

Istruzioni per l'uso

HHV8 ELITe MGB® Kit

reagenti per la Real-Time PCR del DNA



REF RTS038PLD

UDI 08033891483968

CE
0123

IVD

CRONOLOGIA REVISIONI

Rev.	Notifiche dei cambiamenti	Data (gg/mm/aa)
13-R	<p>Aggiornamento per la conformità ai requisiti del Regolamento (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVDR). Incremento delle prestazioni analitiche e diagnostiche nel paragrafo CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI Aggiornamento dell'uso previsto:</p> <ul style="list-style-type: none"> Validazione dei prodotti in associazione agli strumenti ELITe InGenius (cod. INT030) ed ELITe BeGenius (cod. INT040) con matrici sangue intero e plasma. <p>NOTA</p> <p>La composizione del prodotto rimane invariata</p> <p>Nuova grafica e impostazione del contenuto delle Istruzioni per l'uso (IFU).</p>	28/04/25
12	Aggiornamento per l'uso del prodotto in associazione allo strumento ELITe BeGenius (cod. INT040).	19/01/22
11	Il numero di tubi e il volume del Positive Control (rif. CTR038PLD) sono stati modificati: da 4 x 65 µL a 2 x 160 µL.	28/02/18
00 — 10	Sviluppo di nuovo prodotto e successive modifiche	-

NOTA

I lotti di prodotti identificati mediante i seguenti numeri di LOTTO continuano a essere immessi sul mercato ai sensi della Direttiva IVDD fino alla data di scadenza, in accordo all'articolo 110 dell'IVDR. Se si è in possesso di tali lotti di prodotto, si prega di contattare il personale di ELITechGroup per richiedere la revisione precedente delle IFU corrispondenti.

<u>Numero di catalogo</u>	<u>Numero di lotto</u>	<u>Data di scadenza</u>
RTS038PLD	U0823-004	31/08/2025
RTS038PLD	U0324-018	28/02/2026
RTS038PLD	U0824-017	31/08/2026
RTS038PLD	U0325-073	28/02/2027

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

INDICE

1 USO PREVISTO	4
2 PRINCIPIO DEL SAGGIO.....	4
3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	4
4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	4
5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO.....	5
6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	5
7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI	5
8 CAMPIONI E CONTROLLI	7
9 PROCEDURA ELITe InGenius.....	9
10 PROCEDURA ELITe BeGenius	17
11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI.....	22
12 BIBLIOGRAFIA.....	28
13 LIMITI DELLA PROCEDURA	28
14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI.....	30
15 LEGENDA DEI SIMBOLI.....	32
16 AVVISO PER L'UTILIZZATORE.....	33
17 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	33
Appendix A QUICK START GUIDE.....	34

1 USO PREVISTO

Il prodotto **HHV8 ELITe MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico *in vitro* destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come saggio di Real-Time PCR quantitativa degli acidi nucleici per la rilevazione e la quantificazione del DNA genomico dell'Herpes virus umano tipo 8 (HHV8), estratto da campioni clinici.

Il saggio è validato in associazione agli 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 umano raccolto in EDTA e plasma raccolto in EDTA.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio delle infezioni da HHV8 in pazienti con sospetta infezione o sotto monitoraggio per infezioni da HHV8.

I risultati devono essere interpretati insieme a tutte le osservazioni cliniche rilevanti e agli esiti di laboratorio.

2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è un test Real-Time PCR quantitativo per la rilevazione del DNA dell'HHV8 isolato da campioni clinici amplificati utilizzando il reagente del saggio **HHV8 Q - PCR Mix**, che contiene i primer e le sonde con tecnologia ELITe MGB®.

Le sonde ELITe MGB sono attivate quando ibridano con il prodotto specifico della PCR. **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** monitorano l'incremento di fluorescenza emessa e calcolano i "cicli soglia" (Ct) e le temperature di melting (Tm). La concentrazione del DNA di HHV8 è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

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 **HHV8 ELITe MGB Kit** fornisce il reagente del saggio **HHV8 Q-PCR Mix**, una miscela per PCR ottimizzata e stabilizzata che contiene primer e sonde specifici per:

- una regione **minor capsid protein (ORF26)** dell'HHV8, rilevata nel Canale **HHV8**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher® e marcata con fluoroforo FAM.
- Il controllo interno (IC), specifico per la **regione promoter and 5' UTR della beta-globina umana**, rilevato nel canale **IC**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 525 (AP525).

HHV8 Q-PCR Mix contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfati, il fluoroforo AP593 (utilizzato al posto di ROX o Cy5 come riferimento passivo per la normalizzazione della fluorescenza), l'enzima Uracile N-glicosidasi (UNG) per inattivare la contaminazione da prodotto di amplificazione, e l'enzima DNA polimerasi ad attivazione termica ("hot start").

Il prodotto **HHV8 ELITe MGB Kit** contiene reagenti sufficienti per eseguire **96 test** su **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius**, utilizzando **20 µL** per reazione.

4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Tabella 1

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
HHV8 Q-PCR Mix rif. RTS038PLD	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 (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Provette sterili da 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt, Germania, rif. 72.694.005).
- Acqua per biologia molecolare.

6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA del campione, il controllo interno di estrazione e inibizione, i controlli positivo e negativo di amplificazione, i DNA standard a quantità nota e i materiali di consumo **non sono** inclusi in questo prodotto.

