> .....	<b>5</b>
<b>7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI</b> .....	<b>6</b>
<b>8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius</b> .....	<b>8</b>
<b>9 PROCEDURA ELITe InGenius</b> .....	<b>10</b>
<b>10 PROCEDURA ELITe BeGenius</b> .....	<b>17</b>
<b>11 CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius</b> .....	<b>22</b>
<b>12 CAMPIONI E CONTROLLI PER ALTRI SISTEMI</b> .....	<b>28</b>
<b>13 ALTRE PROCEDURE DI SISTEMA</b> .....	<b>30</b>
<b>14 CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE CON ALTRI SISTEMI</b> .....	<b>39</b>
<b>15 BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>42</b>
<b>16 LIMITI DELLA PROCEDURA</b> .....	<b>42</b>
<b>17 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI</b> .....	<b>43</b>
<b>18 LEGENDA DEI SIMBOLI</b> .....	<b>47</b>
<b>19 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA</b> .....	<b>48</b>
<b>Appendix A QUICK START GUIDE</b> .....	<b>49</b>

## 1 USO PREVISTO

Il prodotto **HHV7 ELITE MGB® Kit** è un saggio qualitativo e quantitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la **rilevazione e quantificazione del DNA del virus erpetico umano 7 (HHV7)**, in campioni di DNA estratto da sangue intero raccolto in EDTA e plasma raccolto in EDTA, e da liquido cerebrospinale (CSF).

Il saggio è stato validato in associazione con gli strumenti **ELITE InGenius®** ed **ELITE BeGenius®**, sistemi integrati e automatizzati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati a partire da campioni di sangue intero e plasma raccolto in EDTA.

Il saggio è validato in associazione con gli strumenti **7300 Real-Time PCR System** e **7500 Real-Time PCR System**, utilizzando campioni umani di sangue intero, plasma raccolto in EDTA, e liquido cerebrospinale.

Il prodotto è destinato all'uso nella diagnosi e nel monitoraggio delle infezioni da HHV7, unitamente ai dati clinici del paziente e ad altri esiti di test di laboratorio.

## 2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è un test di Real-Time PCR quantitativo per la rilevazione del DNA dell'HHV7 isolato da campioni e amplificato utilizzando il reagente **HHV7 Q PCR Mix**, che contiene i primer e le sonde con tecnologia ELITE MGB e TaqMan™ MGB®.

Le sonde ELITE MGB e TaqMan MGB sono attivate mediante ibridazione con i prodotti specifici della PCR. **ELITE InGenius** ELITE InGenius ed **ELITE BeGenius** monitorano l'incremento di fluorescenza emessa e calcolano i "cicli soglia" (Ct) e le temperature di melting (Tm). La quantità di DNA dell'HHV7 è calcolata sulla base di una curva di calibrazione memorizzata.

Nelle sonde ELITE MGB i fluorofori non emettono segnale quando la sonda non ibrida con il prodotto di reazione specifico. Quando la sonda ibrida con il prodotto specifico di amplificazione, il quencher viene separato dal fluoroforo ed emette il segnale di fluorescenza.

Da notare che la sonda non viene idrolizzata durante la PCR e può essere utilizzata per l'analisi di dissociazione e il calcolo della temperatura di melting.

## 3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **HHV7 ELITE MGB Kit** fornisce il reagente **HHV7 Q - PCR Mix**, una miscela per PCR ottimizzata e stabilizzata che contiene primer e sonde specifici per:

- una regione del **gene U57 codificante una proteina capsidica** di HHV7, rilevata nel canale **HHV7**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher® e marcata con il fluoroforo FAM.
- l'Internal Control (IC), specifico per la sequenza artificiale IC2, rilevata nel Canale **IC**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 525 (AP525).

Il componente **HHV7 Q - PCR Mix** contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, 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, e la DNA polimerasi ad attivazione termica ("hot start").

Il prodotto **HHV7 ELITE MGB Kit** contiene reagenti sufficienti per **96 test** su **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius**, utilizzando **20 µL** per reazione.

Il prodotto **HHV7 ELITE MGB Kit** contiene reagenti sufficienti per **100 test su altri sistemi**, utilizzando **20 µL per reazione**.

Il prodotto **HHV7 ELITE MGB Kit** può essere utilizzato anche in associazione con altri strumenti equivalenti.

## 4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Tabella 1

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
HHV7 Q - PCR Mix cod. RTS037PLD	Miscela di reagenti per Real-Time PCR in provetta con tappo NEUTRO	4 x 540 µL	-

## 5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

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

## 6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

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

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

Tabella 2

Strumenti e software	Prodotti e reagenti
<p><b>ELITE InGenius</b> (ELITechGroup S.p.A., EG SpA cod. INT030)</p> <p><b>ELITE InGenius Software</b> versione 1.3.0.19 (o successiva)</p> <p><b>HHV7 ELITE_PC</b>, Assay Protocol con parametri per l'analisi del Positive Control</p> <p><b>HHV7 ELITE_NC</b>, Assay Protocol con parametri per l'analisi del Negative Control</p> <p><b>HHV7 ELITE_STD</b>, Assay Protocol con parametri per l'analisi dei calibratori</p> <p><b>HHV7 ELITE_WB_200_100</b>, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di sangue intero</p> <p><b>HHV7 ELITE_PL_200_100</b>, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di plasma</p>	<p><b>HHV7 ELITE Standard</b> (EG SpA, cod. STD037PLD)</p> <p><b>HHV7 ELITE — ELITE Positive Control</b> (EG SpA, cod. CTR037PLD)</p> <p><b>CPE – Internal Control</b> (EG SpA, cod. CTCRCPE)</p> <p><b>ELITE InGenius SP200</b> (EG SpA, cod. INT032SP200)</p> <p><b>ELITE InGenius ed ELITE BeGenius Consumable Set</b> (vedere ELITE InGenius ed ELITE BeGenius Istruzioni per l'uso)</p>
<p><b>ELITE BeGenius</b> (EG SpA cod. INT040)</p> <p><b>ELITE BeGenius Software</b> versione 2.3.0. (o successiva)</p> <p><b>HHV7 ELITE_Be_PC</b>, Assay Protocol con parametri per l'analisi del Positive Control</p> <p><b>HHV7 ELITE_Be_NC</b>, Assay Protocol con parametri per l'analisi del Negative Control</p> <p><b>HHV7 ELITE_Be_STD</b>, Assay Protocol con parametri per l'analisi dei calibratori</p> <p><b>HHV7 ELITE_Be_WB_200_100</b>, Assay Protocol con parametri per l'analisi dei campioni di sangue intero</p> <p><b>HHV7 ELITE_Be_PL_200_100</b>, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di plasma</p>	<p><b>HHV7 ELITE Standard</b> (EG SpA, cod. STD037PLD)</p> <p><b>HHV7 ELITE — ELITE Positive Control</b> (EG SpA, cod. CTR037PLD)</p> <p><b>CPE – Internal Control</b> (EG SpA, cod. CTCRCPE)</p> <p><b>MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate</b> (LifeTechnologies, cod. N8010560)</p> <p><b>QIASymphony® Midi kit</b> (QIAGEN GmbH, cod. 931236)</p> <p><b>NucliSENS® easyMAG® Reagents</b> (bioMérieux SA, cod. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)</p>
<p>7300 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, cod. 4351101)</p> <p><b>QIASymphony® SP/AS</b> (QIAGEN GmbH, cod. 9001297, 9001301)</p> <p><b>NucliSENS® easyMAG®</b> (bioMérieux SA, cod. 200111)</p>	<p><b>HHV7 ELITE Standard</b> (EG SpA, cod. STD037PLD)</p> <p><b>HHV7 ELITE — ELITE Positive Control</b> (EG SpA, cod. CTR037PLD)</p> <p><b>CPE – Internal Control</b> (EG SpA, cod. CTCRCPE)</p> <p><b>MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL</b> (Life Technologies, cod. 4346906)</p> <p><b>QIASymphony Midi kit</b> (QIAGEN GmbH, cod. 931236)</p> <p><b>NucliSENS easyMAG Reagents</b> (bioMérieux SA, cod. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)</p>
<p>7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, cod. 4406985)</p> <p><b>QIASymphony SP/AS</b> (QIAGEN GmbH, cod. 9001297, 9001301)</p> <p><b>NucliSENS easyMAGe</b> (bioMérieux SA, cod. 200111)</p>	<p><b>HHV7 ELITE Standard</b> (EG SpA, cod. STD037PLD)</p> <p><b>HHV7 ELITE — ELITE Positive Control</b> (EG SpA, cod. CTR037PLD)</p> <p><b>CPE – Internal Control</b> (EG SpA, cod. CTCRCPE)</p> <p><b>MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL</b> (Life Technologies, cod. 4346906)</p> <p><b>QIASymphony Midi kit</b> (QIAGEN GmbH, cod. 931236)</p> <p><b>NucliSENS easyMAG Reagents</b> (bioMérieux SA, cod. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)</p>

## 7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Questo prodotto è riservato esclusivamente all'uso in vitro.

### 7.1 Avvertenze e precauzioni generali

Maneggiare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare schizzi o spruzzi. Le provette, i puntali e gli altri materiali che entrano in contatto con i campioni biologici devono essere trattati per almeno 30 minuti con ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o sterilizzati in autoclave per un'ora a 121 °C prima dello smaltimento.

Maneggiare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali utilizzati per eseguire il test come se fossero infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare schizzi o spruzzi. I rifiuti devono essere maneggiati e smaltiti in conformità ad adeguati standard di sicurezza. Il materiale combustibile monouso deve essere incenerito. I rifiuti liquidi contenenti acidi o basi devono essere neutralizzati prima dello smaltimento. Impedire che i reagenti di estrazione entrino in contatto con l'ipoclorito di sodio (candeggina).

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

Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.

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

Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.

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

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

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

Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.

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

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

## 7.2 Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

Quando la sessione di amplificazione viene allestita manualmente, è necessario disporre di aree separate per l'estrazione/preparazione delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione/rilevazione dei loro prodotti. Non introdurre mai un prodotto della reazione di amplificazione nell'area designata per l'estrazione/preparazione delle reazioni di amplificazione.

Quando la sessione di amplificazione viene allestita manualmente, è necessario disporre di camici, guanti e strumenti da laboratorio da usare esclusivamente per l'estrazione/preparazione delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione/rilevazione dei loro prodotti.

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

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

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

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

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

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

### 7.3 Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Tabella 3

Componente	Temperatura di conservazione	Uso dopo la prima apertura	Cicli di congelamento/scongelo	Stabilità sullo strumento (ELITe InGenius ed ELITe BeGenius)
HHV7 Q - PCR Mix	-20 °C o inferiore (al riparo dalla luce)	Un mese	Fino a cinque	Fino a cinque sessioni indipendenti* di tre ore ciascuna oppure fino a 7 ore consecutive (2 sessioni di 3 ore ciascuna e il tempo necessario per iniziare la terza sessione)

\* con congelamento intermedio.

## 8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

### 8.1 Campioni

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

Tabella 4

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto/conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2/+8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Sangue intero	EDTA	≤24 ore	≤72 ore	≤1 mese	> 1 mese
Plasma	EDTA	≤24 ore	≤72 ore	≤1 mese	> 1 mese

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

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

**Tabella 5 Assay Protocol HHV7 ELITE MGB Kit**

Campione	Strumento	Nome Assay Protocol	Referto	Caratteristiche
Sangue intero	ELITE InGenius	HHV7 ELITE_WB_200_100	Copie/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume di PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
	ELITE BeGenius	HHV7 ELITE_Be_WB_200_100	Copie/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume di PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
Plasma	ELITE InGenius	HHV7 ELITE_PL_200_100	Copie/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume di PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
	ELITE BeGenius	HHV7 ELITE_Be_PL_200_100	Copie/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume di PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL

Verificare se la provetta primaria e il volume del campione sono compatibili con ELITE InGenius o ELITE BeGenius, attenendosi alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione **ELITEInGeniusSP200** (EG SpA, cod. INT032SP200).

