

AVVERTENZA del 03/06/2024

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«PVB19 ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTS070PLD

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Aggiornamento per l'uso del prodotto in associazione con lo strumento «ELITe BeGenius[®]» (REF INT040) e la matrice liquido amniotico.*

Aggiornamento delle CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI (pag.16):

- *Intervallo di misurazione lineare*
 - *Fattore di conversione alle Unità Internazionali*
-
- *Aggiunta dell'informazione relativa all'UDI.*

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

NOTA BENE

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



Parvovirus B19 ELITE MGB® Kit

reagenti per la Real-Time PCR del DNA

REF RTS070PLD



IVD



UDI 08033891483623

INDICE

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 2
MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	pag. 2
MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO	pag. 2
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 3
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 4
CAMPIONI E CONTROLLI per ELITE InGenius ed ELITE BeGenius	pag. 5
PROCEDURA ELITE InGenius	pag. 7
PROCEDURA ELITE BeGenius	pag. 12
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius	pag. 16
CAMPIONI E CONTROLLI PER ALTRI STRUMENTI	pag. 23
PROCEDURA ALTRI STRUMENTI	pag. 24
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con ALTRI STRUMENTI	pag. 34
BIBLIOGRAFIA	pag. 41
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 41
RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	pag. 42
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 45
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 46
ALLEGATO: QUICK START GUIDE	pag. A

USO PREVISTO

Il prodotto **Parvovirus B19 ELITE MGB Kit** è un dispositivo medico diagnostico in vitro destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come saggio qualitativo e quantitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la **rilevazione e quantificazione del DNA del virus umano Parvovirus B19 (PVB19)** dei genotipi 1, 2, 3a e 3b, in campioni di DNA 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 (periferico e midollare) raccolto in EDTA e liquido amniotico.

Il saggio è anche validato in associazione agli strumenti **7300 Real-Time PCR System** and **7500 Real-Time PCR Instrument**, a partire da campioni di sangue intero (periferico e midollare) raccolto in EDTA e da plasma raccolto in EDTA.

Parvovirus B19 ELITE MGB® Kit

reagenti per la Real-Time PCR del DNA

REF RTS070PLD

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio dell'infezione da Parvovirus B19. I risultati devono essere interpretati insieme a tutte le osservazioni cliniche rilevanti e agli esiti degli esami di laboratorio.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è una Real-Time PCR quantitativa per la rilevazione del DNA di Parvovirus, isolato da campioni e amplificato utilizzando il reagente **PVB19 Q PCR Mix**, che contiene primers e 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 Parvovirus è calcolata rispetto ad 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.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **Parvovirus B19 ELITE MGB Kit**, fornisce il reagente **PVB19 Q - PCR Mix** una miscela ottimizzata e stabilizzata di oligonucleotidi e reagenti per PCR che contiene i primers e le sonde specifici per:

- la regione **VP1** di PVB19, rilevata nel canale **PVB19**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher®, e marcata con il fluoroforo FAM
- la regione **promotore e 5' UTR** del **gene umano codificante la beta Globina**, rilevata nel canale **IC**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 525 (AP525).

La **PVB19 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 **Parvovirus B19 ELITE MGB Kit** consente di effettuare **96 test** in associazione con **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius (24 tests per provetta)**, e **100 test** in associazione ad altri sistemi (**25 tests per provetta**), utilizzando 20 µL per reazione.

Il prodotto **Parvovirus B19 ELITE MGB Kit** può essere anche utilizzato in associazione con altri strumenti equivalenti.

MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
PVB19 Q - PCR Mix cod. RTS070PLD	Miscela di reagenti per la Real-Time PCR in provetta con tappo trasparente	4 x 540 µL	-

MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o materiale analogo.
- Agitatore Vortex.
- 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 cod. 72.694.005).
- Acqua per biologia molecolare.
- Termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza 7300 Real Time PCR System o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument calibrato come previsto dal fabbricante.

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA dai campioni da analizzare, il controllo interno di estrazione e di 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 automatica degli acidi nucleici, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati delle analisi eseguite sui campioni da analizzare, sono richiesti i seguenti prodotti.

Strumenti e Software	Prodotti e Reagenti
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA cod. INT030) ELITe InGenius Software versione 1.3.0.17 (o successiva) PVB19 ELITe STD , Assay Protocol (Protocollo di Saggio) con i parametri per l'analisi dei Calibratori PVB19 ELITe PC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo PVB19 ELITe NC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo PVB19 ELITe WB_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di sangue intero PVB19 ELITe AF_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di liquido amniotico	ELITe InGenius SP 200 (EG SpA, cod. INT032SP200) ELITe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, cod. INT032CS) ELITe InGenius PCR Cassette (EG SpA, cod. INT035PCR) ELITe InGenius Waste Box (EG SpA, cod. F2102-000) 300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., cod. TF-350-L-R-S) solo per ELITe InGenius 1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Switzerland, cod. 30180118) solo per ELITe BeGenius CPE - Internal Control (EG SpA, cod. CTRCPE) Parvovirus B19 ELITe Standard (EG SpA, cod. STD070PLD) Parvovirus B19 - ELITe Positive Control (EG SpA, cod. CTR070PLD)
ELITe BeGenius (EG SpA cod. INT040) ELITe BeGenius Software versione 2.1.0. (o successiva) PVB19ELITe_Be STD , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei Calibratori PVB19 ELITe_Be PC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo PVB19 ELITe_Be NC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo PVB19 ELITe_Be WB_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di sangue intero. PVB19 ELITe_Be AF_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di liquido amniotico.	MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (LifeTechnologies, cod. N8010560) CPE – Internal Control (EG SpA, cod. CTRCPE) Parvovirus B19 ELITe Standard (EG SpA, cod. STD070PLD) Parvovirus B19– ELITe Positive Control (EG SpA, cod. CTR070PLD) QIASymphony Midi kit (QIAGEN GmbH, cod. 931236) NucliSENS easyMAG Reagents (bioMérieux SA, cod. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135) ELITe GALAXY 300 Extraction Kit (EG S.p.A., ref. INT021EX). InviMag Universal Kit / IG (INVITEK, ref. 2450120100).
7300 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, cod. 4351101) QIASymphony® SP/AS (QIAGEN GmbH, cod. 9001297, 9001301) NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, cod. 200111) ELITe GALAXY (EG S.p.A., ref. INT020). ELITe STAR (EG SpA ref. INT010)	

Strumenti e Software	Prodotti e Reagenti
7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, cod. 4406985) QIASymphony® SP/AS (QIAGEN GmbH, cod. 9001297, 9001301) NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, cod. 200111) ELITe GALAXY (EG S.p.A., ref. INT020). ELITe STAR (EG SpA ref. INT010)	MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (LifeTechnologies, cod. 4346906) CPE – Internal Control (EG SpA., cod. CTRCPE) Parvovirus B19 ELITe Standard (EG SpA, cod. STD070PLD) Parvovirus B19 – ELITe Positive Control (EG SpA, cod. CTR070PLD) QIASymphony Midi kit (QIAGEN GmbH, cod. 931236) NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux SA, cod. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135) ELITe GALAXY 300 Extraction Kit (EG S.p.A., ref. INT021EX). InviMag Universal Kit / IG (INVITEK, ref. 2450120100).

Un Fattore di conversione (Fc) permette di esprimere i risultati quantitativi nelle Unità Internazionali (UI) di PVB19 del "3rd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay " (NIBSC, Regno Unito, codice 12/208).

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

Avvertenze e precauzioni generali

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

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

Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.

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

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

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

Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.

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

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

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

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

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 campioni estratti in modo tale da ridurre quanto più possibile la dispersione nell'ambiente per prevenire il rischio di contaminazione.

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

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Componente	Temperatura di conservazione	Utilizzo dalla prima apertura	Cicli di congelamento/scongelamento	Stabilità On board (ELITE InGenius ed ELITE BeGenius)
PVB19 Q PCR Mix	-20 °C o inferiore (protetta dalla luce)	entro un mese	fino a cinque	fino a cinque sessioni indipendenti* da tre ore ciascuna oppure fino a 7 ore consecutive (2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna più il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro)

*con congelamento intermedio

CAMPIONI E CONTROLLI per ELITE InGenius ed ELITE BeGenius

Campioni

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

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto e conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
Sangue intero	EDTA	≤ 24 ore	≤ 3 giorni	≤ 30 giorni	≤ 30 giorni
Liquido amniotico	Senza conservanti	≤ 4 ore	≤ 4 ore	≤ 30 giorni	≤ 30 giorni

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

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

Assay Protocols per Parvovirus B19 ELITE MGB Kit					
Campione	Strumento	Trasferimento del campione	Nome Assay Protocol	Report	Caratteristiche
Sangue intero	ELITE InGenius	Non richiesto	PVB19 ELITE_WB_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume 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	Non richiesto	PVB19 ELITE_Be_WB_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume 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
Liquido amniotico	ELITE InGenius	richiesto, in Extraction tube	PVB19 ELITE_AF_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume 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	richiesto, in provetta Sarstedt da 2 mL	PVB19 ELITE_Be_AF_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume 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

Quando richiesto, 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 riportate nella sezione "Avvertenze e precauzioni".