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

Tabella 2

Strumenti e software	Prodotti e reagenti
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, cod. INT030) ELITe InGenius Software versione 1.3.0.19 (o successiva) HHV8 ELITe_STD , Assay Protocol (Protocollo di Saggio) con i parametri per l'analisi dei Calibratori HHV8 ELITe_PC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo HHV8 ELITe_NC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo HHV8 ELITe_WB_200_100 Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di Sangue Intero HHV8 ELITe_PL_200_100 Assay Protocols con i parametri per l'analisi dei campioni di Plasma	ELITe InGenius SP200 (EG SpA, cod. INT032SP200) ELITe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, rif. INT032CS) ELITe InGenius PCR Cassette (EG SpA, cod. INT035PCR), ELITe InGenius Waste Box (EG SpA, rif. F2102-000) 300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., rif. TF-350-L-R-S) solo con ELITe InGenius 1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Switzerland, rif. 30180118) solo con ELITe BeGenius CPE - Internal Control (EG SpA, rif. CTRCPE) HHV8 - ELITe Standard (EG SpA, rif. STD038PLD) HHV8 - ELITe Positive Control (EG SpA, rif. CTR038PLD)
ELITe BeGenius (EG SpA rif. INT040) ELITe BeGenius Software versione 2.2.1 (o successiva) HHV8 ELITe_Be_STD , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei Calibratori HHV8 ELITe_Be_PC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo HHV8 ELITe_Be_NC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo HHV8 ELITe_Be_WB_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di Sangue Intero HHV8 ELITe_Be_PL_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di Plasma	

7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

7.1 Avvertenze e precauzioni generali

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

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

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

7.2 Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

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

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

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

Manipolare i prodotti di estrazione in modo tale da ridurne al minimo la dispersione nell'ambiente per prevenire il rischio di contaminazione.

Manipolare con attenzione e non aprire mai la PCR Cassette in modo tale da evitare la diffusione dei prodotti della PCR nell'ambiente e la contaminazione dei campioni e dei reagenti.

7.3 Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Tabella 3

Componente	Temperatura di conservazione	Uso dopo la prima apertura	Cicli di congelamento/scongelamento	Stabilità sullo strumento (ELITe InGenius ed ELITe BeGenius)
HHV8 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

8.1 Campioni e protocolli di analisi

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

Tabella 4

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

EDTA, acido etilendiamminotetraacetico; g, giorno.

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

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

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

Tabella 5

Campione	Strumento	Nome Assay Protocol	Report	Caratteristiche
Sangue intero in EDTA	ELITe InGenius	HHV8 ELITe_WB_200_100	copie/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITe BeGenius	HHV8 ELITe_Be_WB_200_100	copie/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione : 100 µL Controllo interno: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
Plasma in EDTA	ELITe InGenius	HHV8 ELITe_PL_200_100	copie/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITe BeGenius	HHV8 ELITe_Be_PL_200_100	copie/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione : 100 µL Controllo interno: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL

NOTA

Verificare se il tubo primario e il volume del campione sono compatibili con ELITe InGenius o ELITe BeGenius, attenendosi alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione **ELITe InGenius SP200** (EG SpA, cod. INT032SP200)

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

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

NOTA

Il trasferimento 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 "7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI pagina 5".

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

Per controllare i dati relativi alle sostanze interferenti, fare riferimento a “Sostanze potenzialmente interferenti” nella sezione **11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI** pagina 22.

NOTA

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

8.2 Calibratori e controlli per PCR

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

- Per la curva di calibrazione, usare i quattro livelli del prodotto **HHV8 ELITE Standard** (non fornito in questo kit) con gli Assay Protocol **HHV8 ELITE_STD** o **HHV8 ELITE_Be_STD**.

NOTA

La concentrazione dei quattro prodotti Q – PCR Standard è espressa in copie/reazione (10^5 copie/rxn, 10^4 copie/rxn, 10^3 copie/rxn, 10^2 copie/rxn). Fare riferimento a “Incertezza della curva dello standard” nella sezione **11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI** pagina 22

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

- come controllo positivo, usare il prodotto **HHV8 - ELITE Positive Control** (non fornito in questo kit) con gli Assay Protocol **HHV8 ELITE_PC** o **HHV8 ELITE_Be_PC**.
- come controllo negativo, usare acqua per biologia molecolare (non fornita in questo kit) con gli Assay Protocol **HHV8 ELITE_NC** o **HHV8 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 i controlli positivo e negativo.

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

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

8.3 Controlli di qualità

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

9 PROCEDURA ELITE InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **HHV8 ELITE MGB Kit** con lo strumento **ELITE InGenius** si articola in tre 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.

9.2 STEP 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **HHV8 ELITe MGB Kit** può essere utilizzato su **ELITe InGenius** per eseguire:

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

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

NOTA

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

Prima di impostare una sessione:

Scongelare le provette di **PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test**. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla 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	Identificare i campioni e, ne 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 un Extraction tube precedentemente etichettato. Scongelare le provette contenenti CPE necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerle in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni.	Scongelare a temperatura ambiente gli Elution Tube contenente gli acidi nucleici estratti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla in ghiaccio o in blocco freddo.
2	Nella schermata "Home", selezionare " Perform Run ".	Nella schermata "Home", selezionare " Perform Run ".
3	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.
4	Per ogni campione, assegnare un "Track" e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un "Track" e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
5	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare l' Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").
6	Verificare che il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" (protocollo) selezionare "PCR Only".
7	Nella colonna "Sample Position" selezionare "Primary tube" o "Extraction tube" come posizione da cui caricare il campione. Verificare che " Dilution factor " sia " 1 ".	Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)". Verificare che " Dilution factor " sia " 1 ".
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Caricare il CPE e la PCR Mix nell'"Inventory Block" (area reagenti) facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto di CPE e PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.	Caricare la PCR Mix nell'"Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i rack dei puntali se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i rack dei puntali se necessario.
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	Caricare la PCR Cassette, le cartucce per estrazione ELITe InGenius SP 200 e tutti i materiali di consumo richiesti e i campioni da estrarre.	Caricare la PCR Cassette e le provette di eluizione con i campioni estratti.
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
15	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
16	Premere "Start".	Premere "Start".