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

Se richiesto, trasferire 200 o 1000 µL di campione in un Extraction Tube (per ELITE InGenius) oppure trasferire 200 µL di campione in una provetta Sarstedt da 2 mL (per ELITE BeGenius).

### NOTA

Se si usa la provetta primaria, il volume del campione varia in funzione del tipo di provetta caricato. Consultare le istruzioni per l'uso del kit di estrazione per maggiori informazioni sulla preparazione e l'esecuzione della procedura di estrazione.

## NOTA

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

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

Per controllare i dati relativi alle sostanze interferenti, fare riferimento a "Sostanze potenzialmente interferenti" nella sezione Caratteristiche delle prestazioni.

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

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

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

## 8.2 Calibratori e controlli per PCR

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

- Per la curva di calibrazione, usare i quattro livelli del prodotto **HHV7 ELITE Standard** (non fornito con questo kit) con gli Assay Protocol **HHV7 ELITE STD** o **HHV7 ELITE Be STD**.
- Per il Positive Control, utilizzare il prodotto **HHV7 - ELITE Positive Control** (non fornito in questo kit) con gli Assay Protocols **HHV7 ELITE PC** o **HHV7 ELITE Be PC**,
- Per il Negative Control, utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita in questo kit) con gli Assay Protocols **HHV7 ELITE NC** or **HHV7 ELITE Be NC**.

## NOTA

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

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

I risultati dei controlli per PCR scadono dopo **15 giorni**; trascorso questo termine, è necessario rianalizzare il Positive Control e il Negative Control.

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

- si utilizza un nuovo lotto di reagenti;
- i risultati delle analisi di controllo della qualità (vedere paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche;
- gli strumenti **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius** sono stati sottoposti a un importante intervento di manutenzione o di assistenza.

## 8.3 Controlli di qualità

Si raccomanda di verificare la procedura di estrazione e PCR. È possibile utilizzare campioni archiviati o materiale di riferimento certificato. I controlli esterni devono essere utilizzati in conformità a quanto previsto dagli organismi di accreditamento locali, statali e federali, come applicabile.

## 9 PROCEDURA ELITE InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **HHV7 ELITE MGB Kit** con lo strumento **ELITE InGenius** si articola in due fasi:

**Tabella 6**

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

### 9.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

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

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

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

### 9.2 STEP 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **HHV7 ELITE MGB Kit** può essere utilizzato su **ELITE InGenius** per eseguire:

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

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

#### NOTA

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

Prima di impostare una sessione:

Scongelare le provette di **PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Agitare delicatamente, quindi centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.

**NOTA**

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

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

	<b>A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)</b>	<b>B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)</b>
<b>1</b>	<p><b>Identificare i campioni</b> e, ne necessario, scongelare a temperatura ambiente, agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere su ghiaccio o un blocco freddo. Se richiesto, trasferire 200 µL di campione in un Extraction tube precedentemente etichettato.</p> <p><b>Scongelare le provette contenenti CPE</b> necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerle su ghiaccio o un blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni.</p>	<p><b>Scongelare</b> a temperatura ambiente la <b>provetta di eluizione</b> contenente gli acidi nucleici estratti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo.</p>
<b>2</b>	Nella schermata "Home", selezionare " <b>Perform Run</b> ".	Nella schermata "Home", selezionare " <b>Perform Run</b> ".
<b>3</b>	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.
<b>4</b>	Per ogni campione, assegnare un "Track" e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un "Track" e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
<b>5</b>	Nella colonna "Assay" <b>selezionare l'Assay Protocol</b> da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare l' <b>Assay Protocol</b> da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").
<b>6</b>	Verificare che il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" (protocollo) selezionare "PCR Only".
<b>7</b>	Nella colonna "Sample Position" selezionare "Primary tube" o "Extraction tube" come posizione da cui caricare il campione. Verificare che " <b>Dilution factor</b> " sia " <b>1</b> ".	Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)". Verificare che " <b>Dilution factor</b> " sia " <b>1</b> ".
<b>8</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
<b>9</b>	<b>Caricare il CPE</b> e la <b>PCR Mix</b> nell'"Inventory Block" (area reagenti) facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto di CPE e PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.	<b>Caricare la PCR Mix</b> nell'"Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.
<b>10</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
<b>11</b>	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i rack dei puntali se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i rack dei puntali se necessario.
<b>12</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
<b>13</b>	<b>Caricare</b> la PCR Cassette, le cartucce per estrazione ELITe InGenius SP 200 e tutti i materiali di consumo richiesti e i campioni da estrarre.	<b>Caricare</b> la PCR Cassette e le provette di eluizione con i campioni estratti.
<b>14</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
<b>15</b>	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
<b>16</b>	Premere "Start".	Premere "Start".

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

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

### NOTA

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

### NOTA

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

**NOTA**

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

**NOTA**

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

**NOTA**

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

**NOTA**

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

**NOTA**

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

### 9.3 FASE 3 - Esame e approvazione dei risultati

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

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

**NOTA**

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

Lo strumento **ELITe InGenius** utilizza il prodotto **HHV7 ELITe MGB Kit** per generare risultati tramite la seguente procedura:

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

#### 9.3.1 Validazione della curva di calibrazione

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

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

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

**NOTA**

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

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

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

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

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

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

**NOTA**

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

**NOTA**

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

### 9.3.3 Validazione dei risultati dei campioni

Il programma con **ELITE InGenius software** interpreta i risultati della PCR per il target (canale **HHV7**) e per l'Internal Control (canale **IC**) con i parametri degli Assay Protocols **HHV7 ELITE\_WB\_200\_100** ed **HHV7 ELITE\_PL\_200\_100**. I valori Ct risultanti vengono convertiti in concentrazione.

I risultati sono mostrati sulla schermata "Results Display".

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

**Tabella 7**

<b>1) Curva di calibrazione</b>	<b>Stato</b>
HHV7 Q-PCR Standard	APPROVATO
<b>2) Positive Control</b>	<b>Stato</b>
HHV7 Positive Control	APPROVATO
<b>3) Negative Control</b>	<b>Stato</b>
HHV7 Negative Control	APPROVATO

I risultati del campione vengono interpretati automaticamente da **ELITe InGenius software** utilizzando i parametri degli Assay Protocols.

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

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

**Tabella 8**

<b>Risultato di una sessione sul campione</b>	<b>Interpretazione</b>
HHV7:DNA Detected, quantity equal to "XXX" copies/mL (HHV7:DNA Rilevato, quantità pari a "XXX" copie/mL).	<b>Il DNA dell'HHV7 è stato rilevato</b> nel campione entro l'intervallo di misurazione del saggio, alla concentrazione indicata.
HHV7:DNA Detected, quantity below "LLoQ" copies/mL (HHV7:DNA Rilevato, quantità minore di "LLoQ" copie/mL).	<b>Il DNA dell'HHV7 è stato rilevato</b> nel campione, la sua concentrazione è al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) del saggio.
HHV7:DNA Detected, quantity beyond "ULoQ" copies/mL (HHV7:DNA Rilevato, quantità maggiore di "ULoQ" copie/mL).	<b>Il DNA dell'HHV7 è stato rilevato</b> nel campione, la sua concentrazione è al di sopra del limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio.
HHV7:DNA Not detected or below the "LoD" copies/mL (HHV7:DNA non Rilevato o minore di "LoD" copie/mL).	<b>Il DNA dell'HHV7 non è stato rilevato</b> nel campione. Il campione è negativo per il DNA target <b>oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevabilità (LoD) del saggio.</b>
Invalid-Retest Sample (Invalido - Ripetere il campione)	<b>Risultato del saggio non valido</b> per un errore dell'Internal Control (dovuto ad es. a errata estrazione o effetto carryover degli inibitori). Il test deve essere ripetuto.

Campioni che hanno riportato il risultato "Invalid-Retest Sample" (Invalido - Ripetere il campione): in questo caso, il DNA dell'Internal Control non è stato rilevato in modo efficace, probabilmente per problemi nelle fasi di campionamento, estrazione o PCR (ad es. campionamento non corretto, degradazione o perdita di DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono generare risultati errati.

Se rimane un volume sufficiente di eluato, è possibile ripetere l'analisi dell'eluato (tal quale o diluito) eseguendo un ciclo di amplificazione in modalità "PCR Only". Se anche il secondo risultato non è valido, è necessario ripetere l'analisi del campione partendo dall'estrazione di un nuovo campione utilizzando la modalità "Extract + PCR" (vedere "[17 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 43](#)").

I campioni segnalati come "HHV7:DNA Not Detected or below "LoD" copies/mL" (HHV7:DNA non Rilevato o minore di "LoD" copie/mL) sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare l'HHV8. In questo caso, il campione può essere negativo per il DNA dell'HHV7 oppure il DNA dell'HHV7 è presente in una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedere "[11 CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius pagina 22](#)").

I campioni positivi per il DNA dell'HHV7 a una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità (e al limite di quantificazione inferiore) del saggio, se rilevati, sono identificati nel report come "HHV7:DNA Detected, quantity below "LLoQ" copies/mL (HHV7:DNA Rilevato, quantità minore di "LLoQ" copie/mL) (vedere "[11 CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius pagina 22](#)").

I campioni positivi al DNA dell'HHV7 che rientrano nell'intervallo di misurazione lineare (vedere "[11 CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius pagina 22](#)") vengono rilevati e riportati come "HHV7:DNA Detected, quantity equal to "XXX" copies/mL (HHV7:DNA Rilevato, quantità pari a "XXX" copie/mL).

I campioni positivi al DNA dell'HHV7 che superano il limite superiore di quantificazione vengono riportati come "HHV7:DNA Detected, quantity beyond "ULoQ" copies/mL" (HHV7:DNA Rilevato, quantità maggiore di "ULoQ" copie/mL) e non sono idonei per la quantificazione. Se necessario, il campione può essere diluito prima dell'estrazione o della PCR e analizzato nuovamente per ottenere risultati che rientrino nell'intervallo di misurazione lineare del saggio.

**NOTA**

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

I risultati dei campioni vengono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Results Display) da parte di utenti con privilegi di "Administrator" o 'Analyst', seguendo le istruzioni riportate sull'interfaccia grafica. Dalla finestra "Results Display" è possibile stampare e salvare i risultati dell'analisi dei campioni come "Sample Report" (Report campioni) e "Track Report" (Report tracciati).

**9.3.4 Refertazione dei risultati dei campioni**

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

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

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

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

**10 PROCEDURA ELITe BeGenius**

La procedura per l'uso del prodotto **HHV7 ELITe MGB Kit** con lo strumento **ELITe BeGenius** si articola in due fasi:

**Tabella 9**

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

**10.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto**

Prima di iniziare la sessione:

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

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

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

## 10.2 STEP 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **HHV7 ELITE MGB Kit** può essere utilizzato su **ELITE BeGenius** per eseguire:

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

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

### NOTA

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

Prima di impostare una sessione:

Scongelare le provette di **PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Agitare delicatamente, quindi centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.

### NOTA

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

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

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
1	<p><b>Identificare i campioni</b> e, se necessario, scongelare a temperatura ambiente, agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo. Se richiesto, trasferire 200 µL di campione in una provetta Sarstedt da 2 mL precedentemente etichettata.</p> <p><b>Scongelare le provette contenenti CPE</b> necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerle in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni.</p>	<p>Se necessario, <b>scongelare l'Elution Tube</b> che contiene gli acidi nucleici estratti a temperatura ambiente. Agitare delicatamente, quindi centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.</p>
2	Nella schermata "Home", selezionare " <b>Perform Run</b> ".	Nella schermata "Home", selezionare " <b>Perform Run</b> ".
3	Rimuovere tutti i Rack dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "run mode": "Extract + PCR".	Selezionare il "run mode": "PCR Only".
5	Caricare i campioni nel "Sample Rack". (Nota: quando si caricano provette secondarie "2 mL Tubes", utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack").	Caricare i campioni nell'"Elution Rack".