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

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

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

Calibratori e Controlli di PCR

Prima di analizzare ogni campione, è obbligatorio generare e approvare la curva di calibrazione per ogni lotto di reagente di PCR:

- come Curva di Calibrazione, utilizzare il prodotto **Parvovirus B19 ELITE Standard** (non fornito in questo kit), in associazione con gli Assay Protocols **PVB19 ELITE_STD** o **PVB19 ELITE_Be_STD**.

Nota: le concentrazioni del prodotto Q – PCR Standard sono espresse in copie/ reazione (10⁵ copie / rxn, 10⁴ copie / rxn, 10³ copie / rxn, 10² copie /rxn).

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

- come Controllo Positivo di PCR, utilizzare il prodotto **Parvovirus B19 - ELITE Positive Control** (non fornito in questo kit), in associazione con gli Assay Protocols **PVB19 ELITE_PC** o **PVB19 ELITE_Be_PC**.

- come Controllo Negativo di PCR, utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita in questo kit) in associazione con gli Assay Protocols **PVB19 ELITE_NC** o **PVB19 ELITE_Be_NC**.

Nota: ELITE InGenius ed **ELITE BeGenius** richiedono la generazione e l'approvazione della curva di calibrazione e risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di PCR. Le curve di calibrazione scadono dopo **60 giorni** e la validazione dei risultati dei controlli di PCR, approvati e memorizzati nel database scade dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente la curva di calibrazione e l'analisi dei controlli positivi e negativi.

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

- quando si utilizza un nuovo lotto di reagenti di PCR,
- quando i risultati delle analisi di controllo qualità (vedi paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche,
- quando **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius** deve essere sottoposto ad un intervento di manutenzione principale.

Controlli di qualità

Si consiglia la verifica programmata della procedura di estrazione e amplificazione. Si possono utilizzare campioni testati o materiale di riferimento certificato. Quando disponibili, utilizzare i controlli esterni in conformità a leggi locali, statali, organizzazioni di accreditamento federali.

PROCEDURA ELITE InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **Parvovirus B19 ELITE MGB Kit** con **ELITE InGenius** si articola in tre fasi:

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	A) Validazione della curva di calibrazione B) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo C) Validazione dei risultati dei campioni D) Refertazione dei risultati dei campioni

FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITE InGenius** e selezionare la modalità **"CLOSED"**;
- nella sezione "Calibration" della schermata Home, verificare che i calibratori (**PVB19 Q Q-PCR Standard**) siano processati, approvati e validi (Status) per il lotto di **PVB19 Q PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili calibratori validi, eseguire la sessione dei calibratori come descritto di seguito,
- nella sezione "Controls" della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**PVB19 Q Positive Control**, **PVB19 Q Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **PVB19 Q PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito, selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo "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.

FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **Parvovirus B19 ELITE MGB Kit** può essere utilizzato con **ELITE InGenius** per eseguire:

- 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)

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

Nota: 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:

Scongellare le provette necessarie di **PVB19 Q - PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

Nota: La miscela **PCR Mix** è fotosensibile per cui non va esposta alla luce diretta.

Per l'impostazione dei quattro tipi di sessione procedere con i seguenti passaggi seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI).

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Quando richiesto, trasferire 200 µL di campione in un Extraction tube precedentemente etichettato. Scongellare le provette necessarie di controllo interno CPE a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 12 reazioni.	Scongellare a temperatura ambiente gli Elution tube con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.
2	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" .	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" .
3	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL.
4	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
5	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").
6	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" selezionare "PCR Only".
7	Selezionare "Primary tube" o "Extraction tube" nella colonna "Sample Position". Verificare che il "Dilution factor" sia "1".	Nella colonna "Sample Position" selezionare "Elution Tube" (bottom row) come posizione in cui caricare il campione. Verificare che il "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" selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi	Caricare la PCR Mix nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i Tip Rack .	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i Tip Rack .
12	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
13	Caricare le PCR cassette , le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200", tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre.	Caricare le PCR cassette e gli Elution tube con i campioni da analizzare.
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	Scongellare le provette di Q-PCR Standard (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. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongellare le provette di Controllo Positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo Preparare il Controllo Negativo trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un Elution tube, fornito con il prodotto ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" .	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" .
3	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL
4	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli") e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del Q-PCR Standard.	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli") e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del Positive Control e dell'acqua per biologia molecolare.
5	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "PCR Only".	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "PCR Only".
6	Verificare nella colonna "Sample Position" che la posizione sia "Elution Tube".	Verificare nella colonna "Sample Position" che la posizione sia "Elution Tube".
7	Caricare la PCR Mix nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.	Caricare la PCR Mix nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
8	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i Tip Rack .	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i Tip Rack .
10	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
11	Caricare le PCR cassette e le provette per il Q-PCR Standard	Caricare le PCR cassette e le provette per il Controllo Positivo ed il Controllo Negativo.
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".

Dopo il completamento della procedura, **ELiTe InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota: Alla fine della corsa prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a -20 ±10 °C al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota: Alla fine della corsa la **PCR Mix** può essere rimossa dallo strumento, tappata e conservata a -20 °C o temperatura inferiore, o può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 7 ore (2 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna e il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro), mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

Nota: Alla fine della corsa prelevare dallo strumento le provette di **Q - PCR Standard**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Q - PCR Standards.

Nota: Gli **PVB19 Q-PCR Standard** possono essere utilizzati per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 2 ore ciascuna.

Nota: Alla fine della corsa prelevare dallo strumento le provette di **Controllo Positivo**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Controllo Positivo. Smaltire le provette di **Controllo Negativo**.

Nota: Il **PVB19 Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

Nota: Alla fine della corsa rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

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 curve di PCR e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

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

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

ELiTe InGenius genera i risultati del prodotto **Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

- Validazione della Curva di Calibrazione,
- Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
- Validazione dei risultati dei campioni,
- Refertazione dei risultati dei campioni.

A. Validazione della Curva di Calibrazione

L' **ELiTe InGenius software** interpreta i risultati di PCR per il target dei calibratori con i parametri inclusi nell' Assay Protocol **PVB19 ELiTe_STD**. Il Ct risultante rispetto alla concentrazione genera la curva di calibrazione.

Le curve di calibrazione, specifiche per il lotto di reagente di PCR, vengono registrate nel database (Calibration). Esse possono essere consultate e approvate da personale avente 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" si visualizza il messaggio "Failed" che ne impedisce l'approvazione. Le reazioni di amplificazione del calibratore devono essere ripetute. Se la curva di calibrazione viene processata insieme ai campioni da testare e il risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

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

Il **software ELiTe InGenius** interpreta i risultati di PCR dei target del Controllo Positivo e del Controllo Negativo con i parametri inclusi negli Assay Protocol **PVB19 ELiTe_PC** e **PVB19 ELiTe_NC**. I valori di Ct e Tm ottenuti sono utilizzati per validare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati del **Controllo Positivo** e **Controllo Negativo**, specifici per il lotto del reagente di 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**. I risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo vengono utilizzati dal **software ELiTe InGenius** per impostare i grafici di controllo che monitorano le prestazioni delle fasi di amplificazione. Per maggiori dettagli, consultare il manuale dello strumento

Nota: Se il risultato della reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Controls" appare il messaggio "Failed" che ne impedisce l'approvazione. In tal caso, ripetere la reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo.

Nota: Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo sono amplificati insieme ai campioni da analizzare e il risultato non è valido, i campioni possono essere approvati, ma i risultati non sono validati. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

C. Validazione dei risultati dei campioni

Il software **ELITE InGenius** interpreta i risultati di amplificazione dei target (canale **PVB19**) e del controllo interno (canale **IC**) con i parametri inclusi negli Assay Protocol **PVB19 ELITE_WB_200_100** e **PVB19 ELITE_AF_200_100 A**. I valori dei Ct ottenuti sono convertiti in valori di concentrazione.