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

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

NOTA

Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, tapparli, identificarli e conservarli 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 inviare i risultati della sessione al centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Lo strumento **ELITe InGenius** utilizza il prodotto **HHV8 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 A. 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 di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo

L'**ELiTe InGenius software** interpreta i risultati della PCR per il target del Controllo Positivo e del Controllo Negativo con i parametri degli Assay Protocol **ELiTe_PC** ed **ELiTe_NC**. I valori di Ct risultanti sono convertiti in concentrazione e 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 Controllo Positivo e del Controllo Negativo scadono **dopo 15 giorni**.

L'**ELiTe InGenius software** elabora i risultati del controllo positivo e del controllo negativo e genera le carte di controllo. Per impostare le carte di controllo 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 grafici della carta di controllo. 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

L'**ELiTe InGenius Software** interpreta i risultati della PCR per il target (Canale **HHV8**) e per il controllo interno (Canale **IC**) con i parametri degli Assay Protocol **HHV8 ELiTe_WB_200_100** or **HHV8 ELiTe_PL_200_100**. I valori di 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.

1) Curva di calibrazione	Stato
HHV8 Q-PCR Standard	APPROVATO
2) Controllo positivo	Stato
HHV8 Positive Control	APPROVATO
3) Controllo negativo	Stato
HHV8 Negative Control	APPROVATO

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

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

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

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
HHV8:DNA Detected, quantity equal to XXX copies/mL ("HHV8:DNA rilevato, quantità pari a "XXX" copie/mL)	L' HHV8 DNA è stato rilevato nel campione nell'intervallo di misurazione del saggio, nella concentrazione indicata.
HHV8:DNA Detected, quantity below "LLoQ" copies/mL (HHV8:DNA rilevato, quantità inferiore a "LLoQ" copie/mL)	L' HHV8 DNA è stato rilevato nel campione, al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) del saggio.
HHV8:DNA Detected, quantity beyond "ULoQ" copies/mL (HHV8:DNA rilevato, quantità oltre "ULoQ" copie/mL)	L' HHV8 DNA è stato rilevato nel campione, oltre il limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio.
HHV8:DNA Not Detected or below "LoD" copies/mL (HHV8:DNA non rilevato o inferiore a "LoD" copie/mL)	L' HHV8 DNA non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per il DNA dell'HHV8 target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione (LoD) del saggio.
Invalid - Retest Sample (Non valido - Ripeti test su campione)	Risultato del saggio non valido per un errore del controllo interno (ad es. errata estrazione o presenza di inibitori). Il test deve essere ripetuto.

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

Se ne rimane un volume sufficiente, l'eluato può essere ritestato (tal quale oppure diluito) mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only" (solo PCR). In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato partendo dall'estrazione di un nuovo campione in modalità "Extract + PCR" (vedere [14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 30](#)).

I campioni segnalati come "HHV8:DNA Not Detected or below "LoD" copies/mL" (HHV8:DNA non rilevato o inferiore a "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'HHV8 oppure il DNA dell'HHV8 è presente in una concentrazione inferiore al limite di rilevazione del saggio (vedere [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22](#)).

I campioni positivi per il DNA dell'HHV8 ad una concentrazione inferiore al limite di rilevazione (e al limite di quantificazione inferiore) del saggio, se rilevati, sono identificati nel report come "HHV8:DNA Detected, quantity below "LLoQ" copies/mL (HHV8:DNA rilevato, quantità inferiore a "LLoQ" copie/mL)" (vedere [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22](#)).

I campioni positivi per il DNA dell'HHV8 all'interno dell'intervallo di misurazione lineare sono rilevati e segnalati come HHV8:DNA Detected, quantity equal to "XXX" copies/mL ("HHV8:DNA rilevato, quantità pari a "XXX" copie/mL)" (vedere [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22](#)).

I campioni positivi per il DNA dell'HHV8 che sono in quantità maggiore del limite superiore di quantificazione sono segnalati come "HHV8:DNA Detected, quantity beyond "ULoQ" copies/mL ("HHV8:DNA rilevato, quantità oltre "ULoQ" copie/mL)" (vedere [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22](#)) e non sono idonei per la quantificazione. Se necessario, il campione può essere diluito prima dell'estrazione o della PCR e ritestato per ottenere risultati all'interno dell'intervallo di misurazione lineare del saggio.

NOTA

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

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

9.3.4 Refertazione dei risultati dei campioni

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

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

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

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

10 PROCEDURA ELITE BeGenius

La procedura per l'uso del prodotto **HHV8 ELITE MGB Kit** con lo strumento **ELITE BeGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 7

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

10.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento ELITE BeGenius e selezionare la modalità **"CLOSED"**;
- nel menu "Calibrations" nella home page, verificare che i calibratori (**Q-PCR Standard**) siano approvati e validi (Stato) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non ci sono calibratori validi disponibili per il lotto di **PCR Mix**, eseguire la calibrazione come descritto nelle sezioni seguenti;
- nel menu "Controls" nella home page, verificare che i controlli per PCR (**Positive Control, Negative Control**) siano approvati e validi (Stato) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non ci sono controlli per PCR validi disponibili per il lotto di **PCR Mix**, eseguire i controlli per PCR come descritto nelle sezioni seguenti;
- 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.