	<b>A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)</b>	<b>B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)</b>
6	Inserire il <b>"Sample Rack"</b> nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 5" (L5). Se necessario, inserire il "Sample ID" (SID) per ogni "Position" utilizzata. (Se si caricano provette secondarie, contrassegnare con "2 mL Tube". Se le provette secondarie non hanno codice a barre, digitare manualmente il "Sample ID").	Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" inserire il "Sample ID", la "Sample matrix", l'"Extraction kit" e l'"Extracted eluate vol." (volume eluato).
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Non applicabile
9	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli).	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli).
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.	Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.
12	Caricare le "Elution tubes" nell'"Elution Rack" (le provette di eluizione possono essere etichettate con il codice a barre per migliorarne la tracciabilità).	Non applicabile
13	Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura utilizzando la "Lane 2" (L2).	Non applicabile
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile
15	Caricare il CPE e la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".
16	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix e/o CPE, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).
17	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
18	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i rack se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i rack se necessario.
19	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
20	Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" nell'Inventory Area.	Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" nell'Inventory Area.
21	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
22	Caricare l'"Extraction Rack" con le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200" e i materiali di consumo per l'estrazione richiesti.	Non applicabile
23	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
24	Premere "Start".	Premere "Start".

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

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

**NOTA**

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

**NOTA**

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

**NOTA**

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

**NOTA**

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

**NOTA**

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

**NOTA**

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

**NOTA**

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

### 10.3 FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

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

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

**NOTA**

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

**ELITE BeGenius** utilizza il prodotto **HHV7 ELITE MGB Kit** per generare i risultati tramite la seguente procedura:

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

**NOTA**

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

## 11 CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius

### 11.1 Sensibilità analitica: limite del bianco con sangue intero

Data l'elevata prevalenza di HHV7 nella popolazione (circa l'80%) riportata nella letteratura (Michael Kidd et al.), quando si analizzano campioni di sangue intero è prevedibile riscontrare una certa percentuale di risultati bassi positivi clinicamente non significativi. Affinché il test risultasse negativo con tali campioni è stato necessario valutare un cut-off Ct dell'HHV7 pari a 35 su **ELITE InGenius ed ELITE BeGenius**.

I risultati ottenuti su ELITE InGenius sono sintetizzati nella tabella seguente.

**Tabella 10**

Limite del bianco di sangue intero raccolto in EDTA su ELITE InGenius			
Campioni	N	Positivi	Negativi
Sangue intero raccolto in EDTA e negativo per il DNA dell'HHV7	35	0	35

I risultati ottenuti su ELITE BeGenius sono sintetizzati nella tabella seguente.

**Tabella 11**

Limite del bianco di sangue intero raccolto in EDTA su ELITE BeGenius			
Campioni	N	Positivi	Negativi
Sangue intero raccolto in EDTA e negativo per il DNA dell'HHV7	20	0	20

Nel test Limit of Blank, il prodotto HHV7 ELITE MGB Kit ha rilevato correttamente tutti i campioni analizzati, come previsto, entro il valore di cut-off Ct impostato per il target.

### 11.2 Sensibilità analitica: Limite di rilevabilità (LoD)

Il limite di rilevabilità (LoD) dell'amplificazione del DNA consente di rilevare la presenza di circa 10 copie in 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

Il LoD di questo saggio è stato testato su ELITE InGenius utilizzando DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata mediante spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito a un titolo di 10 copie/10 µL in presenza di DNA plasmidico contenente l'Internal Control a un titolo di 20.000 copie/10 µL.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

**Tabella 12**

Campioni	N	Positivi	Negativi
10 copie di DNA plasmidico dell'HHV7 + 20.000 copie di Internal Control	18	18	0

Il valore teorico del LoD è stato verificato mediante analisi su ELITE InGenius ed ELITE BeGenius un pool di plasma in EDTA e sangue intero in EDTA inoculati con materiale di riferimento dell'HHV7 (ZeptoMetrix, cod. PINATHHV7-ST) alla concentrazione dichiarata.

I risultati ottenuti hanno confermato la concentrazione dichiarata per il target del prodotto HHV7 ELITe MGB Kit sia su ELITe InGenius che su ELITe BeGenius.

### 11.3 Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare del prodotto HHV7 ELITe MGB Kit è stato determinato con campioni di sangue intero e plasma su ELITe InGenius ed ELITe BeGenius.

#### Per il sangue intero:

L'intervallo di misurazione lineare è stato determinato utilizzando un pannello di diluizioni di plasmide contenente la sequenza target dell'HHV7 in campioni negativi di sangue intero raccolto in EDTA.

I risultati sono illustrati nella figura seguente.

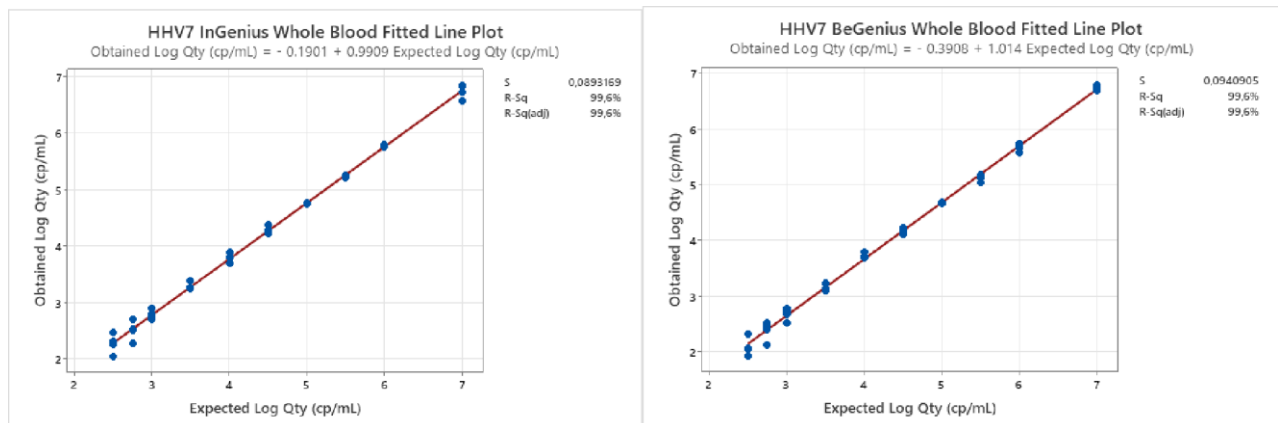


Fig. 1

L'intervallo di misurazione lineare in copie/mL per campioni di plasma raccolto in EDTA è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico riportato nella sezione seguente.

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

I risultati sono sintetizzati nelle figure sottostanti.

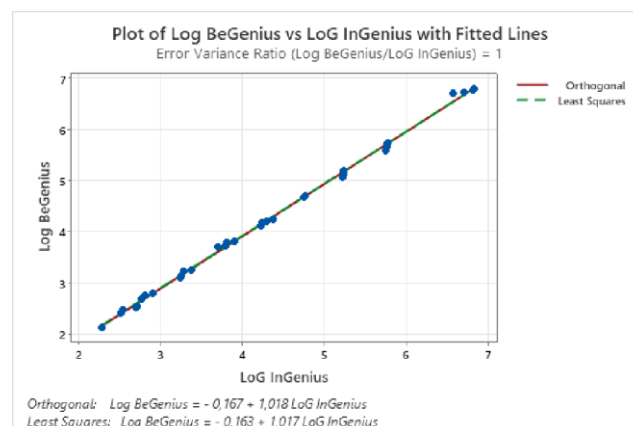


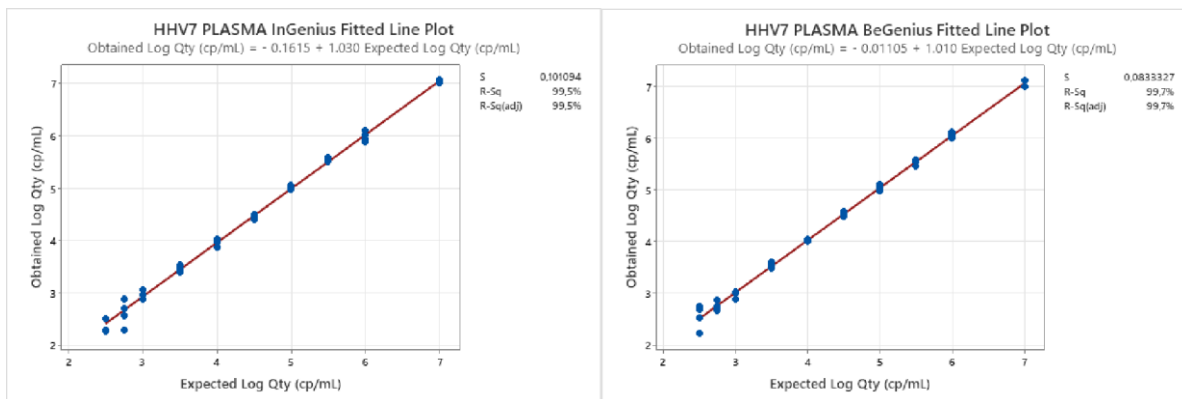
Fig. 2

L'analisi di regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a -0,167 (95% IC: -0,2256; -0,1075) e una pendenza pari a 1,018 (95% CI: 1,0048, 1,0307). L'analisi di regressione lineare ha generato un R2 pari a 0,999.

#### Per il plasma raccolto in EDTA:

L'intervallo di misurazione lineare è stato determinato utilizzando un pannello di diluizioni di plasmide contenente la sequenza target dell'HHV7 in campioni negativi di plasma in EDTA.

I risultati sono illustrati nella figura seguente.



I risultati ottenuti su ELITE InGenius ed ELITE BeGenius sono stati analizzati mediante regressione ortogonale e lineare al fine di calcolare la correlazione tra i metodi.

I risultati sono sintetizzati nelle figure sottostanti.

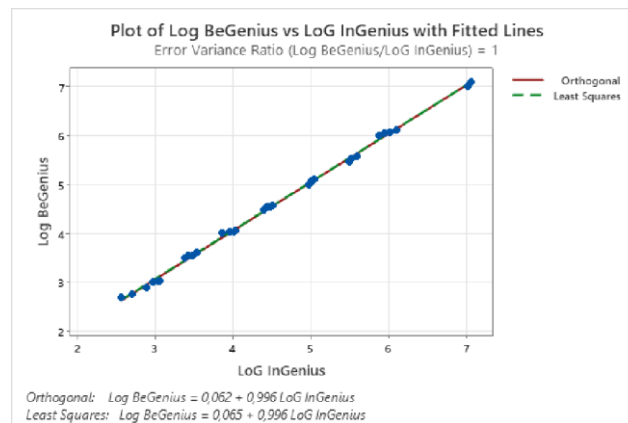


Fig. 3

L'analisi di regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a 0,062 (95% CI 0,0053, 0,1194) e una pendenza pari a 0,996 (95% CI: 0,9845, 1,0082). L'analisi di regressione lineare ha generato un R2 di 0,999.

L'intervallo di misurazione lineare per campioni di sangue intero e plasma raccolto in EDTA comprende l'intervallo di concentrazione riportato nella tabella seguente:

**Tabella 13**

Intervallo di misurazione lineare del prodotto HHV7 ELITE MGB Kit con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius		
Matrice	Limite inferiore	Limite superiore
Sangue intero	500 copie/mL	10.000.000 copie/mL
Plasma	500 copie/mL	10.000.000 copie/mL

#### 11.4 Incertezza della curva dello standard

Il valore di incertezza della curva dello Standard è stato calcolato combinando gli errori casuali (SD) delle quantificazioni di tutti i livelli e moltiplicando per il fattore di copertura  $k = 2$  (incertezza combinata estesa) ed è pari a 0,2181 Log copie/reazione.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

**Tabella 14 Incertezza della curva dello standard**

Livelli della curva standard	Teorico	SD	Incertezza combinata estesa
	Log c/rxn		
HHV7 Q - PCR Standard 10 <sup>5</sup>	5,0000	0,0711	0,2181
HHV7 Q - PCR Standard 10 <sup>5</sup>	4,0000	0,0372	
HHV7 Q - PCR Standard 10 <sup>5</sup>	3,0000	0,0261	
HHV7 Q - PCR Standard 10 <sup>5</sup>	2,0000	0,0691	

### 11.5 Ripetibilità

La ripetibilità del saggio è stata valutata su ELITe BeGenius ed ELITe InGenius mediante analisi di un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativo o inoculato con HHV7 (ZeptoMetrix, cod. PINATHHV7-ST).