I risultati vengono mostrati nella schermata "Results Display".

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

1) Curva di calibrazione	Stato
PVB19 Q-PCR Standard	APPROVATO
2) Controllo Positivo	Stato
PVB19 Positive Control	APPROVATO
3) Controllo Negativo	Stato
PVB19 Negative Control	APPROVATO

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

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

Per ogni campione il sistema riporta una combinazione dei seguenti messaggi specificando se i DNA dei patogeni è stato rilevato o non rilevato.

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
PVB19: DNA rilevato, quantità pari a "XXX" copie /mL o UI/mL	Il DNA di PVB19 è stato rilevato nel campione nell'intervallo di misurazione del saggio, nella quantità mostrata.
PVB19: DNA rilevato, quantità inferiore a "LLOQ" copie/mL o UI/mL	Il DNA di PVB19 è stato rilevato nel campione al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLOQ) del saggio
PVB19: DNA rilevato, quantità oltre "ULOQ" copie/mL o UI/mL	Il DNA di PVB19 è stato rilevato nel campione oltre il limite superiore di quantificazione (ULOQ) del saggio.
PVB19: DNA non rilevato o inferiore a "LoD" copie/mL o UI/mL	Il DNA di PVB19 non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per il DNA di PVB19 oppure la sua concentrazione è inferiore al Limite di Rilevazione (LoD) del saggio.
Non Valido-Ripeti test sul campione.	Risultato del saggio non valido per un errore del controllo interno (estrazione errata, presenza di un inibitore o errore di campionamento). Il test deve essere ripetuto.

Campioni che riportano il risultato "Non Valido-Ripeti test sul campione": in questo caso il DNA del Controllo Interno non è stato rilevato in maniera efficace per problemi nella fase di campionamento, estrazione o amplificazione (e.g. errato campionamento, degradazione o perdita di DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono generare risultati errati.

Quando il volume è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato, tal quale oppure diluito, mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only".

In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota in modalità "Extract + PCR" (vedi "Risoluzione dei problemi").

I campioni segnalati come "PVB19:DNA non rilevato o inferiore a "LoD" copie/mL sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA di PVB19. In tal caso non si può escludere che il DNA di PVB19 sia presente ad una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedi "Caratteristiche delle Prestazioni").

I campioni positivi per il DNA di PVB19 ad una concentrazione inferiore al limite di rilevazione, quando sono rilevati dal saggio, sono identificati nel report come "PVB19: DNA rilevato, quantità inferiore a LLOQ" (vedi "Caratteristiche delle Prestazioni").

I campioni positivi per il DNA di PVB19 ad una concentrazione all'interno del Range di misurazione lineare sono identificati nel report come "PVB19: DNA rilevato, quantità pari a "XXX" copie/mL" (vedi "Caratteristiche delle Prestazioni").

I campioni positivi per il DNA di PVB19 ad una concentrazione oltre il limite superiore di quantificazione (ULOQ) del saggio sono identificati nel report come "PVB19: DNA rilevato, quantità oltre "ULOQ" copie/mL" e non sono validi ai fini della quantificazione (vedi "Caratteristiche delle prestazioni"). Se necessario, il campione può essere diluito prima dell'estrazione o la PCR e ritestato al fine di ottenere risultati all'interno del range 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 riguardanti il paziente.

I risultati della sessione analitica 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".

D. Refertazione dei risultati dei campioni

I risultati della sessione analitica sono memorizzati nel database e possono essere visualizzati o esportati sotto forma di "Sample Report" e "Track Report".

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

Il "Track Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per track selezionato.

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

PROCEDURA ELITE BeGenius

La procedura di utilizzo del prodotto **Parvovirus B19 ELITE MGB Kit** con **ELITE BeGenius** si articola in tre fasi:

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	A) Validazione della curva di calibrazione
		B) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		C) Validazione dei risultati dei campioni
		D) Refertazione dei risultati dei campioni

FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITE BeGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**",
- nella sezione "Calibration" della schermata Home, verificare che i calibratori (**PVB19 Q - PCR Standard**) siano approvati e validi (Status) per il lotto di **PVB19 PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili calibratori validi, eseguire la sessione dei calibratori come descritto di seguito,
- nella sezione "Controls" della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**PVB19 Positive Control**, **PVB19 Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **PVB19 PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito,
- selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo "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.

FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **PVB19 ELITE MGB Kit** può essere utilizzato con il sistema **ELITE BeGenius** per eseguire:

- 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).

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

Nota: **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:

- Scongela le provette necessarie di **PVB19 PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

Nota: La miscela **PCR Mix** è fotosensibile per cui non va esposta alla luce diretta

Per l'impostazione dei quattro tipi di sessione procedere con i seguenti passaggi seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI).

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Quando richiesto, trasferire 200 µL di campione in un Tubo Sarstedt da 2 mL (non fornito) precedentemente etichettato. Scongela le provette necessarie di controllo interno CPE a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 12 reazioni.	Scongela a temperatura ambiente gli "Elution tube" con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.
2	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" .	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" .
3	Rimuovere tutti i Racks dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i Racks dalla "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 utilizzano tubi secondari "2 mL Tube" utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack")	Caricare gli eluati dei campioni estratti nell'" Elution Rack ".
6	Inserire il "Sample Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 5" (L5). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse inserire il "SampleID" (SID). (Se si utilizzano tubi secondari, selezionare "2 mL Tube". Se il tubo secondario non ha etichetta o barcode, digitare manualmente il SID).	Inserire l'" Elution Rack " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol".
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
9	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Quando devono essere analizzati più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.	Quando devono essere analizzati più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.
12	Caricare gli "Elution tube" nell'" Elution Rack ".	Non applicabile
13	Inserire l'" Elution Rack " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). In caso di un numero di campioni maggiore di 12, ripetere usando "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", "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).	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", "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).
17	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
18	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i "Tip Rack" .	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i "Tip Rack" .
19	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
20	Caricare il "PCR Rack" con le "PCR Cassette" nell'Inventory Area.	Caricare il "PCR Rack" con le "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 consumabili 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	Scongellare le provette di Q-PCR Standard (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. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongellare le provette di Controllo Positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Preparare il Controllo Negativo trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito con il prodotto ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".
3	Rimuovere i Racks dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i Racks dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli 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 di Controllo Negativo nell' "Elution Rack".
6	Inserire l' " Elution Rack " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol..".	Inserire l' " Elution Rack " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol..".
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l' "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l' "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
9	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.
10	Click "Next" to continue.	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 seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2). Se necessario, per ogni PCR Mix inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).
13	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
14	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i " Tip Rack ".	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i " Tip Rack ".
15	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
16	Caricare il " PCR Rack " con le " PCR Cassette " nell' Inventory Area.	Caricare il " PCR Rack " con le " 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".

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

Nota: Alla fine della corsa prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a -20 ±10 °C al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota: Alla fine della corsa la **PCR Mix** può essere rimossa dallo strumento, tappata e conservata a -20 °C o temperatura inferiore, o può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 7 ore (2 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna e il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro); mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

Nota: Alla fine della corsa prelevare dallo strumento le provette di **Q - PCR Standard**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Q - PCR Standards.

Nota: il **PVB19 Q-PCR Standard** possono essere utilizzati per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 2 ore ciascuna.

Nota: Alla fine della corsa prelevare dallo strumento le provette di **Controllo Positivo**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Controllo Positivo. Smaltire le provette di **Controllo Negativo**.

Nota: il **PVB19 Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

Nota: Alla fine della corsa rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

FASE 3 – Esame ed approvazione dei risultati

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 curve di PCR e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

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

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

ELiTe BeGenius genera i risultati del prodotto **Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

- Validazione della Curva di Calibrazione
- Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
- Validazione dei risultati dei campioni,
- Refertazione dei risultati dei campioni.

Nota: Per i dettagli fare riferimento agli stessi paragrafi della "Procedura" dello strumento **ELiTe InGenius**.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con ELiTe InGenius ed ELiTe BeGenius

Sensibilità analitica: limite di rilevazione (LoD)

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

La sensibilità analitica del saggio è stata testata con **ELiTe InGenius**, utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 20 µL in presenza di DNA genomico umano ad un titolo di 500 ng / 20 µL. I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

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

Sangue intero raccolto in EDTA

Il valore di LoD teorico è stato verificato testando con **ELiTe InGenius** e **ELiTe BeGenius** un pool di campioni di sangue intero raccolti in EDTA positivamente con materiale di riferimento di Parvovirus B19 (3rd WHO International Standard, NIBSC) alla concentrazione teorica (125 UI/mL).