10.2 STEP 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **HHV8 ELITE MGB Kit** può essere utilizzato su **ELITE BeGenius** per eseguire:

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

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

NOTA

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

Prima di impostare una sessione:

Scongelare le provette di **PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test**. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla 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>Identificare i campioni e, ne 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>Scongellare le provette contenenti CPE necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerle in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni.</p>	<p>Scongellare a temperatura ambiente la provetta di eluizione contenente gli acidi nucleici estratti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla in ghiaccio o in blocco freddo.</p>
2	Nella schermata "Home", selezionare " Perform Run ".	Nella schermata "Home", selezionare " Perform Run ".
3	Rimuovere tutti i Rack dalla "Cooler Unit" e posizzionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizzionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "run mode": "Extract + PCR".	Selezionare il "run mode": "PCR Only".
5	Caricare i campioni nel "Sample Rack". (Nota: quando si caricano provette secondarie "2 mL Tubes", utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack").	Caricare i campioni nell'"Elution Rack".
6	Inserire il " Sample Rack " nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 5" (L5). Se necessario, inserire il "Sample ID" (SID) per ogni "Position" utilizzata. (Se si caricano provette secondarie, contrassegnare con "2 mL Tube". Se le provette secondarie non hanno codice a barre, digitare manualmente il "Sample ID").	<p>Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3).</p> <p>Se necessario, per ogni "Position" inserire il "Sample ID", la "Sample matrix", l'"Extraction kit" e l'"Extracted eluate vol." (volume eluato).</p>
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.
9	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.	Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.
12	Caricare le "Elution tubes" nell'"Elution Rack" (le provette di eluizione possono essere etichettate con il codice a barre per migliorarne la tracciabilità).	Non applicabile
13	Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura utilizzando la "Lane 2" (L2).	Non applicabile
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile

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

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	Scongelare le provette di Q-PCR Standard necessarie (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelare le provette di controllo positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla in ghiaccio o in blocco freddo. Preparare il controllo negativo trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in unElution tube, fornita in dotazione con l'ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".
3	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizzionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizzionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "run mode": PCR Only.	Selezionare il "run mode": "PCR Only".
5	Caricare le provette di Q-PCR Standard nell'"Elution Rack".	Caricare le provette di controllo positivo e controllo negativo nell'"Elution Rack".
6	Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" inserire "Reagent name" e "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).	Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" inserire "Reagent name" e "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare l'"Extraction Input Volume" (200 µL) e l'"Extracted Elute Volume" (100 µL).	Verificare l'"Extraction Input Volume" (200 µL) e l'"Extracted Elute Volume" (100 µL).
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	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".
12	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2). Se necessario, per ogni PCR Mix, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 2" (L2). Se necessario, per ogni PCR Mix, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).
13	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
14	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.
15	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
16	Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" nell'"Inventory Area".	Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" nell'"Inventory Area".
17	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
18	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
19	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 gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, tapparlo, identificarlo e conservarlo a $-20 \pm 10^\circ\text{C}$ 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 inviare i risultati della sessione al centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

ELITe BeGenius utilizza il prodotto **HHV8 ELITe MGB Kit** per generare i risultati tramite la seguente procedura:

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

4. Refertazione dei risultati del campione

NOTA

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

11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI**11.1 Limite di rilevazione (LoD)**

Il limite di rilevazione (LoD) del test in associazione a sangue intero e plasma raccolti in EDTA è stato determinato su piattaforme aperte, ed è stato verificato sugli strumenti ELITe InGenius ed ELITe BeGenius analizzando 20 replicati di campioni di matrice addizionati con materiale di riferimento dell'HHV8 (Human Herpes Virus Type 8 Culture Fluid di ZeptoMetrix).

I risultati per entrambe le matrici sono riportati nella tabella seguente.

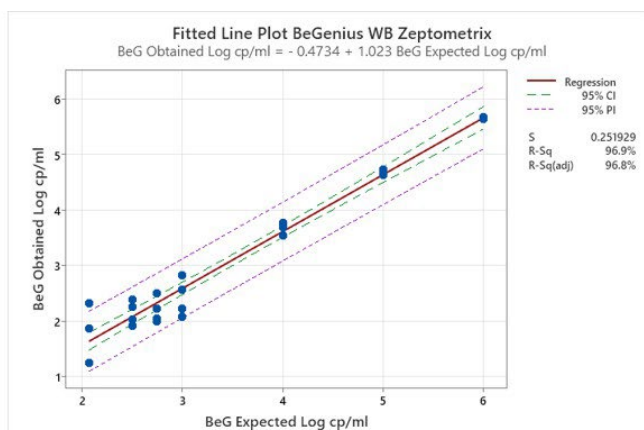
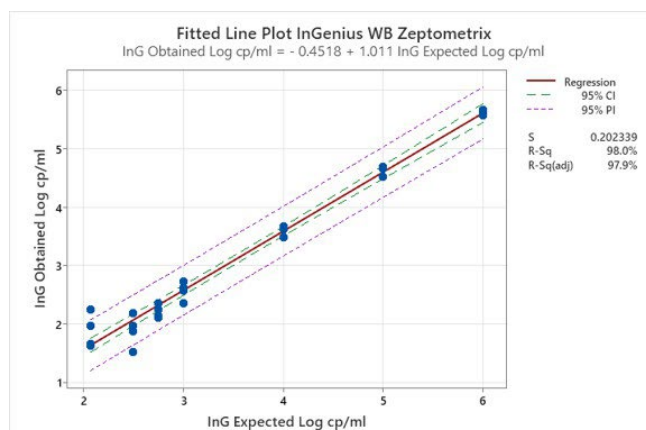
Tabella 8 Limite di rilevazione con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius (copie/mL)