La tabella seguente riporta un esempio dei risultati di ripetibilità intra-sessione (su un giorno) con ELITe InGenius.

**Tabella 15**

Ripetibilità intra-sessione su ELITe InGenius					
Campione	HHV7				%Concordanza
	Pos./Neg.	Media Ct	SD	% CV	
Negativi	0/8	NA	NA	NA	100%
3X LoD	8/8	32,97	0,38	1,14	100%
10X LoD	8/8	31,18	0,29	0,92	100%

La tabella seguente riporta un esempio dei risultati di ripetibilità intra-sessione (su un giorno) con ELITe BeGenius.

**Tabella 16**

Ripetibilità intra-sessione su ELITe BeGenius					
Campione	HHV7				%Concordanza
	Pos./Neg.	Media Ct	SD	% CV	
Negativi	0/8	NA	NA	NA	100%
3X LoD	8/8	34,52	0,30	0,88	100%
10X LoD	8/8	32,36	0,22	0,69	100%

La tabella seguente mostra i risultati di ripetibilità inter-sessione (su due giorni) su ELITe InGenius.

**Tabella 17**

Ripetibilità inter-sessione su ELITE InGenius					
Campione	HHV7				%Concordanza
	Pos./Neg.	Media Ct	SD	% CV	
Negativi	0/16	NA	NA	NA	100%
3X LoD	16/16	33,07	0,36	1,09	100%
10X LoD	16/16	31,17	0,24	0,77	100%

La tabella seguente mostra i risultati di ripetibilità inter-sessione (su due giorni) su ELITE BeGenius.

**Tabella 18**

Ripetibilità inter-sessione su ELITE BeGenius					
Campione	HHV7				%Concordanza
	Pos./Neg.	Media Ct	SD	% CV	
Negativi	0/16	NA	NA	NA	100%
3X LoD	16/16	34,41	0,49	1,42	100%
10X LoD	16/16	32,34	0,30	0,92	100%

Nel test di ripetibilità, il prodotto HHV7 ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori Ct target espressa come %CV pari a 1,42%.

## 11.6 Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata valutata su ELITE BeGenius ed ELITE InGenius mediante analisi di campioni di sangue intero negativi al DNA dell'HHV7, raccolto in EDTA negativo o inoculato con HHV7 (Zeptomatrix, cod. PINATHHV7-ST).

La tabella sottostante mostra i risultati della riproducibilità inter-lotto (su due lotti) ottenuti su ELITE InGenius.

**Tabella 19**

Riproducibilità inter-lotto con ELITE InGenius					
Campione	HHV7				%Concordanza
	Pos./Rep.	Media Ct	SD	%CV	
Negativi	0/8	-	-	-	100%
3 X LOD	8/8	33,39	0,20	0,59	100%
10 X LOD	8/8	31,39	0,18	0,57	100%

La tabella sottostante mostra i risultati della riproducibilità inter-lotto (su due lotti) ottenuti su ELITE BeGenius.

**Tabella 20**

Riproducibilità inter-lotto con ELITE BeGenius					
Campione	HHV7				%Concordanza
	Pos./Rep.	Media Ct	SD	%CV	
Negativi	0/8	-	-	-	100%
3 X LOD	8/8	34,58	0,14	0,42	100%
10 X LOD	8/8	32,66	0,24	0,75	100%

La tabella seguente riporta i risultati della riproducibilità inter-strumento (su due giorni, due lotti e due strumenti) ottenuti su ELITE InGenius.

**Tabella 21**

Riproducibilità inter-strumento con ELITE InGenius					
Campione	HHV7				%Concordanza
	Pos./Rep.	Media Ct	SD	%CV	
Negativi	0/8	-	-	-	100%
3 X LOD	8/8	34,50	0,31	0,90	100%
10 X LOD	8/8	32,61	0,23	0,69	100%

La tabella seguente riporta i risultati della riproducibilità inter-strumento (su due giorni, due lotti e due strumenti) ottenuti su ELITE BeGenius.

**Tabella 22**

Riproducibilità inter-strumento con ELITE BeGenius					
Campione	HHV7				%Concordanza
	Pos./Rep.	Media Ct	SD	%CV	
Negativi	0/8	-	-	-	100%
3 X LOD	8/8	33,25	0,26	0,79	100%
10 X LOD	8/8	31,26	0,21	0,66	100%

Nel test di riproducibilità, il prodotto HHV7 ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori Ct target espressa come %CV pari a 0,90%.

### 11.7 Specificità Diagnostica: Conferma dei campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici negativi, è stata valutata in associazione con **ELITE InGenius** analizzando campioni clinici di sangue intero e plasma raccolto in EDTA.

Poiché **ELITE BeGenius** ha prestazioni analitiche equivalenti a **ELITE InGenius**, anche le prestazioni diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono considerate equivalenti. Pertanto la specificità diagnostica del saggio ottenuta in associazione con **ELITE InGenius** è applicabile anche a **ELITE BeGenius**.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

**Tabella 23**

Campioni	N	Positivi	Negativi	Specificità diagnostica in %
Campioni di sangue intero raccolto in EDTA	38	0	38	100%
Campioni di plasma raccolto in EDTA	33	0	33	100%

Tutti i campioni di sangue intero e plasma erano validi per l'analisi. Il valore di cut-off Ct per il target dell'HHV7 è stato applicato solo ai campioni di sangue intero.

La specificità diagnostica del prodotto HHV7 ELITE MGB Kit in associazione a sangue intero e plasma raccolto in EDTA è risultata pari al 100%.

Il valore di cut-off IC Ct è impostato a 35 per i campioni di sangue intero e per i campioni di plasma raccolto in EDTA sia per InGenius che per BeGenius.

### 11.8 Sensibilità Diagnostica: Conferma dei campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici positivi, è stata valutata in associazione con **ELITE InGenius** analizzando campioni clinici di sangue intero e plasma raccolto in EDTA.

Poiché **ELITE BeGenius** ha prestazioni analitiche equivalenti a **ELITE InGenius**, anche le prestazioni diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono considerate equivalenti. Pertanto la sensibilità diagnostica del saggio ottenuta in associazione con **ELITE InGenius** è applicabile anche a **ELITE BeGenius**.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando campioni di sangue intero e plasma negativo all'HHV7 raccolto in EDTA e inoculato con "Human Herpes Virus Type 7 Stock –(NATHHV7-ST)" (ZeptoMetrix Corporation) a 1000 copie/mL.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

**Tabella 24**

Campioni	N	Positivi	Negativi	Sensibilità diagnostica in %
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA dell'HHV7	34	34	0	100%
Plasma raccolto in EDTA positivizzato per il DNA dell'HHV7	33	33	0	100%

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente come positivi.

La sensibilità diagnostica del prodotto HHV7 ELITE MGB Kit in associazione a sangue intero e plasma raccolto in EDTA è risultata pari al 100%.

### NOTA

I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche prestazionali del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico del prodotto "HHV7 ELITE MGB Kit", FTP037PLD.

## 12 CAMPIONI E CONTROLLI PER ALTRI SISTEMI

### 12.1 Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con **DNA estratto** dai seguenti campioni clinici: sangue intero raccolto in EDTA e liquido cerebrospinale (CSF).

## 12.2 Sangue intero raccolto in EDTA

I campioni di sangue intero per l'estrazione del DNA devono essere raccolti in EDTA e identificati secondo le linee guida del laboratorio, trasportati e conservati a temperatura ambiente (+16/+26 °C) per un massimo di 24 ore, 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 periodi più lunghi.

Si consiglia di ripartire i campioni da congelare in aliquote per evitare di ripetere più cicli di congelamento e scongelamento.

### NOTA

Quando si esegue l'estrazione del DNA dal sangue intero con lo strumento **NucliSENS® easyMAG®**, seguire il protocollo di estrazione **Generic 2.0.1** e attenersi alle seguenti istruzioni: trasferire **100 µL** di campione nella striscia a 8 pozzetti, caricare la striscia sullo strumento ed eseguire l'estrazione senza incubazione di lisi. Dopo che lo strumento ha aggiunto il tampone di lisi **NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer**, senza rimuovere la striscia, mescolare tre volte il contenuto della striscia con la pipetta multicanale in dotazione utilizzando il programma numero 3. Incubare per 10 minuti, quindi aggiungere **5 µL** di **CPE** per l'Internal Control e **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** al contenuto della striscia utilizzando la pipetta multicanale con il programma numero 3 e procedere con l'estrazione. Eluire gli acidi nucleici in **50 µL** di tampone di eluizione.

### NOTA

Quando si esegue l'estrazione del DNA dal sangue intero con lo strumento **QIAasymphony® SP/AS** e il prodotto **QIAasymphony® DNA Mini kit** con **software versione 3.5**, utilizzare il protocollo di estrazione **Virus Blood\_200\_V4\_default IC** e seguire queste indicazioni: lo strumento è in grado di utilizzare una provetta primaria, il volume di campione richiesto per l'estrazione è di **200 µL**, è sempre necessario un volume morto minimo di 100 µL. Per ciascun campione richiesto, aggiungere al buffer ATE **5 µL** di **CPE**. Caricare sullo strumento, nello slot "Internal Control", le provette contenenti la soluzione, come indicato nel manuale d'uso del kit; indicare la posizione in cui verranno erogati gli eluati e specificare il volume di eluizione di **60 µL**. Per i dettagli sulla procedura di estrazione, seguire le indicazioni riportate nel manuale d'uso del kit.

## 12.3 Liquido cerebrospinale

I campioni di liquido cerebrospinale per l'estrazione dell'acido nucleico devono essere raccolti secondo le linee guida del laboratorio evitando la contaminazione da 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 periodi più lunghi.

Si consiglia di ripartire i campioni da congelare in aliquote per evitare di ripetere più cicli di congelamento e scongelamento.

### NOTA

Quando si esegue l'estrazione del DNA dal liquido cerebrospinale con lo strumento **NucliSENS® easyMAG®**, seguire il protocollo di estrazione **Generic 2.0.1** e attenersi alle seguenti istruzioni: trasferire **500 µL** di campione nella striscia a 8 pozzetti ed eseguire l'estrazione. Dopo 10 minuti di incubazione, aggiungere **5 µL** di **CPE** per l'Internal Control prima di aggiungere **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** e procedere con l'estrazione. Eluire gli acidi nucleici in **100 µL** di tampone di eluizione.

## 12.4 Sostanze interferenti

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

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

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

## 12.5 Controlli di amplificazione

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

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

Per il Positive Control, utilizzare il prodotto **HHV7 - ELITe Positive Control** o il prodotto **HHV7 ELITe Standard**.

## 12.6 Controlli di qualità

Si raccomanda di validare l'intera procedura di analisi di ciascuna sessione di estrazione e amplificazione utilizzando un campione testato negativo e uno testato positivo o un materiale di riferimento calibrato.

# 13 ALTRE PROCEDURE DI SISTEMA

## 13.1 Preparazione di una sessione di amplificazione real time

(da effettuare nell'area destinata ai prodotti della reazione di amplificazione/rilevazione dell'amplificazione)

Quando si utilizza lo strumento **7300 Real-Time PCR System**.