I risultati finali sono riassunti nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione per sangue intero con ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius					
Campione	LoD	N	Valido	Positivo	Negativo
Sangue intero raccolto in EDTA	125 UI/mL	20	20	20	0
	250 copie/mL				

Il valore di LoD per il target Parvovirus B19 (PVB19) con sangue intero raccolto in EDTA è stato confermato sia su **ELiTe InGenius** che su **ELiTe BeGenius**. Il valore di LoD per il target PVB19 con sangue intero è stato confermato a 125 UI/mL, corrispondenti a 250 copie/mL.

Il valore in copie/mL è stato calcolato applicando il Fattore di Conversione specifico riportato nel paragrafo “Sensibilità analitica”.

Liquido Amniotico:

Il valore di LoD del saggio con liquido amniotico è stato determinato in associazione a ELITE InGenius, utilizzando un pannello di diluizioni di liquido amniotico negativo per PVB19 e positivizzato con materiale di riferimento di PVB19 (3rd WHO International Standard, NIBSC). L'analisi di regressione Probit dei dati è stata eseguita sui risultati ottenuti e il valore di LoD è stato stimato come la concentrazione alla quale il campione ha una probabilità del 95% di risultare positivo.

I risultati finali sono riportati nella tabella sotto.

Limite di rilevazione con campioni di liquido amniotico e ELITE InGenius (UI/mL)			
PVB19	40 UI/mL 40 copie/mL	Intervallo di confidenza 95%	
		Valore inferiore	Valore superiore
		35 UI/mL 35 copie/mL	50 UI/mL 50 copie/mL

Il valore di LoD in copie/mL è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico (1 IU/copie) riportato nel paragrafo “Sensibilità analitica”.

Il valore di LoD calcolato è stato verificato testando con ELITE BeGenius e ELITE InGenius campioni di liquido amniotico positivizzati con materiale di riferimento di PVB19 (3rd WHO International Standard, NIBSC).

I risultati ottenuti hanno confermato i valori di LoD dichiarati per Parvovirus B19 sia su ELITE BeGenius che su ELITE InGenius.

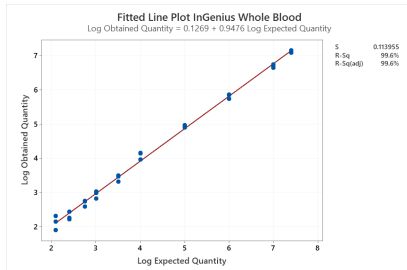
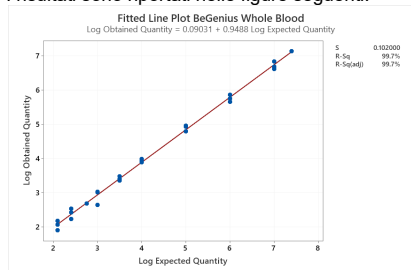
Sensibilità analitica: intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare del saggio è stato verificato nei campioni di sangue intero e liquido amniotico sia sul sistema ELITE InGenius che su ELITE BeGenius.

Sangue intero raccolto in EDTA

L'intervallo di misurazione lineare è stato verificato, utilizzando un pannello di diluizioni di PVB19 (3rd WHO International Standard, NIBSC) in campioni negativi di Sangue intero.

I risultati sono riportati nelle figure seguenti.



I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

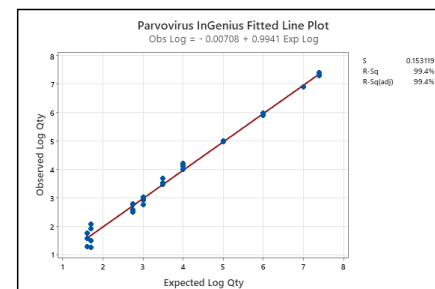
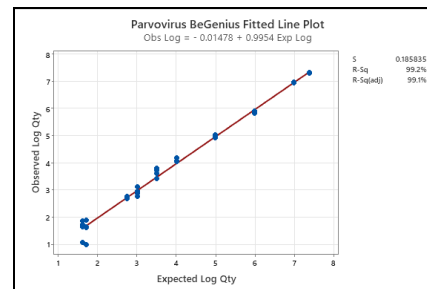
Intervallo di misurazione lineare con campioni di sangue intero e ELITE InGenius e ELITE BeGenius		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
UI/mL	125	25.000.000
copies/mL	250	50.000.000

L'intervallo di misurazione lineare in copie/mL per la matrice di sangue intero raccolto in EDTA è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico riportato nella sezione successiva.

Liquido Amniotico

L'intervallo di misurazione lineare è stato verificato, utilizzando un pannello di diluizioni di PVB19 (3rd WHO International Standard, NIBSC) in campioni negativi di liquido amniotico.

I risultati sono riportati nelle figure seguenti.



I risultati finali per sono riportati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare con campioni di liquido amniotico, ELITE InGenius e ELITE BeGenius		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
UI/mL	40	25.000.000
copies/mL	40	25.000.000

L'intervallo di misurazione lineare in copie/mL per la matrice di liquido amniotico è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico riportato nella sezione successiva.

Ripetibilità

La ripetibilità Intra e Inter – Sessione del saggio è stata valutata su ELITE BeGenius ed ELITE InGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA, includendo un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento di PVB19 (3st WHO International Standard, NIBSC).

Un esempio dei risultati di ripetibilità Intra-Sessione (su un giorno) è riportato nella tabella seguente.

Ripetibilità Intra – Sessione ELITE InGenius					
Campione	PVB19				
	N.	Ct media	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	8	35.81	0.52	1.46	100%
10 x LoD	8	34.31	0.28	0.83	100%

Ripetibilità Intra – Sessione ELITE BeGenius					
Campione	PVB19				
	N.	Ct media	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	8	36.53	0.53	1.46	100%
10 x LoD	8	34.79	0.21	0.61	100%

Un esempio dei risultati di ripetibilità Inter-Sessione (su due giorni) è riportato nella tabella seguente.

Ripetibilità Inter – Sessione ELITE InGenius					
Campione	PVB19				
	N.	Ct media	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	16	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	16	35.87	0.44	1.23	100%
10 x LoD	16	34.19	0.28	0.83	100%

Ripetibilità Inter – Sessione ELITE BeGenius					
Campione	PVB19				
	N.	Ct media	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	16	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	16	36.40	0.45	1.23	100%
10 x LoD	16	34.68	0.27	0.79	100%

Nel test di ripetibilità, Parvovirus B19 ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima di valori di Ct come %CV uguale a 1.46%.

Riproducibilità

La Riproducibilità Inter-Strumento e Inter-Lotto del saggio è stata valutata su ELITE BeGenius ed ELITE InGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA, includendo un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento di PVB19 (3st WHO International Standard, NIBSC).

Un esempio dei risultati di Riproducibilità Inter-Strumento è riportato nella tabella seguente.

Riproducibilità Inter – Strumento ELITE InGenius					
Campione	PVB19				
	N.	Ct media	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	8	36.89	0.62	1.68	100%
10 x LoD	8	34.85	0.26	0.74	100%

Riproducibilità Inter – Strumento ELITE BeGenius					
Campione	PVB19				
	N.	Ct media	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	8	37.00	0.37	1.00	100%
10 x LoD	8	35.14	0.51	1.46	100%

Un esempio dei risultati di Riproducibilità Inter-Lotto è riportato nella tabella seguente.

Riproducibilità Inter – Lotto ELITE InGenius					
Campione	PVB19				
	N.	Ct media	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	8	36.80	0.67	1.82	100%
10 x LoD	8	35.18	0.71	2.02	100%

Inter – Lotto Reproducibility ELITE BeGenius					
Campione	PVB19				
	N.	Ct media	DS	% CV	% Concordanza
Negativo	8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	8	37.41	0.27	0.72	100%
10 x LoD	8	35.31	0.32	0.90	100%

Nel test di riproducibilità, Parvovirus B19 ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima di valori di Ct come %CV uguale a 2.02%.

Sensibilità analitica: riproducibilità con pannello di materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica, intesa come riproducibilità dei valori del materiale di riferimento calibrato, è stata valutata usando il pannello QCMD 2014 B19 Virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Regno Unito), un pannello di diluizioni di PVB19. Ciascun campione del pannello è stato testato in 2 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con ELITE InGenius e i prodotti PVB19 ELITechGroup S.p.A.