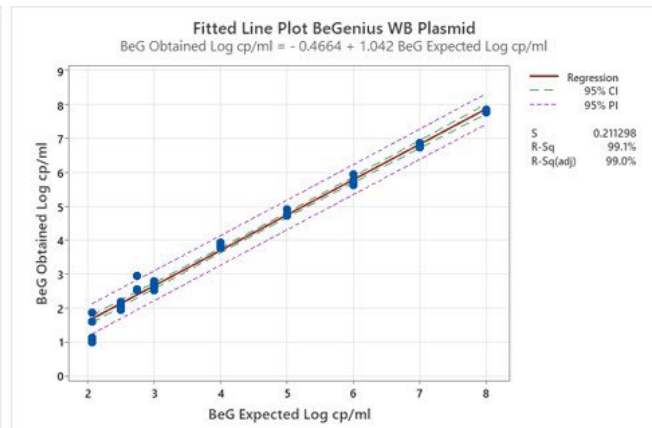
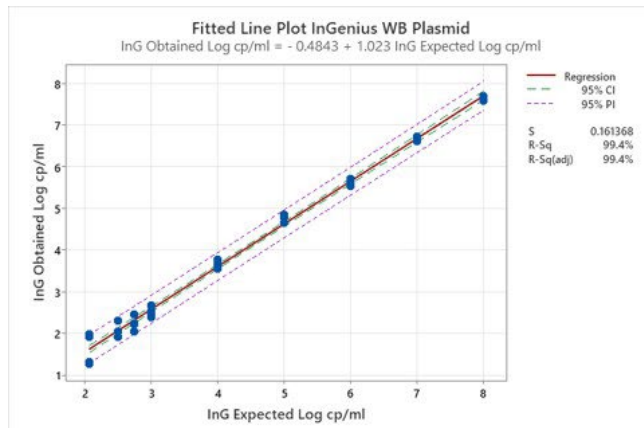
Matrice	LoD
Sangue intero in EDTA	117
Plasma in EDTA	98

11.2 Intervallo di misurazione lineare e limiti di quantificazione

L'intervallo di misurazione lineare del test è stato determinato in associazione a sangue intero e plasma su **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** utilizzando un pannello di materiale di riferimento dell'HHV8 (Human Herpes Virus Type 8 Culture Fluid di ZeptoMetrix) in matrice negativa per il DNA dell'HHV8. L'intervallo di misurazione lineare del saggio è stato determinato con un intervallo più ampio di concentrazioni utilizzando un pannello di materiale di riferimento dell'HHV8 (Plasmid DNA pHHV8-L-8 di EG SpA) in matrice negativa per il DNA dell'HHV8.

I risultati per ciascuna matrice sono riportati nei paragrafi seguenti.

Sangue intero:

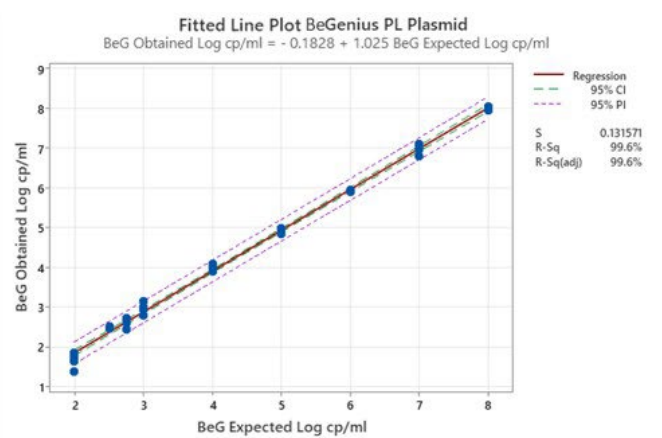
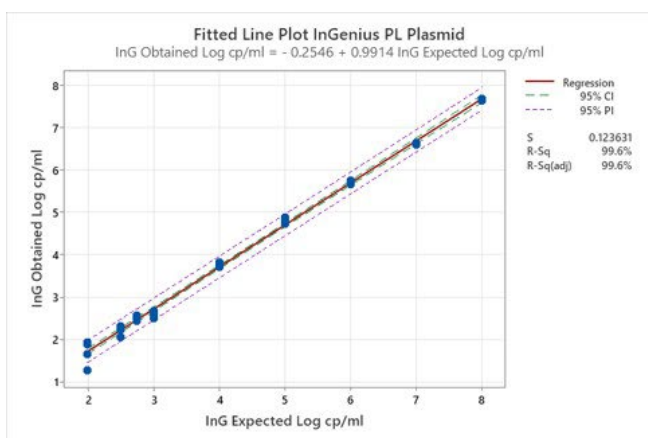
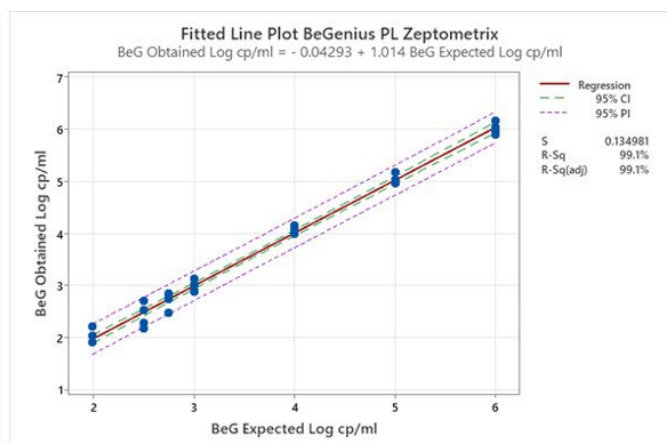
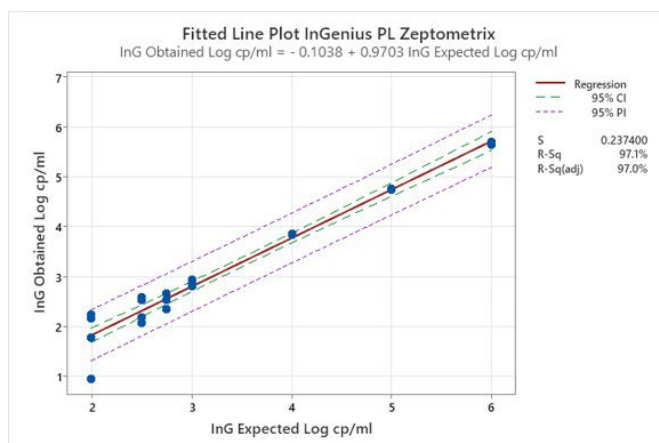