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

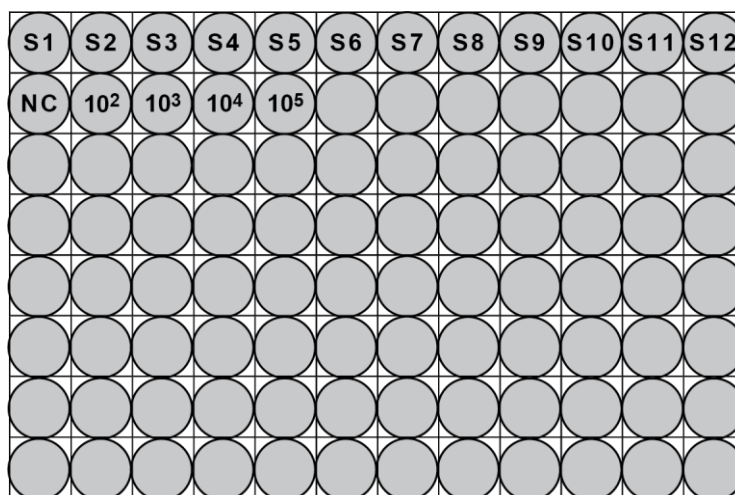
- accendere il termociclatore in tempo reale, accendere il computer, avviare il software dedicato e aprire una sessione di “quantificazione assoluta”;
- impostare (Detector Manager) il “detector” (rilevatore) per la sonda dell’HHV7 con “reporter” = “FAM” e “quencher” = ‘none’ (non fluorescente) e denominarlo “HHV7”;
- impostare (Detector Manager) il “rilevatore” per la sonda dell’Internal Control con il “reporter” = “VIC” (AP525 è analogo a VIC) e il “quencher” = ‘none’ (non fluorescente) e chiamarlo “IC”;
- Per ciascun pozzetto in uso nella micropiastra, impostare (Well Inspector) il “rilevatore” (tipo di fluorescenza da misurare), il “riferimento passivo” = “ROX” (AP593 viene utilizzato al posto di ROX, normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campione, controllo di amplificazione negativo, controllo di amplificazione positivo o standard di quantità nota). Aggiungere queste informazioni alla **Scheda di lavoro**.

allegato alla fine del presente manuale oppure stampare la configurazione della micropiastra. È necessario seguire attentamente la **Scheda di lavoro** durante il trasferimento della miscela di reazione e dei campioni nei pozzetti.

### NOTA

Per determinare il titolo del DNA nel campione iniziale, impostare una serie di reazioni con il componente **Q - PCR Standards** ( $10^5$  copie,  $10^4$  copie,  $10^3$  copie,  $10^2$  copie) per ottenere la **curva standard**.

Di seguito è riportato un esempio di come organizzare l'analisi quantitativa di 12 campioni.



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

**10<sup>2</sup>:** 10<sup>2</sup> copie standard; **10<sup>3</sup>:** 10<sup>3</sup> copie standard; **10<sup>4</sup>:** 10<sup>4</sup> copie standard; **10<sup>5</sup>:** 10<sup>5</sup> copie standard.

Con l'ausilio della documentazione fornita con lo strumento, impostare sul software specifico (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:

- aggiungere alla fase di amplificazione il passaggio (Add Step) di **estensione a 72 °C**;

#### NOTA

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

- modificare il timing come indicato nella tabella **“Thermal cycle”**;

- impostare il numero di cicli su **45**;

- impostare il volume per l'emulazione software del trasferimento termico alla reazione (“Sample volume”) su **30 µL**;

- opzionale: aggiungere la fase di dissociazione (Add Dissociation Stage) e impostare la temperatura da **40 °C** a **80 °C**.

**Tabella 25**

Ciclo termico		
Fase	Temperature	Durata
Decontaminazione	50 °C	2 min.
Denaturazione iniziale	94 °C	2 min.

**Tabella 26**

Amplificazione e rivelazione (45 cicli)	94 °C	10 sec.
	60 °C (acquisizione della fluorescenza)	30 sec.
	72 °C	20 sec.

**Tabella 27**

Dissociazione (facoltativa)	95 °C	15 sec.
	40 °C	30 sec.
	80 °C	15 sec.

Quando si utilizza **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**.

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

- Accendere il termociclatore in tempo reale, accendere il computer, avviare il software dedicato e aprire una sessione di “quantificazione assoluta” e impostare la modalità “Run mode: Fast 7500”.
- Impostare (Detector Manager) il “rilevatore” per la sonda dell’HHV7 con “reporter” = “FAM” e “quencher” = ‘none’ (non fluorescente) e chiamarlo “HHV7”.
- Impostare (Detector Manager) il “rilevatore” per la sonda dell’Internal Control con il “reporter” = “VIC” (AP525 è simile a VIC) e il “quencher” = ‘none’ (non fluorescente) e chiamarlo “IC”;
- Per ciascun pozzetto in uso nella micropiastre, impostare (Well Inspector) il “rilevatore” (tipo di fluorescenza da misurare), il “riferimento passivo” = “Cy5” (AP593 viene utilizzato al posto di Cy5, normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campione, controllo di amplificazione negativo, controllo di amplificazione positivo o standard di quantità nota). Aggiungere queste informazioni alla **Scheda di lavoro** allegata alla fine del presente manuale oppure stampare l’impostazione della micropiastre. Attenersi rigorosamente alla **Scheda di lavoro** durante il trasferimento della miscela di reazione e dei campioni nei pozzetti.

#### NOTA

Per determinare il titolo del DNA nel campione iniziale, impostare una serie di reazioni con il componente **Q - PCR Standards** (10<sup>5</sup> copie, 10<sup>4</sup> copie, 10<sup>3</sup> copie, 10<sup>2</sup> copie) per ottenere la **curva standard**.

L'impostazione dell'analisi quantitativa di 12 campioni è illustrata, a titolo esemplificativo, nel paragrafo precedente che descrive la procedura per lo strumento **7300 Real Time PCR System**.

Con l'ausilio della documentazione fornita con lo strumento, impostare sul software specifico (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:

- Aggiungere alla fase di amplificazione il passaggio (Add Step) di **estensione a 72 °C**;
- 

#### NOTA

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

- Modificare il timing come indicato nella tabella “**Thermal cycle**”.
- Impostare il numero di cicli su **45**.
- Impostare il volume per l'emulazione software del trasferimento termico alla reazione (“Sample volume”) su **30 µL**.
- Opzionale: aggiungere la fase di dissociazione (Add Dissociation Stage) e impostare la temperatura da **40 °C** a **80 °C**.

**Tabella 28**

Ciclo termico		
Fase	Temperature	Durata
Decontaminazione	50 °C	2 min.
Denaturazione iniziale	94 °C	2 min.

**Tabella 29**

Amplificazione e rivelazione (45 cicli)	94 °C	10 sec.
	60 °C (acquisizione della fluorescenza)	30 sec.
	72 °C	20 sec.

**Tabella 30**

Dissociazione (facoltativa)	95 °C	15 sec.
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 sec.
	60 °C	15 sec.

### 13.2 Allestimento della reazione di amplificazione

(da effettuare nell'area in cui si esegue l'estrazione/preparazione della reazione di amplificazione)

Prima di iniziare la sessione, è necessario:

- prelevare e scongelare le provette contenenti i campioni da analizzare. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per isolarne il contenuto e collocarle su ghiaccio,
  - Prendere e scongelare le provette di **HHV7 Q - PCR Mix** necessarie per la sessione, ricordando che ogni provetta è sufficiente per preparare **25 reazioni**. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per isolarne il contenuto e mantenerle in ghiaccio;
  - Prelevare e scongelare le provette di **HHV7 - Positive Control** o di **HHV7 Q - PCR Standard**. Agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio;
  - prendere la **micropiastra di amplificazione** che verrà utilizzata durante la sessione, avendo cura di maneggiarla con guanti senza polvere e di non danneggiare i pozzetti.
  - prendere la **pellicola sigillante per amplificazione** che verrà utilizzata durante la sessione, avendo cura di maneggiarla con guanti senza polvere e di non danneggiarla.
1. Pipettare accuratamente **20 µL** di **HHV7 Q - PCR Mix** sul fondo dei pozzetti della **micropiastra di amplificazione**, come precedentemente stabilito nella **Scheda di lavoro**. Attenzione a non formare bolle d'aria.

#### NOTA

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

2. Pipettare accuratamente, inserendo nella miscela di reazione, **10 µL di DNA estratto** dal primo campione nel pozzetto corrispondente della **micropiastra di amplificazione**, come precedentemente stabilito nella **Scheda di lavoro**. Mescolare bene il campione pipettando tre volte il **DNA estratto** nella miscela di reazione. Attenzione a non formare bolle d'aria. Procedere allo stesso modo con gli altri campioni di **DNA estratto**.
3. Pipettare accuratamente 10 µL di acqua per biologia molecolare nella miscela di reazione. non fornito con questo prodotto) nel pozzetto della micropiastra di amplificazione del Negative Control dell'amplificazione, come precedentemente stabilito nella Scheda di lavoro. Mescolare bene il Negative Control pipettando tre volte l'acqua per biologia molecolare nella miscela di reazione. Attenzione a non formare bolle d'aria.
4. In base al risultato richiesto (qualitativo o quantitativo), è necessario seguire una delle due opzioni seguenti:
  - Quando è richiesto un risultato **qualitativo** (rilevazione del DNA dell'HHV7): pipettare accuratamente, inserendo nella miscela di reazione, **10 µL di HHV7 - Positive Control** nel pozzetto corrispondente della **micropiastra di amplificazione**, come precedentemente stabilito nella **Scheda di lavoro**. Mescolare bene il Positive Control pipettando tre volte un volume di 10 µL nella miscela di reazione. Attenzione a non formare bolle d'aria.
  - Quando è richiesto un risultato **quantitativo** (quantificazione del DNA dell'HHV7): pipettare accuratamente, inserendo nella miscela di reazione, **10 µL di HHV7 Q - PCR Standard 102** nel pozzetto

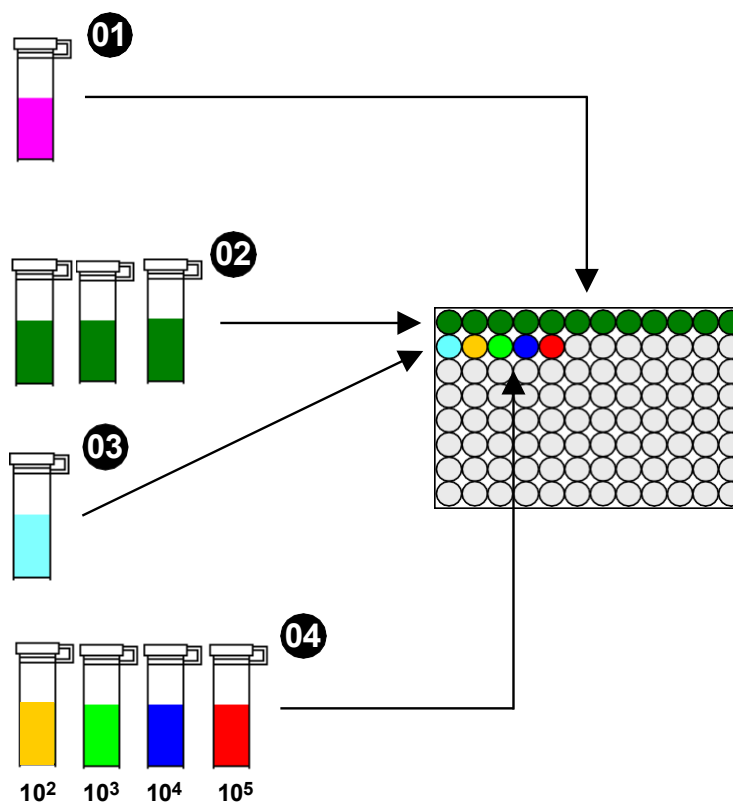
corrispondente della micropiastra di amplificazione, come precedentemente stabilito nella **Scheda di lavoro**. Mescolare bene lo standard pipettando tre volte il volume di 10 µL nella miscela di reazione. Attenzione a non formare bolle d'aria. Procedere nello stesso modo con i componenti **HHV7 Q - PCR Standards 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>**.

5. Coprire accuratamente la **micropiastra per amplificazione** con l'apposita **pellicola sigillante per amplificazione**.
6. Trasferire la **micropiastra di amplificazione** nel termociclatore in tempo reale nell'area di amplificazione/ rilevazione dei prodotti di amplificazione e avviare il ciclo termico per l'amplificazione salvando le impostazioni della sessione con un nome file univoco e riconoscibile (ad esempio "anno-mese-giorno-HHV7-ELITECHGROUP").