I risultati in UI/mL sono stati determinati applicando il fattore di conversione ($F_c = 0.3 \text{ UI/copia}$) per ELITE InGenius e plasma e sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e ELITE InGenius®				
Campione	Conc. virale Consensus Log ₁₀ UI/mL	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ UI/mL
B19DNA14-01	4,788	0,507	2/2	4,948
B19DNA14-02	2,878	0,437	2/2	2,902
B19DNA14-03	4,848	0,400	2/2	4,850
B19DNA14-04	negativo	NA	0/2	NA
B19DNA14-05	5,802	0,465	2/2	5,847
B19DNA14-06	1,936	0,672	2/2	1,779
B19DNA14-07	3,913	0,371	2/2	3,955
B19DNA14-08	3,844	0,507	2/2	4,063

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente. Nell'analisi quantitativa, tutti i campioni positivi sono stati correttamente quantificati entro l'intervallo definito dal Consensus ± 1 Deviazione Standard (SD).

Fattore di conversione alle Unità Internazionali

Il fattore di conversione (F_c) per trasformare il risultato quantitativo da copie/mL in Unità Internazionali / mL, è stato calcolato su ELITE InGenius utilizzando materiale di riferimento di PVB19 (NIBSC).

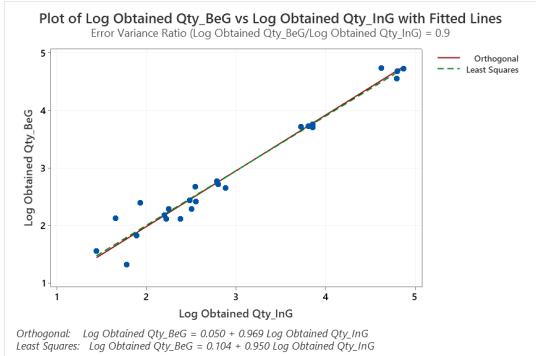
Sangue intero raccolto in EDTA

Il fattore di conversione è stato determinato a 0.5 UI/copia, utilizzando un pannello di diluizioni di materiale di riferimento di PVB19 calibrato (2nd WHO International Standard, NIBSC) in campioni negativi di sangue intero raccolto in EDTA.

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Fattore di Conversione in Unità Internazionali, $F_c = 0.5 \text{ UI/copia}$						
Campione			Risultati			Delta Log (ref. - test)
UI/mL	Log UI/mL	N	Media copie/mL	Media UI/mL	Media Log UI/mL	
100,000	5.0000	10	21,4661	107,331	5.0210	-0.0210
10,000	4.0000	10	21,433	10,716	4.0080	-0.0080
1,000	3.0000	10	2,136	1,068	2.9850	+0.0150

Il Fattore di Conversione è stato verificato sia su ELITE InGenius che su ELITE BeGenius, utilizzando materiale di riferimento di PVB19 calibrato ("3rd WHO International Standard", NIBSC), con un intervallo compreso tra 5.0000 Log UI/mL e 2.0970 Log UI/mL. I risultati ottenuti sono stati analizzati tramite regressione ortogonale e lineare al fine di valutarne la correlazione.



L'analisi della regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a 0.050 (95% CI: - 0.197; 0.296) e una pendenza pari a 0.969 (95% CI: 0.889; 1.048). L'analisi di regressione lineare ha generato un R² di 0.963.

Liquido amniotico

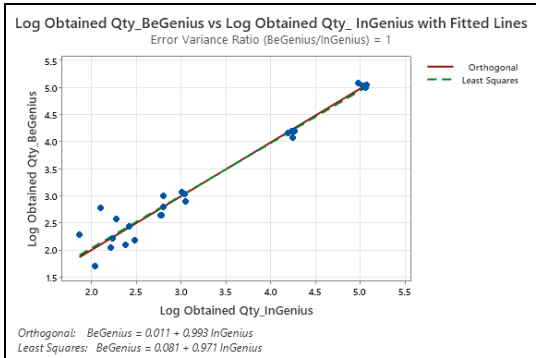
Il fattore di conversione (Fc) è stato determinato a 1 UI/copia, utilizzando un pannello di diluizioni di materiale di riferimento di PVB19 calibrato (3rd WHO International Standard, NIBSC) in campioni negativi di liquido amniotico.

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Fattore di Conversione in Unità Internazionali, Fc = 1 UI/copia						
Campione			Risultati			Delta Log (ref. - test)
UI/mL	Log UI/mL	N	Media copia/mL	Media UI/mL	Media Log UI/mL	
316,228	5.5000	16	273,604	273,604	5.4360	0.0640
100,000	5.0000	16	88,997	88,997	4.9470	0.0530
31,623	4.5000	16	34,559	34,559	4.5340	-0.0340
10,000	4.0000	16	11,089	11,089	4.0390	-0.0390
3,162	3.5000	15*	3,704	3,704	3.5580	-0.0580
1,000	3.0000	16	932	932	2.9520	0.0480

*Un campione è stato escluso dall'analisi perchè outlier.

Il Fattore di Conversione è stato verificato sia su ELITE InGenius che su ELITE BeGenius, utilizzando materiale di riferimento di PVB19 calibrato (3rd WHO International Standard, NIBSC), con un intervallo compreso tra 5.0000 Log UI/mL e 2.0970 Log UI/mL. I risultati ottenuti sono stati analizzati tramite regressione ortogonale e lineare al fine di valutarne la correlazione.



L'analisi della regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a 0.0112 (95% CI: 0.2879; 0.3103) e una pendenza pari a 0.9928 (95% CI: 0.9046; 1.0810). L'analisi di regressione lineare ha generato un R² di 0.957.

I risultati per ogni matrice sono indicati nella tabella seguente.

Fattore di conversione alle Unità Internazionali su ELITE InGenius e ELITE BeGenius	
Matrix	Fc (UI/copia)
Sangue Intero	0.5
Liquido Amniotico	1.0

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata utilizzando campioni clinici di sangue intero raccolto in EDTA e liquido amniotico positivi per il DNA di PVB19 in associazione a ELITE InGenius.

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

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi	% Sensibilità Diagnostica
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di PVB19	30	30	0	100
Liquido Amniotico positivizzato per il DNA di PVB19	30	30	0	100

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni clinici di sangue intero raccolto in EDTA e liquido amniotico negativi per il DNA di PVB19.

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

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi	% Specificità Diagnostica
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di PVB19	30	0	30	100
Liquido Amniotico negativo per il DNA di PVB19	30	0	30	100

Il valore di Ct cut-off del controllo interno è impostato a 35 per le matrici sangue intero EDTA e Liquido Amniotico quando testate in associazione a ELITE InGenius e ELITE BeGenius.

CAMPIONI E CONTROLLI PER ALTRI
STRUMENTI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con il **DNA estratto** dai seguenti campioni clinici: sangue intero (periferico e midollare) raccolto in EDTA, plasma raccolto in EDTA.

Sangue intero raccolto in EDTA

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

Nota: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con **ELITE STAR**, con **versione di software 3.4.13** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **UUNI_E100_S200_ELI** che utilizza 200 µL di campione e eluisce l'estratto in 100 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su «**ELITE STAR**». Un volume minimo di 700 µL è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **200 µL di CPE** nei tubi di Proteinase-Carrier come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

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

Plasma raccolto in EDTA

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

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

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con **ELITE STAR**, con **versione di software 3.4.13** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **UUNI_E100_S200_ELI** che utilizza 200 µL di campione ed eluisce l'estratto in 100 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su «**ELITE STAR**». Un volume minimo di 700 µL è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **200 µL di CPE** nei tubi di Proteinase-Carrier come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

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

Nota: Quando si esegue l'estrazione del DNA da plasma con lo strumento «**NucliSENS® easyMAG®**» utilizzare il protocollo di estrazione **Generic 2.0.1** e seguire queste indicazioni: dispensare **500 µL** di campione nella Strip da 8 pozzetti, aggiungere **5 µL di CPE** per il controllo interno prima di aggiungere la **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**, recuperare il DNA con **100 µL** di tampone di eluizione.

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

Altri campioni

Non sono disponibili dati sulle prestazioni del prodotto con DNA estratto da campioni clinici di liquido amniotico, sospensioni di leucociti o sospensioni di granulociti.

Sostanze interferenti

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

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

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

Controlli di amplificazione

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

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

Per il controllo positivo utilizzare il prodotto «**Parvovirus B19 - ELITE Positive Control**» oppure il prodotto «**Parvovirus B19 ELITE Standard**».