I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 9 Intervallo di misurazione lineare per campioni di sangue intero con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius

Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
copie/mL	117	100,000,000

Plasma:



I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 10 Intervallo di misurazione lineare per campioni di plasma con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
copie/mL	98	100,000,000

11.3 Incertezza della curva standard

Il valore di incertezza della curva 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 0,2476 Log copie/reazione.

Tabella 11

Livelli della curva standard	Teorico	SD	Incertezza combinata estesa
	Log c/rxn		
HHV8 Q - PCR Standard 10^5	5,0000	0,0481	0,2476
HHV8 Q - PCR Standard 10^4	4,0000	0,0529	
HHV8 Q - PCR Standard 10^3	3,0000	0,0463	
HHV8 Q - PCR Standard 10^2	2,0000	0,0898	

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

L'inclusività del saggio, come efficienza della rilevazione per differenti genotipi di HHV8, è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nei database dei nucleotidi. L'analisi ha dimostrato la conservazione della sequenza e l'assenza di mutazioni significative. Pertanto, si prevede la rilevazione efficiente di differenti ceppi o isolati.

11.5 Organismi potenzialmente interferenti: Cross-reattività

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

11.6 Organismi potenzialmente interferenti: Inibizione

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

11.7 Sostanze potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione da parte di sostanze interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero essere presenti nei campioni clinici è stata valutata per il saggio mediante l'analisi di un pannello di sostanze a concentrazioni rilevanti in campioni positivi per l'HHV8.

I risultati per ciascuna matrice sono riportati nei paragrafi seguenti.

Tabella 12 Sangue intero

Campioni	HHV8 Pos. / Rep	Esito
Azitromicina	3/3	Nessuna inibizione
Abacavir solfato	3/3	Nessuna inibizione

Tabella 12 Sangue intero (segue)

Campioni	HHV8 Pos. / Rep	Esito
Cidofovir	3/3	Nessuna inibizione
Ganciclovir	3/3	Nessuna inibizione
Ribavirina	3/3	Nessuna inibizione
Ciclosporina A	3/3	Nessuna inibizione
Bilirubina	3/3	Nessuna inibizione
EDTA	3/3	Nessuna inibizione
Eparina	3/3	Inibizione (campioni invalidi)
Ampicillina	5/5	Nessuna inibizione
Cefpodoxima	5/5	Nessuna inibizione
Ciprofloxacina	5/5	Nessuna inibizione
Vancomicina	5/5	Nessuna inibizione
Aciclovir	5/5	Nessuna inibizione
Fluconazolo	5/5	Nessuna inibizione
Etanolo	5/5	Nessuna inibizione

Le sostanze testate, ad eccezione dell'eparina, non interferiscono con l'amplificazione dell'HHV8 o del controllo interno.

Tabella 13 Plasma

Campione	HHV8 Pos./Rep.	Esito
Plasma itterico	5/5	Nessuna inibizione
Plasma lipemico	5/5	Nessuna inibizione
Sangue emolitico H	5/5	Nessuna inibizione
Sangue emolitico M	5/5	Nessuna inibizione
Sangue emolitico L	5/5	Nessuna inibizione
Plasma in EDTA	5/5	Nessuna inibizione
Plasma in eparina	4/5	Inibizione (campioni invalidi)

Le sostanze testate, ad eccezione dell'eparina, non interferiscono con l'amplificazione dell'HHV8 o del controllo interno.

Il test ha dimostrato che tutte le sostanze, ad eccezione dell'eparina, non interferiscono con la rilevazione e la quantificazione del target HHV8 e del controllo interno utilizzando il prodotto HHV8 ELITe MGB Kit su campioni di sangue intero e plasma.

11.8 Ripetibilità

La ripetibilità intra-sessione e inter-sessione del saggio è stata valutata sugli strumenti ELITe InGenius ed ELITe BeGenius analizzando un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA, inclusi un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento per HHV8 (Human Herpes Virus Type 8 Culture Fluid di ZeptoMetrix).

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

Tabella 14 Ripetibilità intra-sessione su ELITE InGenius

Campione	HHV8 ELITE MGB Kit - Giorno 1				
	N	Media Ct HHV8	SD Ct HHV8	%CV Ct HHV8	% Concordezza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	35,66	0,39	1,10	100%
10 x LoD	8	33,95	0,28	0,84	100%

Tabella 15 Ripetibilità intra-sessione su ELITE BeGenius

Campione	HHV8 ELITE MGB Kit - Giorno 1				
	N	Media Ct HHV8	SD Ct HHV8	%CV Ct HHV8	% Concordezza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	36,26	0,42	1,16	100%
10 x LoD	8	34,43	0,11	0,31	100%

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

Tabella 16 Ripetibilità inter-sessione su ELITE InGenius

Campione	HHV8 ELITE MGB Kit - Giorni 1-2				
	N	Media Ct HHV8	SD Ct HHV8	%CV Ct HHV8	% Concordezza
Negativi	16	-	-	-	100%
3 x LoD	16	35,58	0,51	1,44	100%
10 x LoD	16	33,93	0,56	1,65	100%

Tabella 17 Ripetibilità inter-sessione su ELITE BeGenius

Campione	HHV8 ELITE MGB Kit - Giorni 1-2				
	N	Media Ct HHV8	SD Ct HHV8	%CV Ct HHV8	% Concordezza
Negativi	16	-	-	-	100%
3 x LoD	16	36,10	0,52	1,44	100%
10 x LoD	16	34,25	0,32	0,93	100%

Nel test di ripetibilità, HHV8 ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct del target espressa come %CV inferiore a 5%.