### NOTA

Al termine del ciclo termico, la **micropiastra di amplificazione** con i prodotti di reazione deve essere rimossa dallo strumento ed eliminata senza produrre contaminazioni ambientali. Per evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione, **non rimuovere la pellicola sigillante per amplificazione dalla micropiastra di amplificazione**.

La figura seguente mostra in modo sintetico la preparazione della reazione di amplificazione.



1. **Aggiungere 20 µL di Q-PCR Mix**
2. **Aggiungere 10 µL di DNA estratto**
3. **Aggiungere 10 µL di Negative Control**
4. **Aggiungere 10 µL di Positive Control o di Q-PCR Standard**

### NOTA

Se la preparazione dell'amplificazione viene eseguita con lo strumento **QIASymphony® SP/AS**, inserire la micropiastra contenente gli estratti, i reagenti e la micropiastra di amplificazione negli slot dedicati, utilizzando gli appositi adattatori, quindi seguire le indicazioni riportate nel manuale di istruzioni del modulo di configurazione e le fasi richieste dal software.

### 13.3 Analisi qualitativa dei risultati

I valori registrati della fluorescenza emessa dalla sonda specifica dell'HHV7 (rilevatore FAM "HHV7") e dalla sonda specifica dell'Internal Control (rilevatore VIC "IC") nelle reazioni di amplificazione devono essere analizzati mediante il software dello strumento.

Prima di iniziare l'analisi, facendo riferimento alla documentazione dello strumento, è necessario:

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

#### NOTA

Nel caso di un campione positivo con un titolo elevato di DNA dell'HHV7, la fluorescenza FAM della sonda specifica per l'HHV7 può iniziare ad aumentare prima del ciclo 15. In questo caso, l'intervallo di calcolo per la **Baseline** deve essere adattato dal ciclo 6 al ciclo in cui la fluorescenza FAM del campione inizia ad aumentare, come rilevato dal software dello strumento (Results > Component).

Quando si utilizza uno strumento **7300 Real-Time PCR System**.

- impostare manualmente la soglia, **Threshold**, per il rilevatore FAM "HHV7" su **0.1**;
- impostare manualmente la soglia, **Threshold**, per il rilevatore VIC "IC" su **0.05**;

Quando si usa lo strumento **7500 Fast Dx Real-Time PCR**:

- impostare manualmente la soglia, **Threshold**, per il rilevatore FAM "HHV7" su **0.2**;
- impostare manualmente la soglia, **Threshold**, per il rilevatore VIC "IC" su **0.1**;

I valori della fluorescenza emessi dalle sonde specifiche durante la reazione di amplificazione e il valore soglia, **Threshold**, della fluorescenza consentono di determinare il **Threshold cycle (Ct)**, ossia il ciclo in cui la fluorescenza ha raggiunto il valore **soglia**.

Nella reazione di amplificazione del **Positive Control** \* viene utilizzato il valore **Ct** dell'HHV7 (Results > Report) per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

**Tabella 31**

Rilevatore della reazione del Positive Control FAM "HHV7"	Risultato del saggio	Amplificazione/rilevazione
Ct ≤25	POSITIVO	CORRETTO

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Positive Control** è **Ct > 25** o **Ct Indeterminato** per l'HHV7, il DNA target non è stato rilevato correttamente. Ciò significa che si sono verificati problemi durante la fase di amplificazione o rilevazione (errata dispensazione della miscela di reazione o del Positive Control, degradazione della miscela di reazione o del Positive Control, impostazione errata della posizione del Positive Control, impostazione errata del ciclo termico) che potrebbero portare a risultati errati. La sessione non è valida e deve essere ripetuta a partire dalla fase di amplificazione.

#### NOTA

Quando questo prodotto viene utilizzato per la quantificazione del DNA dell'HHV7, vengono impostate le reazioni del **Q - PCR Standard** invece della reazione del **Positive Control**. In questo caso, convalidare l'amplificazione e la rilevazione facendo riferimento alla reazione di amplificazione del **Q - PCR Standard 10<sup>5</sup> (Ct ≤ 25)**.

Nella reazione di amplificazione del **Negative Control** viene utilizzato il valore **Ct** dell'HHV7 (Results > Report) per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

**Tabella 32**

Rilevatore della reazione del Negative Control FAM "HHV7"	Risultato del saggio	Amplificazione/rilevazione
Ct indeterminato	NEGATIVO	CORRETTO

Se il risultato della reazione di amplificazione per il **Negative Control** è diverso da **Ct indeterminato (Undertermined)** per l'HHV7, il DNA target è stato rilevato. Questo significa tuttavia che in fase di amplificazione ci sono stati dei problemi (contaminazione), che potrebbero portare a risultati sbagliati e falsi positivi. La sessione non è valida e va rifatta partendo dalla fase di amplificazione.

Nella reazione di amplificazione di ciascun **campione**, viene utilizzato il valore **Ct** dell'HHV7 per rilevare il DNA target, mentre viene utilizzato il valore **Ct** dell'Internal Control per convalidare l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione.

### NOTA

Verificare con il software dello strumento in (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) che il **Ct** sia stato determinato **mediante** un aumento rapido e regolare dei valori di fluorescenza e non da picchi o da un aumento del background (background irregolare o elevato).

Questo prodotto è in grado di rilevare una quantità minima di circa 10 copie di DNA per la regione di un gene della proteina del capsido (U57) dell'HHV7 nella reazione di amplificazione, corrispondente agli equivalenti genomici per reazione (limite di rilevabilità del prodotto, vedere il paragrafo [11 CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius pagina 22](#)).

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

**Tabella 33**

Reazione del campione		Idoneità del campione	Risultato del saggio	HHV7 DNA
Rilevatore FAM "HHV7"	Rilevatore VIC "IC"			
Ct indeterminato	Ct > 35 o Ct indeterminato	Non idoneo	Non valido	-
	Ct ≤ 35	Idoneo	Valido, negativo	NON RILEVATO
Ct determinato	Ct > 35 o Ct indeterminato	Idoneo	Valido, positivo	RILEVATO
	Ct ≤ 35	Idoneo	Valido, positivo	RILEVATO

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct indeterminato** per l'HHV7 e **Ct > 35 o Ct indeterminato** per l'Internal Control, significa che è stato impossibile rilevare in modo efficiente il DNA per l'Internal Control. In questo caso si sono verificati problemi durante la fase di amplificazione (amplificazione inefficiente o assente) o durante la fase di estrazione (degradazione del DNA di controllo interno, campione con numero di cellule troppo basso, perdita di DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nel DNA estratto) che possono portare a risultati errati e falsi negativi. Il campione non è idoneo, il test non è valido e deve essere ripetuto partendo dall'estrazione di un nuovo campione.

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct indeterminato** per l'HHV7 e **Ct ≤ 35** per l'Internal Control, significa che il DNA dell'HHV7 non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione; tuttavia, non si può escludere che il DNA dell'HHV7 abbia un titolo inferiore al limite di rilevabilità del prodotto (vedere [11 CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius pagina 22](#)). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

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

### NOTA

Quando nella reazione di amplificazione di un campione viene rilevato il DNA dell'HHV7, l'Internal Control potrebbe risultare come Ct > 35 o Ct indeterminato. Infatti, la reazione di amplificazione a bassa efficienza per l'Internal Control potrebbe essere sostituita per competizione da una reazione di amplificazione ad alta efficienza per il DNA dell'HHV7. In questo caso il campione è comunque idoneo e il risultato positivo del test è valido.

### 13.4 Analisi quantitativa dei risultati

Dopo aver eseguito la procedura per l'analisi qualitativa dei risultati, è possibile eseguire l'analisi quantitativa dei risultati dei campioni positivi.

I valori **Ct** dell'HHV7 nelle reazioni di amplificazione dei quattro **Q - PCR Standard**, vengono utilizzati per calcolare la **curva standard** (Results > Standard Curve) per la sessione di amplificazione, al fine di convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

**Tabella 34**

Rilevatore della curva standard FAM "HHV7"	Intervallo di accettabilità	Amplificazione/rilevazione
Coefficiente di correlazione (R2)	$0,990 \leq R2 \leq 1,000$	CORRETTO

Se il valore del **coefficiente di correlazione (R2)** non rientra nei limiti, significa che si sono verificati problemi durante la fase di amplificazione o di rilevazione (errata dispensazione 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 portare a risultati errati. La sessione non è valida e deve essere ripetuta a partire dalla fase di amplificazione.

I valori **Ct** nella reazione di amplificazione di ciascun **campione** e la **curva standard** della sessione di amplificazione vengono utilizzati per calcolare la **quantità** di DNA target presente nelle reazioni di amplificazione dei campioni.

Questo prodotto è in grado di quantificare da 1.000.000 a 10 copie di DNA per la regione di un gene della proteina del capsido (U57) dell'HHV7 nella reazione di amplificazione, corrispondenti agli equivalenti genomici per reazione (intervallo di misurazione lineare, vedere il paragrafo Caratteristiche prestazionali), come descritto nella tabella seguente:

**Tabella 35**

Rilevatore del risultato del campione FAM "HHV7"	Equivalenti del genoma HHV7 per reazione
Quantità > $1 \times 10^6$	PIÙ DI 1.000.000
$1 \times 10^1 \leq$ Quantità $\leq 1 \times 10^6$	= Quantità
Quantità < $1 \times 10^1$	MENO DI 10

I risultati (**Quantità**) di ciascun **campione** (Results > Repor) vengono utilizzati per calcolare gli equivalenti genomici (**gEq**) dell'HHV7 presenti nel campione utilizzato nell'estrazione (**Nc**) secondo la seguente formula:

**Tabella 36**

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = \frac{Ve \times \text{Quantità}}{Vc \times Va \times Ep}$$

Dove:

**Vc** è la quantità del campione utilizzato nell'estrazione in rapporto all'unità di misura richiesta;

**Ep** è l'efficienza della procedura, dell'estrazione e dell'amplificazione, **espressa in decimali**;

**Ve** è il volume totale del prodotto di estrazione, **espresso in µL**;

**Va** è il volume del prodotto di estrazione utilizzato nella reazione di amplificazione **espresso in µL**;

**Quantità** è il risultato della reazione di amplificazione del campione **espresso in gEq per reazione**.

Quando si utilizza il sistema di estrazione **NucliSENS® easyMAG®** con campioni di sangue intero raccolto in EDTA ed è necessario che il risultato sia espresso **in gEq/mL**, la formula diventa:

**Tabella 37**

<b>Formula semplificata per sangue intero e NucliSENS® easyMAG®</b>
<b><math>Nc \text{ (gEq/mL)} = 100 \times \text{Quantità}</math></b>

Quando si utilizza il sistema di estrazione **NucliSENS® easyMAG®** con campioni di liquido cerebrospinale ed è necessario che il risultato sia **in gEq/mL**, la formula diventa:

**Tabella 38**

<b>Formula semplificata per liquido cerebrospinale e NucliSENS® easyMAG®</b>
<b><math>Nc \text{ (gEq/mL)} = 20 \times \text{Quantità}</math></b>

Quando si utilizza il sistema di estrazione **QIASymphony® SP/AS** con campioni di sangue intero raccolto in EDTA ed è necessario che il risultato sia **espresso in gEq/mL**, la formula diventa:

**Tabella 39**

<b>Formula semplificata per sangue intero e QIASymphony® SP/AS</b>
<b><math>Nc \text{ (gEq/mL)} = 45 \times \text{Quantità}</math></b>

### 13.5 Calcolo dei limiti dell'intervallo di misurazione lineare

I limiti dell'intervallo di misurazione lineare in gEq/mL, quando si utilizza un particolare metodo di estrazione, possono essere calcolati dall'intervallo di misurazione lineare della reazione di amplificazione secondo la seguente formula:

**Tabella 40**

<b>Limite inferiore (gEq/mL) = <math>\frac{Ve \times 10 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep}</math></b>
---

**Tabella 41**

<b>Limite superiore (gEq/mL) = <math>\frac{Ve \times 1.000.000 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep}</math></b>
--

Quando si utilizza il sistema di estrazione **NucliSENS® easyMAG®** con campioni di sangue intero raccolto in EDTA, la formula diventa:

**Tabella 42**

<b>Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (gEq/mL) con NucliSENS® easyMAG®</b>
<b>Limite inferiore (gEq/mL) = <math>100 \times 10 \text{ gEq}</math> Limite superiore (gEq/mL) = <math>100 \times 1.000.000 \text{ gEq}</math></b>
<b>da 1000 a 100.000.000 gEq/mL</b>

Quando si utilizza il sistema di estrazione **NucliSENS® easyMAG®** con campioni di liquido cerebrospinale, la formula diventa:

**Tabella 43**

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (gEq/mL) con NucliSENS® easyMAG®
Limite inferiore (gEq/mL) = 20 x 10 gEq Limite superiore (gEq/mL) = 20 x 1,000,000 gEq
da 200 a 20.000.000 gEq/mL

Quando si utilizza il sistema di estrazione **QIASymphony® SP/AS** con campioni di sangue intero raccolto in EDTA, la formula diventa:

**Tabella 44**

Limiti dell'intervallo di misurazione (gEq/mL) con QIASymphony® SP/AS
Limite inferiore (gEq/mL) = 45 x 10 gEq Limite superiore (gEq/mL) = 45 x 1,000,000 gEq
da 450 a 45.000.000 gEq/mL

## 14 CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE CON ALTRI SISTEMI

### 14.1 Sensibilità analitica: limite di rilevabilità

La sensibilità analitica di questo saggio consente di rilevare la presenza di circa 10 molecole di DNA target in 10 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica di questo saggio, come limite di rilevabilità, è stata verificata utilizzando DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata mediante spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito a un titolo di 10 copie/10 µL con IC-DNA, diluito a un titolo di 20.000 copie/10 µL, in DNA genomico umano a un titolo di 500 ng/10 µL. Tale campione è stato analizzato in 50 replicati effettuando l'amplificazione con prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati finali sono riepilogati nella tabella seguente.

**Tabella 45**

Campioni	N.	Positivi	Negativi
10 copie di DNA plasmidico + 20.000 copie di IC-DNA + 500 ng di DNA genomico umano	50	50	0

### 14.2 Sensibilità analitica: intervallo di misurazione lineare

La sensibilità analitica di questo saggio consente la quantificazione da 1.000.000 a 10 molecole di DNA target nei 10 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica di questo saggio è stata determinata utilizzando una serie di diluizioni (gradi di diluizione 1 log<sub>10</sub>) di un DNA plasmidico contenente il prodotto dell'amplificazione, la cui concentrazione iniziale è stata misurata mediante spettrofotometro. Le diluizioni da 10<sup>7</sup> molecole per reazione a 10<sup>1</sup> molecole per reazione sono state analizzate in 9 replicati, effettuando l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita mediante regressione lineare, ha dimostrato che il saggio mostra una risposta lineare per tutte le diluizioni (coefficiente di correlazione quadratico superiore a 0,99).

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a 10<sup>6</sup> molecole per reazione, corrispondenti al genoma equivalente per reazione, entro 1 logaritmo dalla concentrazione massima dello standard di amplificazione di Q - PCR Standard (10<sup>5</sup> molecole/10 µL).

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a 10 molecole per reazione, corrispondenti al genoma equivalente per reazione, entro 1 logaritmo dalla concentrazione minima dello standard di amplificazione di Q - PCR Standard ( $10^2$  molecole/10  $\mu$ L).

I risultati finali sono riepilogati nella tabella seguente.

**Tabella 46**

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

I limiti dell'intervallo di misurazione lineare espressi in **gEq/mL** riferiti al kit di estrazione utilizzato sono calcolati a pagina 26.

#### 14.3 Sensibilità analitica: Precisione e accuratezza

La precisione del saggio, intesa come variabilità dei risultati ottenuti con diversi replicati di un campione analizzato nella stessa sessione, ha permesso di ottenere un coefficiente di variazione percentuale medio (% CV) pari a circa il 25,9% delle quantità misurate, nell'intervallo compreso tra  $10^6$  molecole e  $10^1$  molecole nei 10  $\mu$ L di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

L'accuratezza del saggio, intesa come differenza tra la media dei risultati ottenuti con diversi replicati di un campione analizzato nella stessa sessione e la concentrazione teorica del campione, ha permesso di ottenere una percentuale media di inaccuratezza (% Inacc.) pari a circa il 9,0% delle quantità misurate, nell'intervallo compreso tra  $10^6$  molecole e 10 molecole nei 10  $\mu$ L di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

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

#### 14.4 Sensibilità analitica: efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi/ sottotipi

La sensibilità analitica del saggio, intesa come efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi/ sottotipi, è stata valutata mediante il confronto delle sequenze con banche dati di nucleotidi.

L'analisi delle regioni scelte per l'ibridazione dei primer e della sonda fluorescente nell'allineamento delle sequenze disponibili nel database per il gene **U57** dell'HHV7 ha mostrato conservatività e assenza di mutazioni significative.

#### 14.5 Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici positivi, è stata testata analizzando alcuni campioni positivi al DNA dell'HHV7.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 23 campioni di sangue intero negativo raccolto in EDTA (analizzato con un prodotto di amplificazione annidato CE IVD) che sono stati positivizzati a un titolo pari a tre volte il limite di rilevabilità per il DNA dell'HHV7 con il campione di riferimento certificato "HHV7 Culture Fluid" (cod. 0810071CF, ZeptoMetrix, USA). Ogni campione è stato analizzato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

**Tabella 47**

Campioni	N	Positivi	Negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA dell'HHV7	23	23	0

La sensibilità diagnostica del saggio in questo test è stata del 100%.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 25 campioni di liquido cerebrospinale negativi per il DNA dell'HHV7 (analizzati con un prodotto di amplificazione annidato CE IVD) che sono stati positivamente a un titolo pari a tre volte il limite di rilevabilità del DNA dell'HHV7 con il campione di riferimento certificato "HHV7 Culture Fluid" (cod. 0810071CF, ZeptoMetrix, USA). Ciascun campione è stato analizzato eseguendo l'intera procedura di analisi: estrazione, con il sistema automatico NucliSENS® easyMAG® e amplificazione con l'ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

**Tabella 48**

Campioni	N	Positivi	Negativi
Liquido cerebrospinale positivamente per il DNA dell'HHV7	25	25	0

La sensibilità diagnostica del saggio in questo test è stata del 100%.

#### 14.6 Specificità analitica: assenza di cross-reattività con potenziali marcatori interferenti

La specificità analitica del saggio, intesa come assenza di cross-reattività con altri potenziali marcatori interferenti, è stata valutata mediante il confronto delle sequenze con banche dati di nucleotidi.

L'analisi dell'allineamento delle sequenze dei primer e della sonda fluorescente con le sequenze disponibili nei database per organismi diversi dall'HHV7, compresi il CMV, l'EBV, il genoma completo dell'HHV6, i virus umani più simili all'HHV7, ha dimostrato la loro specificità e l'assenza di omologie significative.

La specificità analitica del saggio, intesa come assenza di cross-reattività con altri potenziali marcatori interferenti, è stata verificata utilizzando alcuni campioni clinici negativi per il DNA dell'HHV7 ma positivi per altri agenti patogeni.

La specificità analitica è stata verificata utilizzando come materiale di riferimento 12 campioni di sangue intero raccolto in EDTA risultato negativo al DNA dell'HHV7 (analizzato con un prodotto di amplificazione annidato CE IVD), ma positivo al DNA di altri agenti patogeni (CMV, EBV e HHV6). Ogni campione è stato analizzato eseguendo l'intera procedura di analisi: estrazione e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

**Tabella 49**

Campioni	N	Positivi	Negativi
Sangue intero raccolto in EDTA CMV positivo	4	0	4
Sangue intero raccolto in EDTA, EBV positivo	6	0	6
Sangue intero raccolto in EDTA, HHV6 positivo	1	0	1
Sangue intero raccolto in EDTA, HHV6 ed EBV positivo	1	0	1

#### 14.7 Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici negativi, è stata testata analizzando alcuni campioni clinici negativi al DNA dell'HHV7.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 23 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA dell'HHV7 (analizzato con un prodotto di amplificazione annidato CE IVD). Ciascun campione è stato analizzato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

**Tabella 50**

Campioni	N	Positivi	Negativi
Sangue intero raccolto in EDTA, negativo al DNA dell'HHV7	23	0	23

La specificità diagnostica del saggio in questo test è stata del 100%.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 26 campioni di liquido cerebrospinale che era negativo per il DNA dell'HHV7 (analizzato con un prodotto di amplificazione annidata CE IVD). Ciascun campione è stato analizzato eseguendo l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema automatico NucliSENS® easyMAG® e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

**Tabella 51**

Campioni	N	Positivi	Negativi
Liquido cerebrospinale negativo al DNA dell'HHV7	26	1	25

Un campione ha dato un risultato positivo discordante al DNA dell'HHV7, con titolo inferiore a 1 copia/reazione. La discrepanza può essere spiegata considerando che campioni con titoli così bassi possono dare risultati positivi e negativi in modo alternato e casuale.

La specificità diagnostica del saggio in questo test è stata del 96,1%.

### NOTA

I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche prestazionali del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico del prodotto "HHV7 ELITe MGB Kit®Kit", FTP RTS037PLD.

## 15 BIBLIOGRAFIA

F. Drago et al. (1997) Lancet 349: 1367 - 1368 (allegato n° 1, 2 pagine);

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

Michael Kidd et al. (1996) The Journal of Infectious Diseases 174: 396-401

## 16 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto solo con i seguenti campioni clinici: sangue intero, plasma raccolto in EDTA, e liquido cerebrospinale (CSF).

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

Il plasma raccolto in EDTA deve essere ottenuto da sangue intero conservato a temperatura ambiente o a +2/+8 °C per non più di 24 ore.

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

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

Non sono disponibili dati relativi alle prestazioni del prodotto con DNA estratto dai seguenti campioni clinici: sospensione di leucociti e granulociti, liquido amniotico.

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

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

Il metodo Real Time PCR utilizzato in questo prodotto ha un'elevata sensibilità analitica che lo rende sensibile alla contaminazione da campioni clinici positivi, Positive Controls e prodotti della PCR. Le cross-contaminazioni possono produrre risultati falsi positivi. Il formato del prodotto è progettato per limitare le cross-contaminazioni. Comunque, questi fenomeni possono essere evitati solo attenendosi alle buone prassi di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni riportate nel presente manuale.

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

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

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

Per evitare risultati errati, questo prodotto deve essere maneggiato da personale professionale, qualificato e addestrato nelle tecniche di biologia molecolare, quali l'estrazione, la PCR e il rilevamento degli acidi nucleici.

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il DNA target non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione; tuttavia, non si può escludere che il DNA target abbia un titolo inferiore al limite di rilevabilità del prodotto (vedere "[11 CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius pagina 22](#)"). In tal caso, il risultato potrebbe essere un falso negativo.

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi a causa di un difetto dell'Internal Control. In questo caso il campione dovrà essere analizzato di nuovo, a cominciare dall'estrazione, con conseguente possibile ritardo nel conseguimento dei risultati finali.