Controlli di qualità

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

PROCEDURA ALTRI STRUMENTI

Impostazione della sessione di amplificazione real time

(Da eseguire nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione)

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

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:

- accendere il thermal cycler per real time, accendere il computer di controllo, avviare il software dedicato e aprire una sessione "absolute quantification";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per PVB19 con il "reporter" = "FAM" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "PVB19";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per il controllo interno con il "reporter" = "VIC" (AP525 è equivalente al VIC) e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "CI";
- per ciascun pozzetto in uso della micropiastra, impostare (Well Inspector) i "detector" (tipo di fluorescenza da misurare), il "passive reference" = "ROX" (AP593 è usato invece del ROX, normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campione, controllo negativo di amplificazione, controllo positivo di amplificazione o standard con la relativa quantità nota). Compilare il **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale di istruzioni per l'uso trascrivendo queste informazioni oppure stampare l'organizzazione della micropiastra. Il **Piano di lavoro** dovrà essere seguito con attenzione durante il trasferimento nei pozzetti della miscela di reazione e dei campioni.

Allestimento dell'amplificazione

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

Prima di iniziare la sessione è necessario:

- prelevare e scongelare le provette con i campioni da analizzare. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare le provette di **PVB19 Q - PCR Mix** necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **25 reazioni**. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare la provetta di **PVB19 - Positive Control** o le provette di **PVB19 Q - PCR Standard**. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare l'**Amplification microplate** (micropiastra di amplificazione) che sarà utilizzata nella sessione facendo attenzione a maneggiarla con guanti senza polvere e a non danneggiare i pozzetti.
- prelevare l'**Amplification Sealing Sheet** che sarà utilizzato nella sessione facendo attenzione a maneggiarlo con guanti senza polvere e a non danneggiarlo.

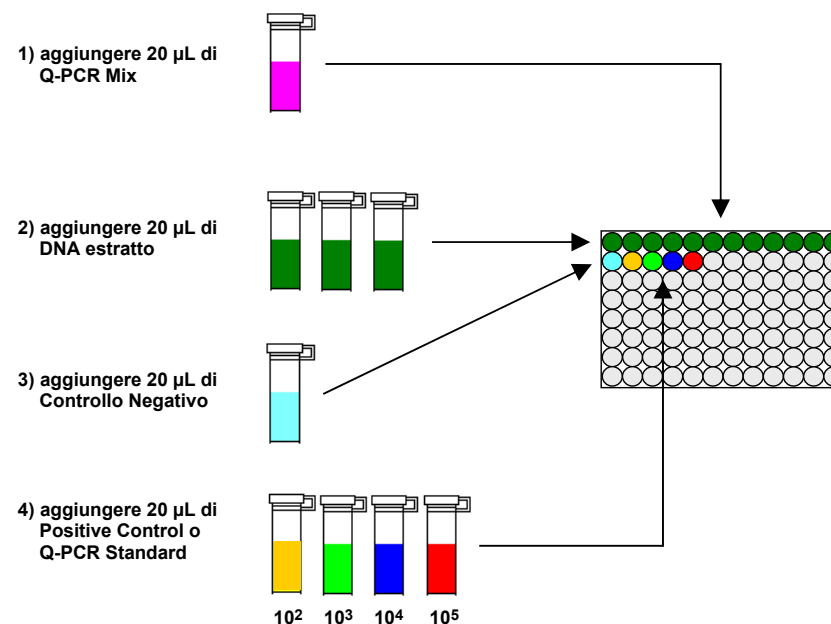
1. Trasferire, depositandoli accuratamente sul fondo senza creare bolle, **20 µL** di miscela di reazione **PVB19 Q - PCR Mix** nei pozzetti dell'**Amplification microplate** (micropiastra di amplificazione) come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**.

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

2. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **DNA estratto** del primo campione nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il campione pipettando per tre volte il **DNA estratto** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con tutti gli altri **DNA estratti**.
3. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **Acqua ultrapura per biologia molecolare** (non fornita nel prodotto) nel pozzetto dell'**Amplification microplate** del controllo negativo di amplificazione come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo negativo pipettando per tre volte l'**Acqua ultrapura per biologia molecolare** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.
4. In base al tipo di risultato richiesto (qualitativo o quantitativo), seguire una delle due opzioni:
 - Quando è richiesto un risultato qualitativo dell'analisi (rilevazione del DNA di PVB19): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **PVB19 - Positive Control** nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo positivo pipettando per tre volte il **PVB19 - Positive Control** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.
 - Quando è richiesto un risultato **quantitativo** dell'analisi (quantificazione del DNA di PVB19): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **PVB19 Q - PCR Standard 10²** nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene lo standard pipettando per tre volte il **PVB19 Q - PCR Standard 10²** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con i **PVB19 Q - PCR Standard 10³, 10⁴, 10⁵**.
5. Sigillare accuratamente l'**Amplification microplate** con l'**Amplification Sealing Sheet**.
6. Trasferire l'**Amplification microplate** nel thermal - cycler per real time nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione ed avviare il ciclo termico di amplificazione salvando l'impostazione della sessione con un identificativo univoco e riconoscibile (per es. "anno-mese-giorno-PVB19-EGSpA").

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

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



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

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

Analisi qualitativa dei risultati

I valori registrati della fluorescenza emessa dalla sonda specifica per PVB19 (detector FAM "PVB19") e dalla sonda specifica per il Controllo Interno (detector VIC "CI") nelle reazioni di amplificazione devono essere analizzati dal software dello strumento.

Prima di eseguire l'analisi, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:

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

Nota: Nel caso di un campione positivo ad alto titolo di PVB19, la fluorescenza FAM della sonda specifica per PVB19 può cominciare a crescere prima del ciclo 15. In questo caso l'intervallo di calcolo del **Livello di fluorescenza di fondo** deve essere adattato dal ciclo 6 al ciclo in cui la fluorescenza FAM comincia a crescere come rilevato dal software dello strumento (Results > Component).

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

- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector FAM "PVB19" a **0,1**;
- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector VIC "CI" a **0,05**.

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

- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector FAM "PVB19" a **0,2**;
- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector VIC "CI" a **0,1**.

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

Nella reazione di amplificazione con il Positive Control*, il valore del Ct per PVB19 (Results > Report) è utilizzato per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione Positive Control detector FAM "PVB19"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Positive Control** è **Ct > 25** o **Ct Non determinato (Undetermined)** per PVB19, non è stata rilevata in modo corretto la presenza di DNA bersaglio. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (dispensazione errata della miscela di reazione o del controllo positivo, degradazione della miscela di reazione o del controllo positivo, impostazione errata della posizione del controllo positivo, impostazione errata del ciclo termico) che possono causare risultati non corretti. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

***Nota:** Quando questo prodotto è utilizzato per la quantificazione del DNA di PVB19, al posto della reazione con il **Positive Control** è stata allestita la serie di reazioni con i **Q - PCR Standard**. In questo caso per convalidare l'amplificazione e la rilevazione si deve fare riferimento alla reazione di amplificazione del **Q - PCR Standard 10⁵ (Ct ≤ 25)**.

Nella reazione di amplificazione del **Controllo negativo**, il valore di **Ct** per PVB19 (Results > Report) è utilizzato per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione Controllo negativo detector FAM "PVB19"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct Non determinato	NEGATIVO	CORRETTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Controllo negativo** è diverso da **Ct Non determinato (Undetermined)** per PVB19, è stata rilevata la presenza di DNA bersaglio. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (contaminazione) che possono causare risultati non corretti e falsi positivi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

Nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione**, il valore di **Ct** per PVB19 è utilizzato per rilevare la presenza di DNA bersaglio, mentre il valore di **Ct** per il Controllo Interno è utilizzato per convalidare l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione.

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

Questo prodotto è in grado di rilevare una quantità minima di 10 copie di DNA della regione VP1 di PVB19 per reazione di amplificazione (limite di rilevazione del prodotto, vedi Caratteristiche delle prestazioni).

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

Reazione del campione		Idoneità del campione	Risultato del saggio	DNA di PVB19
detector FAM "PVB19"	detector VIC "CI"			
Ct Non determinato	Ct > 35 o Ct Non determinato	non idoneo	non valido	-
	Ct ≤ 35	idoneo	valido, negativo	NON RILEVATO
Ct Determinato	Ct > 35 o Ct Non determinato	idoneo	valido, positivo	RILEVATO
	Ct ≤ 35	idoneo	valido, positivo	RILEVATO

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per PVB19 e **Ct > 35** o **Ct Non determinato** per il Controllo Interno, non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA del Controllo Interno. In questo caso si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (amplificazione non efficiente o nulla) o nella fase di estrazione (degradazione del DNA del campione, campione con numero di cellule insufficienti, perdita del DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'estratto) che possono causare risultati errati e falsi negativi. Il campione non è idoneo, il saggio non è valido e deve essere ripetuto a partire dall'estrazione di un nuovo campione.