11.9 Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata valutata sugli strumenti ELITE InGenius ed ELITE BeGenius analizzando un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA, inclusi un campione negativo e due campioni positizzati con materiale di riferimento per HHV8 (Human Herpes Virus Type 8 Culture Fluid di ZeptoMetrix).

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

Tabella 18 Riproducibilità inter-strumento su ELITe InGenius

Campione	Inter-strumento Lotto 1				
	N	Media Ct	SD	% CV	% Concordanza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	36,64	0,76	2,08	100%
10 x LoD	8	34,97	0,34	0,99	100%

Tabella 19 Riproducibilità inter-strumento su ELITe BeGenius

Campione	Inter-strumento Lotto 1				
	N	Media Ct	SD	% CV	% Concordanza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	38,07	0,90	2,37	100%
10 x LoD	8	35,91	0,33	0,91	100%

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

Tabella 20 Riproducibilità inter-lotto su ELITe InGenius

Campione	Inter-lotto Giorno 1				
	N	Media Ct	SD	% CV	% Concordanza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	36,35	0,65	1,80	100%
10 x LoD	8	34,80	0,67	1,93	100%

Tabella 21 Riproducibilità inter-lotto su ELITe BeGenius

Campione	Inter-lotto Giorno 1				
	N	Media Ct	SD	% CV	% Concordanza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	37,90	1,03	2,72	100%
10 x LoD	8	35,84	0,41	1,14	100%

Nel test di riproducibilità, HHV8 ELITe MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct del target espressa come %CV inferiore a 5%.

11.10 Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata in associazione allo strumento **ELITe InGenius** analizzando campioni clinici di sangue intero raccolto in EDTA e di plasma raccolto in EDTA, certificati negativi o presumibilmente negativi per il target. 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 a ELITe InGenius è applicabile anche a ELITe BeGenius.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

Tabella 22 Specificità diagnostica

Campioni	N	Positivi	Negativi	Specificità diagnostica in %
Sangue intero raccolto in EDTA e negativo per il DNA dell'HHV8	95	0	95	100%
Plasma raccolto in EDTA e negativo per il DNA dell'HHV8	56	0	56	100%

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

11.11 Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata in associazione allo strumento **ELITe InGenius** analizzando campioni clinici di sangue intero raccolto in EDTA e di plasma raccolto in EDTA certificati positivi per il target o con aggiunta di materiale di riferimento dell'HHV8 (Human Herpes Virus Type 8 Culture Fluid di ZeptoMetrix).

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 a ELITe InGenius è applicabile anche a ELITe BeGenius.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

Tabella 23 Sensibilità diagnostica

Campioni	N	Positivi	Negativi	Sensibilità diagnostica in %
Sangue intero raccolto in EDTA e positivo per il DNA dell'HHV8	51	50	1	98%
Plasma raccolto in EDTA e positivizzato per il DNA dell'HHV8	52	52	0	100%

NOTA

I dati e i risultati completi dei test eseguiti per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico del prodotto "HHV8 ELITe MGB® Kit", FTP 038PLD.

12 BIBLIOGRAFIA

- B. Bigoni et al (1996) J Inf Dis 173: 542 - 549
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35: e30
 K. Linnet et al. (2004) Clin. Chem. 50: 732 – 740
 C. N. Kotton et al. (2018) Transplantation 2: 900 - 931

13 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto solo con i seguenti campioni clinici: sangue intero raccolto in EDTA e plasma raccolto in EDTA.

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

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.

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

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

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

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

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

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

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il DNA del target non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione, ma non si può escludere che il DNA del target abbia un titolo più basso del limite di rilevazione del prodotto (vedere [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22](#)). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

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

Possibili polimorfismi, 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 rilevanti e agli esiti degli esami di laboratorio.

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 valutato in rapporto ai potenziali benefici per il paziente ed è stato ritenuto accettabile.

14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Tabella 24

Reazione con Q-PCR Standard, curva dello standard o controllo positivo non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix, dei Q-PCR Standard e del Controllo Positivo. Controllare i volumi della PCR Mix, dei Q-PCR Standard e del Controllo Positivo.
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 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 Controllo Positivo.	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 Controllo Positivo 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 25

Reazione del controllo negativo non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix e del Controllo Negativo. Controllare i volumi della PCR Mix e del Controllo Negativo.
Contaminazione del Negative Control.	Non utilizzare il Controllo Negativo per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di 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 26

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione di PCR Mix, Controllo Interno e del campione. Controllare i volumi di PCR Mix, Controllo Interno e del campione.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la 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 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 Controllo Interno.	Utilizzare una nuova aliquota di Controllo Interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti nel con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR). Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione in una sessione in modalità "Extract + PCR" (estrazione + PCR).
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 27

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

Tabella 28

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

Tabella 29

Anomala percentuale elevata di risultati positivi nella stessa sessione (reazioni con valori di Ct tardivi comparabili)	
Possibili cause	Soluzioni
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.

15 LEGENDA DEI SIMBOLI



Numero di catalogo.



Limite superiore di temperatura.



Codice del lotto.



Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).



Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*.



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



Numero Unico Identificativo del dispositivo



Contenuto sufficiente per "N" test.