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

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

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

## 17 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

### ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

**Tabella 52**

<b>Reazione con Q-PCR Standard, curva dello standard o reazione con il controllo positivo non valida</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione degli standard PCR Mix, Q-PCR Standard e del Positive Control. Controllare i volumi degli standard PCR Mix, Q-PCR Standard e del Positive Control.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la miscela PCR Mix per più di 5 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nel blocco refrigerante dell'Inventory Area o nella Cooler Unit). Non utilizzare la miscela PCR Mix per più di 3 sessioni indipendenti (7 ore ciascuna nel blocco refrigerante dell'Inventory Area o nella Cooler Unit). Non lasciare la miscela PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione dei Q-PCR Standard o del Positive Control.	Non utilizzare il Q-PCR Standard per più di 4 sessioni indipendenti (2 ore ciascuna nell'area di estrazione o nella Cooler Unit). Non utilizzare il Positive Control per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione o nella Cooler Unit). Utilizzare nuove aliquote dei Q-PCR Standard o del controllo positivo.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

**Tabella 53**

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

**Tabella 54**

<b>Reazione del campione non valida</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione di PCR Mix, Internal Control e del campione. Controllare i volumi di PCR Mix, Internal Control e del campione.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la miscela PCR Mix per più di 5 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'Inventory Area o nella Cooler Unit). Non utilizzare la miscela PCR Mix per più di 3 sessioni indipendenti (7 ore ciascuna nel blocco refrigerante dell'Inventory Area o nella Cooler Unit). Non lasciare la miscela PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione del template di Internal Control.	Utilizzare una nuova aliquota della Internal Control.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti nel 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 con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "Extract + PCR" (estrazione + PCR).
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

**Tabella 55**

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

**Tabella 56**

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

**Tabella 57**

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

**Open Platform:****Tabella 58**

<b>DNA target non rilevato nelle reazioni del Positive Control o del Q - PCR Standard oppure coefficiente di correlazione della curva standard non valido</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Errata distribuzione nei pozzetti della micropiastra.	Fare attenzione quando si distribuiscono i reagenti nei pozzetti della micropiastra e attenersi alle istruzioni della scheda di lavoro. Controllare i volumi della miscela di reazione dispensata. Controllare i volumi del Positive Control e dello Standard dispensati.
Degradazione della sonda	Utilizzare una nuova aliquota di miscela di reazione.
Degradazione del Positive Control o dello Standard.	Utilizzare una nuova aliquota di Positive Control o di soluzione standard.
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione delle reazioni del Positive Control o dello Standard impostata sullo strumento. Controllare le impostazioni del ciclo termico sullo strumento.

**Tabella 59**

<b>DNA target rilevato nella reazione del Negative Control</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Errata distribuzione nei pozzetti della micropiastra.	Evitare la fuoriuscita accidentale di campione dalla provetta. Cambiare sempre i puntali quando si passa da un campione all'altro. Dispensare con cura i campioni, i Negative Control e i Positive Control o gli Standard nei pozzetti della micropiastra e attenersi alla scheda di lavoro.
Errore durante la fase di impostazione dello strumento.	Controllare la posizione dei campioni, dei Negative Controls, dei Positive Controls o degli Standard impostata sullo strumento.
Micropiastra coperta male.	Fare attenzione quando si copre la micropiastra.
Contaminazione dell'acqua ultrapura per biologia molecolare.	Utilizzare una nuova aliquota di acqua sterile.

**Tabella 59 (segue)**

DNA target rilevato nella reazione del Negative Control	
Possibili cause	Soluzioni
Contaminazione della miscela di reazione.	Utilizzare una nuova aliquota di miscela di reazione.
Contaminazione dell'area di estrazione/ preparazione per le reazioni di amplificazione.	Pulire le superfici e gli strumenti con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire le provette e i puntali in uso.

**Tabella 60**

Fluorescenza di fondo irregolare o elevata nelle reazioni	
Possibili cause	Soluzioni
Errata distribuzione del campione.	Mescolare con cura, pipettando per tre volte, quando si mescolano i campioni, i Negative Controls e i Positive Controls o gli Standard nella miscela di reazione. Attenzione a non formare bolle d'aria.
Errata impostazione al basale.	Impostare l'intervallo di calcolo della linea basale all'interno dei cicli in cui la fluorescenza di fondo si è già stabilizzata (controllare i dati "Risultati", "Componente") e la fluorescenza del segnale non ha ancora iniziato ad aumentare, ad esempio dal ciclo 6 al ciclo 15. Utilizzare il calcolo basale automatico impostando l'opzione "Auto Baseline".

**Tabella 61**

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 Positive Control.	Verificare che il valore FAM Ct del rilevatore sia inferiore a 30. Elevate quantità di prodotti di amplificazione alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di melting. Ripetere l'amplificazione del campione per confermare la presenza del DNA target con una possibile mutazione. Il DNA target del campione deve essere sequenziato per confermare la mutazione.

## 18 LEGENDA DEI SIMBOLI



Numero di catalogo.



Limite superiore di temperatura.



Codice del lotto.



Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).



Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*.



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



Identificazione unica del dispositivo



Contenuto sufficiente per "N" test.



Consultare le istruzioni per l'uso.



Contenuto.



Conservare al riparo dalla luce del sole.



Fabbricante.

## 19 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

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

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

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

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

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, il logo ELITe MGB®, ELITe InGenius® ed ELITe BeGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup nell'Unione Europea.  
Minitip Flocked Swab® è un marchio registrato di COPAN Italia S.p.A., FecalSwab™ è un marchio registrato di COPAN Italia S.p.A.

## Appendix A HHV7 ELITE MGB Kit utilizzato in associazione alle piattaforme della serie ®



### ATTENZIONE

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

### Usò previsto

Il prodotto **HHV7 ELITE MGB® Kit** è un saggio qualitativo e quantitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la **rilevazione e quantificazione del DNA del virus erpetico umano 7 (HHV7)**, in campioni di DNA estratto da sangue intero raccolto in EDTA e plasma raccolto in EDTA, e da liquido cerebrospinale (CSF).

Il saggio è stato validato in associazione con gli strumenti **ELITE InGenius®** ed **ELITE BeGenius®**, sistemi integrati e automatizzati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati a partire da campioni di sangue intero e plasma raccolto in EDTA.

Il saggio è validato in associazione con gli strumenti **7300 Real-Time PCR System** e **7500 Real-Time PCR System**, utilizzando campioni umani di sangue intero, plasma raccolto in EDTA, e liquido cerebrospinale.

Il prodotto è destinato all'uso nella diagnosi e nel monitoraggio delle infezioni da HHV7, unitamente ai dati clinici del paziente e ad altri esiti di test di laboratorio.


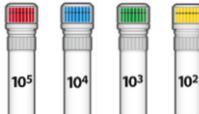

### Sequenza amplificata

Sequenza	Gene	Fluoroforo	Canale
Target	Gene della proteina capsidica minore (U57)	FAM	HHV7
Internal Control	IC2	AP525 (VIC)	IC

### Matrice validata

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

### Contenuto del Kit e prodotti correlati

HHV7 ELITE MGB Kit	HHV7 ELITE Standard	HHV7 - ELITE Positive Control
 X 4	 X 2	 X 1
PCR Mix pronta all'uso 4 provette da 540 µL 96 reazioni per kit 5 cicli di congelamento/ scongelamento	Pronta all'uso a 4 livelli: 10 <sup>5</sup> copie/reaz., 10 <sup>4</sup> copie/reaz., 10 <sup>3</sup> copie/ reaz., 10 <sup>2</sup> copie/reaz.. 2 set di 4 provette da 160 µL 4 cicli di congelamento/scongelamento (4 sessioni indipendenti a bordo)	Controllo positivo pronto all'uso 1 provetta da 160 µL 4 reazioni per kit 4 cicli di congelamento/ scongelamento (4 sessioni indipendenti a bordo)

Validità massima: **24 mesi**

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

## Altri prodotti richiesti ma non forniti nel kit

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

## Protocollo ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

**Tabella 62**

<ul style="list-style-type: none"> <li>› Volume di estrazione in ingresso</li> <li>› Volume di CPE</li> <li>› Volume di eluizione</li> <li>› Volume del campione di PCR in ingresso</li> </ul>	200 µL 10 µL 100 µL 10 µL	<ul style="list-style-type: none"> <li>› Volume della PCR Mix</li> <li>› Frequenza dei controlli</li> <li>› Frequenza di calibrazione</li> <li>› Unità di risultati quantitativi</li> </ul>	20 µL 15 giorni 60 giorni Copie/mL
--	------------------------------------	---	---

## Prestazioni di ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Matrice	Limite di rilevabilità	Sensibilità diagnostica	Specificità diagnostica
	Copie/mL		
Sangue intero	500	100% (34/34)*	100% (38/38)*
Plasma	500	100% (33/33)*	100% (33/33)*

\*campioni confermati/campioni analizzati

## Preparazione dei campioni

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

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto/conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2/+8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Sangue intero	EDTA	≤24 ore	≤72 ore	≤1 mese	> 1 mese
Plasma	EDTA	≤24 ore	≤72 ore	≤1 mese	> 1 mese

EDTA, acido etilendiamminotetraacetico

## Procedure di ELITe InGenius

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

**Prima dell'analisi**

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

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

1. Selezionare "Perform Run" sul touch screen	2. Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: "200 µL", eluizione: "100 µL"	3. Scansionare i codici a barre dei campioni con un lettore di codici a barre manuale o digitare l'ID campione
4. Selezionare l'Assay Protocol di interesse: HHV7 ELITE_WB_200_100 oppure HHV7 ELITE_PL_200_100	5. Selezionare il metodo "Extract + PCR" e la posizione del campione: Provetta primaria o Extraction Tube	6. Caricare la miscela PCR Mix e il controllo interno (IC) nell'Inventory Block
7. Caricare: PCR Cassette, cartuccia di estrazione, provetta di eluizione, cassetta per puntali, rack per provette di estrazione e rack per campioni primari	8. Chiudere lo sportello. Avviare la sessione	9. Visualizzare, approvare e archiviare i risultati

**NOTA**

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

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

1. Selezionare "Perform Run" sul touch screen	2. Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: "200 µL", eluizione: "100 µL"	3. Scansionare i codici a barre dei campioni con un lettore di codici a barre manuale o digitare l'ID campione
4. Selezionare l'Assay Protocol di interesse: HHV7 ELITE_PC e HHV7 ELITE_NC, oppure HHV7 ELITE_STD HHV7/ELITE_WB_200_100 (HHV7/ELITE_PL_200_100)	5. Selezionare il metodo "PCR Only" e impostare la posizione del campione "Elution Tube".	6. Caricare la miscela PCR Mix nell'Inventory Block
7. Caricare: rack PCR Cassette e provette contenenti la soluzione di eluizione con gli acidi nucleici estratti	8. Chiudere lo sportello. Avviare la sessione	9. Visualizzare, approvare e archiviare i risultati

**Procedure di ELITE BeGenius**

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

**Prima dell'analisi**

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

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

1. Selezionare "Perform Run" sul touch screen, quindi fare clic sul run mode «Extract + PCR»	2. Inserire il "Sample Rack" contenente i campioni con il codice a barre nella "Cooler Unit". La scansione del codice a barre è già attiva	3. Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: "200 µL", Eluizione: "100 µL"
4. Selezionare l'Assay Protocol di interesse: HHV7 ELITe_Be_WB_200_100 oppure HHV7 ELITe_Be_PL_200_100r <b>Nota:</b> se si esegue una seconda estrazione, ripetere i passaggi da 2 a 4	5. Stampare le etichette per identificare con il codice a barre gli Elution Tube vuoti. Caricare i tubi nell'Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit.	6. Caricare la PCR Mix e l'Internal Control nell'Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit.
7. Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" e l'"Extraction Rack" con le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200" e i materiali di consumo per l'estrazione richiesti.	8. Chiudere lo sportello. Avviare la sessione	9. Visualizzare, approvare e archiviare i risultati

**NOTA**

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

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

1. Selezionare "Perform Run" sul touch screen e fare clic sulla modalità di esecuzione "PCR Only".	2. Caricare le provette di acidi nucleici estratti o le provette con i controlli dotate di codice a barre nel rack di eluizione e inserirlo nella Cooler Unit	3. Per gli standard e i controlli: per ogni "Position" inserire i dati relativi a "Reagent name" e "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni). Per gli eluati: per ogni "Position" inserire i dati relativi a "Sample ID", "Sample matrix", "Extraction kit" ed "Extracted eluate vol." (volume eluato).
4. Selezionare l'Assay Protocol di interesse: HHV7 ELITe_Be_PC ed HHV7 ELITe_Be_NC, oppure HHV7 ELITe_Be_STD o HHV7 ELITe_Be_WB_200_100 o HHV7 ELITe_Be_PL_200_100	5. Caricare la miscela di reazione completa nel Reagent/Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit.	6. Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette".
7. Chiudere lo sportello. Avviare la sessione	8. Visualizzare, approvare e archiviare i risultati	

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