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per PVB19 e **Ct ≤ 35** per il Controllo Interno, il DNA di PVB19 non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA di PVB19 sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi Caratteristiche delle prestazioni). In questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

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

Nota: Quando nella reazione di amplificazione relativa ad un campione è stata rilevata la presenza di DNA di PVB19, l'amplificazione del Controllo Interno può dare come risultato un Ct > 35 o Ct Non determinato. Infatti la reazione di amplificazione a bassa efficienza del Controllo Interno può essere annullata dalla competizione con la reazione di amplificazione ad alta efficienza di PVB19. In questo caso il campione è comunque idoneo e il risultato positivo del saggio è valido.

Analisi quantitativa dei risultati

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

I valori di **Ct** per PVB19 nelle reazioni di amplificazione dei quattro **Q - PCR standard** sono utilizzati per calcolare la **Curva standard** (Results > Standard Curve) della sessione di amplificazione e per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Curva Standard detector FAM "PVB19"	Intervallo di accettabilità	Amplificazione / Rilevazione
Coefficiente di Correlazione (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRETTA

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

I valori di **Ct** per PVB19 nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione** e la **Curva standard** della sessione di amplificazione sono utilizzati per calcolare la **Quantità (Quantity)** di DNA bersaglio presente nelle reazioni di amplificazione relative ai campioni.

Questo prodotto è in grado di quantificare da 1.000.000 a 10 copie di DNA della regione VP1 di PVB19 per reazione di amplificazione (intervallo di misurazione lineare del prodotto, vedi Caratteristiche delle prestazioni), come descritto nella tabella seguente:

Risultato del campione detector FAM "PVB19"	Copie di PVB19 per reazione
Quantità > 1 x 10⁶	SUPERIORI A 1.000.000
1 x 10¹ ≤ Quantità ≤ 1 x 10⁶	= Quantità
Quantità < 1 x 10¹	INFERIORI A 10

I risultati (**Quantità**) relativi a ciascun **campione** (Results > Report) sono utilizzati per calcolare le copie di PVB19 presenti nel campione di partenza (**Nc**) secondo questa formula:

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

Dove:

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

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

Formula semplificata per sangue intero, plasma e «ELITE STAR»
$Nc \text{ (copie / mL)} = 28 \times Quantità$

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

Formula semplificata per sangue intero, plasma e «ELITE GALAXY»
$Nc \text{ (copie / mL)} = 35 \times Quantità$

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

Formula semplificata per plasma e «NucliSENS® easyMAG®»
$Nc \text{ (copie / mL)} = 10 \times Quantità$

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

Formula semplificata per plasma e «QIASymphony® SP/AS»
$Nc \text{ (copie / mL)} = 12 \times Quantità$

Calcolo dei limiti dell'intervallo di misurazione lineare

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

Limite inferiore (copie / mL) =	$\frac{Ve \times 10 \text{ copie}}{Vc \times Va \times Ep}$
Limite superiore (copie / mL) =	$\frac{Ve \times 1.000.000 \text{ copie}}{Vc \times Va \times Ep}$

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

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (copie / mL) con «ELITE STAR»
Limite inferiore (copie / mL) = $28 \times 10 \text{ copie}$
Limite superiore (copie / mL) = $28 \times 1.000.000 \text{ copie}$
da 280 a 28.000.000 copie / mL

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

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (copie / mL) con «ELITE GALAXY»
Limite inferiore (copie / mL) = $35 \times 10 \text{ copie}$
Limite superiore (copie / mL) = $35 \times 1.000.000 \text{ copie}$
da 350 a 35.000.000 copie / mL

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

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (copie / mL) con «NucliSENS® easyMAG®»
Limite inferiore (copie / mL) = $10 \times 10 \text{ copie}$
Limite superiore (copie / mL) = $10 \times 1.000.000 \text{ copie}$
da 100 a 10.000.000 copie / mL

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

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (copie / mL) con «QIASymphony® SP/AS»
Limite inferiore (copie / mL) = $12 \times 10 \text{ copie}$
Limite superiore (copie / mL) = $12 \times 1.000.000 \text{ copie}$
da 120 a 12.000.000 copie / mL

Calcolo dei risultati in Unità Internazionali

Il fattore di conversione **Fc** citato nelle formule sottostanti è stato calcolato utilizzando il materiale di riferimento calibrato dell'OMS "2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay", NIBSC, Regno Unito, codice 99/802 (vedi Caratteristiche delle prestazioni).

Quando si utilizzano campioni di sangue intero raccolto in EDTA e il sistema di estrazione **«ELITE STAR»** e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e «ELITE STAR»
Fc = 0,98 UI / copia
Nc (UI / mL) = $Nc \text{ (copie / mL)} \times Fc$
Nc (UI / mL) = $27,4 \times Quantità$

Quando si utilizzano campioni di plasma raccolto in EDTA e il sistema di estrazione **«ELITE STAR»** e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per plasma e «ELITE STAR»
Fc = 0,69 UI / copia
Nc (UI / mL) = $Nc \text{ (copie / mL)} \times Fc$
Nc (UI / mL) = $19,3 \times Quantità$

Quando si utilizzano campioni di sangue intero raccolto in EDTA e il sistema di estrazione «**ELITE GALAXY**» e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e « ELITE GALAXY »	
Fc = 0,82 UI / copia	
$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (copie / mL)} \times Fc$	
$Nc \text{ (UI / mL)} = 28,7 \times \text{Quantità}$	

Quando si utilizzano campioni di plasma raccolto in EDTA e il sistema di estrazione «**ELITE GALAXY**» e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per plasma e « ELITE GALAXY »	
Fc = 0,87 UI / copia	
$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (copie / mL)} \times Fc$	
$Nc \text{ (UI / mL)} = 30,5 \times \text{Quantità}$	

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

Formula semplificata per sangue intero e « NucliSENS® easyMAG® »	
Fc = 1 UI / copia	
$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (copie / mL)} \times Fc$	
$Nc \text{ (UI / mL)} = 10 \times \text{Quantità}$	

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

Formula semplificata per plasma e « QIAasymphony® SP/AS »	
Fc = 1 UI / copia	
$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (copie / mL)} \times Fc$	
$Nc \text{ (UI / mL)} = 12 \times \text{Quantità}$	

**CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con
ALTRI STRUMENTI**

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

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

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

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

La sensibilità analitica del saggio è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di Parvovirus B19 entro la concentrazione limite usato in associazione a campioni di sangue intero e **ELITE STAR**. Il pannello è stato preparato diluendo il "2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay" (NIBSC code 99/802, Regno Unito) in sangue intero raccolto in EDTA e negativo per il DNA di Parvovirus B19. Le concentrazioni virali variavano da 3,161 UI / mL a 1000 UI / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in otto replicati per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE STAR** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è il 95%. I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione con campioni di sangue intero e ELITE STAR (UI/mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	293 UI/mL	159 UI/mL	1053 UI/mL

Limite di rilevazione con campioni di sangue intero e ELITE STAR (copie / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	299 copie / mL	162 copie / mL	1074 copie / mL

La sensibilità analitica del saggio è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di Parvovirus B19 entro la concentrazione limite usato in associazione a campioni di plasma e **ELITE STAR**. Il pannello è stato preparato diluendo il "2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay" (NIBSC code 99/802, Regno Unito) in plasma raccolto in EDTA e negativo per il DNA di Parvovirus B19. Le concentrazioni virali variavano da 3,161 UI/mL a 1000 UI/mL. Ogni campione del pannello è stato testato in dodici replicati per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE STAR** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è il 95%.