Consultare le istruzioni per l'uso.



Contenuto.



Conservare al riparo dalla luce del sole.



Fabbricante.

16 AVVISO PER L'UTILIZZATORE

Qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiedono l'utilizzatore e/o il paziente. Al momento della revisione corrente delle Istruzioni per l'uso, non si è verificato nessun grave incidente né alcun richiamo, aventi un impatto sulle prestazioni del prodotto e la sicurezza del dispositivo.

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

17 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

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

I reagenti di rilevazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più brevetti USA numero 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, e da brevetti EP numero 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161. Sono state presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

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

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

Appendix A HHV8 ELITe MGB Kit used in association with Genius series® platforms



CAUTION

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

Intended use

The product **HHV8 ELITe MGB® Kit** is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as quantitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the genomic DNA of Herpes human virus 8 (HHV8) extracted from clinical specimens.

The assay is validated in association with the **ELITe InGenius®** and **ELITe BeGenius®** instruments, automated and integrated systems for extraction, Real-Time PCR and results interpretation, using human specimens of whole blood collected in EDTA and plasma collected in EDTA.

The product is intended for use as an aid in the diagnosis and monitoring of HHV8 infections in patients suspected of having or undergoing monitoring of HHV8 infections.

The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observation and laboratory outcomes.


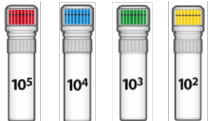

Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target	minor capsid protein gene (ORF26)	FAM	HHV8
Internal Control	Human beta globin gene	AP525	IC

Validated matrix

- Whole blood collected in EDTA
- Plasma collected in EDTA

Kit content and related products

HHV8 ELITe MGB Kit	HHV8 ELITe Standard	HHV8 - ELITe Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
Ready-to-use PCR Mix 4 tubes of 540 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles	Ready-to-use 4 levels: 10 ⁵ copies/rxn, 10 ⁴ copies/rxn, 10 ³ copies/rxn, 10 ² copies/rxn. 2 sets of 4 tubes of 200 µL 4 freeze-thaw cycles	Ready-to-use PC 2 tubes of 160 µL 8 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles

Maximum shelf-life: **24 months**

Storage Temperature: **-20 °C**

Other products required not provided in the kit

<ul style="list-style-type: none"> • ELITe InGenius instrument: INT030. • ELITe BeGenius instrument: INT040. • ELITe InGenius SP 200: INT032SP200. • ELITe InGenius SP 200 Consumable Set: INT032CS. 	<ul style="list-style-type: none"> • ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR. • ELITe InGenius Waste Box: F2102-000. • CPE - Internal Control: CTRCPE • 300 µL Filter Tips Axigen: TF-350-L-R-S. • 1000 µL Filter Tips Tecan: 30180118.
--	---

ELITe InGenius and ELITe BeGenius protocol

› Sample volume	200 µL	› Eluate PCR input volume	20 µL
› CPE volume	10 µL	› Q—PCR Mix volume	20 µL
› Total elution volume	100 µL	› Frequency of controls	15 days

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
	copies/mL		
whole blood	117	98 %	100 %
plasma	98	100 %	100 %

Sample preparation

This product is intended for use on the **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** with the following clinical specimens identified according to laboratory guidelines, and collected, transported, and stored under the following conditions.

Sample type	Collection requirements	Transport/Storage conditions			
		+16 / +26 °C (room temperature)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Whole blood	EDTA	≤ 1 d	≤ 3 d	≤ 30 d	≤ 30 d
Plasma	EDTA	≤ 1 d	≤ 3 d	≤ 30 d	≤ 30 d

C EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; d, day.

ELITe InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface (GUI) of ELITe InGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational modes are available: complete run (Extract + PCR) or PCR Only.

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL"	3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay Protocol" of interest: HHV8 ELITe_WB_200_100 or HHV8 ELITe_PL_200_100	5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Primary tube or Extraction Tube	6. Load the PCR Mix and the Internal Control in the Inventory Block
7. Load: PCR Cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks and primary sample racks	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

NOTE

If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user's manual for procedure.

Procedure 2: PCR Only (e.g., eluates, standards, controls)

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL"	3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay protocol" of interest: HHV8 ELITe_PC and HHV8 ELITe_NC, or HHV8 ELITe_STD or HHV8 ELITe_WB_200_100 or HHV8 ELITe_PL_200_100	5. Select the method "PCR Only" and the sample position "Elution Tube"	6. Load the PCR Mix in the Inventory Block
7. Load: PCR Cassette rack and Elution tube rack with the extracted nucleic acid	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

ELITe BeGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface (GUI) of ELITe BeGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational modes are available: complete run (Extract + PCR) or PCR Only.

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extract + PCR»	2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the Cooler Unit. The barcode scan is already active	3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"
4. Select the "Assay protocol" of interest HHV8 ELITe_Be_WB_200_100 or HHV8 ELITe_Be_PL_200_100r Note: If a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4	5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load the PCR Mix and the Internal Control in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
7. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette" and the "Extraction Rack" with the "ELITe InGenius SP 200" extraction cartridges and the required extraction consumables	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

NOTE

If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user's manual for procedure.

Procedure 2: PCR Only (e.g., eluates, standards, controls)

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode "PCR Only".	2. Load the extracted nucleic acid or controls barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit".	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL"
4. Select the "Assay protocol" of interest: HHV8 ELITe_Be_PC and HHV8 ELITe_Be_NC, or HHV8 ELITe_Be_STD or HHV8 ELITe_Be_WB_200_100 or HHV8 ELITe_Be_PL_200_100	5. Load the Complete reaction mixture in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit.	6. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette".
7. Close the door. Start the run.	8. View, approve and store the results.	



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