I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione con campioni di plasma e ELITE STAR (UI/mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	100 UI/mL	45 UI/mL	987 UI/mL

Limite di rilevazione con campioni di plasma e ELITE STAR (copie / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	145 copie / mL	65 copie / mL	1430 copie / mL

La sensibilità analitica del saggio è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di Parvovirus B19 entro la concentrazione limite usato in associazione a campioni di sangue intero e **ELiTe GALAXY**. Il pannello è stato preparato diluendo il "2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay" (NIBSC code 99/802, Regno Unito) in sangue intero raccolto in EDTA e negativo per il DNA di Parvovirus B19. Le concentrazioni virali variavano da 10 UI/mL a 560 UI/mL. Ogni campione del pannello è stato testato in dodici replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELiTe GALAXY** e amplificazione, con i prodotti ELiTechGroup S.p.A. L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è il 95%. I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione con campioni di sangue intero e ELiTe GALAXY (UI/mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	145 UI/mL	80 UI/mL	562 UI/mL

Limite di rilevazione con campioni di sangue intero e ELiTe GALAXY (copie / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	177 copie / mL	98 copie / mL	685 copie / mL

La sensibilità analitica del saggio è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di Parvovirus B19 entro la concentrazione limite usato in associazione a campioni di plasma e **ELiTe GALAXY**. Il pannello è stato preparato diluendo il "2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay" (NIBSC code 99/802, Regno Unito) in plasma raccolto in EDTA e negativo per il DNA di Parvovirus B19. Le concentrazioni virali variavano da 10 UI/mL a 560 UI/mL. Ogni campione del pannello è stato testato in dodici replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELiTe GALAXY** e amplificazione, con i prodotti ELiTechGroup S.p.A. L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è il 95%. I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione con campioni di plasma e ELiTe GALAXY (UI/mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	79 UI/mL	54 UI/mL	174 UI/mL

Limite di rilevazione con campioni di plasma e ELiTe GALAXY (copie / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	91 copie / mL	62 copie / mL	200 copie / mL

Sensibilità analitica: intervallo di misurazione lineare

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

La sensibilità analitica del saggio, come intervallo di misurazione lineare, è stata determinata utilizzando un pannello di diluizioni (1 log₁₀ tra una diluizione e la successiva) di DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione, la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. I punti del pannello da 10⁷ molecole per reazione a 10¹ molecole per reazione sono stati impiegati in 9 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELiTechGroup S.p.A.

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

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a 10⁶ molecole per reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più alta, (10⁵ molecole / 20 µL).

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a 10 molecole per reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più bassa, (10² molecole / 20 µL).

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

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

A pagina 34 sono calcolati i limiti dell'intervallo di misurazione lineare espressi in copie / mL riferiti al kit di estrazione utilizzato.

Sensibilità analitica: Precisione e Accuratezza

La precisione del saggio, come variabilità dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione, ha permesso di ottenere un Coefficiente di Variazione percentuale (CV %) medio delle quantità misurate di circa il 20,4% nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

L'accuratezza del saggio, come differenza tra la media dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione e il valore teorico della concentrazione del campione, ha permesso di ottenere un'inaccuratezza percentuale media delle quantità misurate di circa il 12,4% nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

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

Sensibilità analitica: riproducibilità con pannello di materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica del saggio, come riproducibilità dei risultati a confronto con i risultati ottenuti con altre metodiche e in diversi laboratori, è stata verificata con un pannello di materiale di riferimento certificato.

Le prove sono state eseguite utilizzando come materiale di riferimento calibrato un pannello di diluizioni di PVB19 entro la concentrazione limite (QCMD 2008 B19 Virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione con i prodotti ELiTechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato				
Campione	Consensus dei saggi commerciali conc. virale Log ₁₀ UI/mL	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ UI/mL
B1908-01	PVB19, 2,396	0,534	2/2	2,636
B1908-02	PVB19, 3,966	0,596	2/2	4,182
B1908-03	PVB19, 2,822	0,574	2/2	2,750
B1908-04	Negativo, NA	NA	0/2	Non rilevato
B1908-05	PVB19, 2,894	0,607	2/2	2,928
B1908-06	PVB19, 2,061	0,577	2/2	1,969
B1908-07	PVB19, 2,926	0,648	2/2	3,026
B1908-08	PVB19, 3,575	0,595	2/2	3,627

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

Ulteriori test sono stati effettuati utilizzando come materiale di riferimento calibrato un panel di diluizioni di PVB19 entro la concentrazione limite (QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in due replicati per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con **ELiTe STAR** ed amplificazione con i prodotti ELiTechGroup S.p.A.

I risultati in UI/mL sono stati determinati applicando il fattore di conversione per **ELITE STAR** e plasma e sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e ELITE STAR				
Campione	Consensus dei saggi commerciali conc. Virale Log ₁₀ UI/mL	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ UI/mL
B1912-01	PVB19, 1,684	0,488	2/2	2,242
B1912-02	PVB19, 3,716	0,522	2/2	4,078
B1912-03	Negativo, NA	-	0/2	-
B1912-04	PVB19, 6,378	0,686	2/2	6,675
B1912-05	PVB19, 4,486	0,641	2/2	4,849
B1912-06	PVB19, 2,687	0,577	1/2	2,837
B1912-07	PVB19, 5,565	0,487	2/2	5,639
B1912-08	PVB19, 2,704	0,386	2/2	2,839

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati. Nell'analisi quantitativa, 6/7 campioni positivi sono stati correttamente quantificati entro l'intervallo definito dal Consensus ± 1 Deviazione Standard (DS). Un campione (B1912-01) è stato quantificato entro ± 2 DS. Questo risultato può essere spiegato in quanto il titolo del campione è inferiore al limite di rilevazione del sistema.

Ulteriori test sono stati effettuati utilizzando materiale di riferimento calibrato un panel di diluizioni di PVB19 entro il limite di concentrazione (QCMD 2014 B19 Virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito). Ogni campione del pannello è stato testato in duplicato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE GALAXY** ed amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati in UI/mL sono stati calcolati applicando il fattore di conversione per **ELITE GALAXY** e plasma e sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e ELITE GALAXY				
Campioni	Consensus dei saggi commerciali virus conc. Log ₁₀ UI/mL	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ UI/mL
B19DNA14-01	PVB19, 4,788	0,507	2/2	4,977
B19DNA14-02	PVB19, 2,878	0,437	2/2	3,115
B19DNA14-03	PVB19, 4,848	0,400	2/2	4,848
B19DNA14-04	Negativo, NA	-	0/2	-
B19DNA14-05	PVB19, 5,802	0,465	2/2	5,996
B19DNA14-06	PVB19, 1,936	0,672	2/2	1,653
B19DNA14-07	PVB19, 3,913	0,371	2/2	3,972
B19DNA14-08	PVB19, 3,844	0,507	2/2	4,555

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati. Nell'analisi quantitativa, 6/7 campioni positivi sono stati quantificati entro l'intervallo definito dal Consensus ± 1 Deviazioni Standard (DS). Un campione (B19DNA14-08) è stato quantificato entro ± 2 DS.

Sensibilità analitica: Fattore di conversione alle Unità Internazionali

Sangue intero raccolto in EDTA

Il fattore di conversione è stato determinato utilizzando un pannello di tre diluizioni (0,5 log₁₀ tra una diluizione e la successiva) di materiale di riferimento calibrato approvato dall'OMS ("2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay", NIBSC code 99/802, Regno Unito) in sangue intero raccolto in EDTA.

I tre punti del pannello sono stati impiegati in 15 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con **ELITE STAR** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a 0,9 UI per copia di PVB19 rilevato in campioni di sangue intero. I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con sangue intero e ELITE STAR				
Fc = 0,98 UI/copia				
Conc. attesa UI/mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI/mL	Quantità media copie / mL	Quantità media UI/mL	Quantità media Log ₁₀ UI/mL
31.623	4,500	29023	28434	4,443
10.000	4,000	9631	9435	3,947
3.162	3,500	4346	4258	3,607

I tre punti del pannello sono stati impiegati in 15 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con **ELITE GALAXY** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a 0,8 UI per copia di PVB19 rilevato in campioni di sangue intero. I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con sangue intero e ELITE GALAXY				
Fc = 0,82 UI/copia				
Conc. attesa UI/mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI/mL	Quantità media copie / mL	Quantità media UI/mL	Quantità media Log ₁₀ UI/mL
31.623	4,500	48688	39924	4,471
10.000	4,000	13885	11386	4,029
3.162	3,500	6085	4990	3,506

Plasma raccolto in EDTA

Il fattore di conversione è stato determinato utilizzando un pannello di tre diluizioni (0,5 log₁₀ tra una diluizione e la successiva) di materiale di riferimento calibrato approvato dall'OMS ("2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay", NIBSC code 99/802, Regno Unito) in plasma raccolto in EDTA.

I tre punti del pannello sono stati impiegati in 15 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con **ELITE STAR** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a 0,6 UI per copia di PVB19 rilevato in campioni di plasma. I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con plasma e ELITE STAR				
Fc = 0,69 UI/copia				
Conc. attesa UI/mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI/mL	Quantità media copie / mL	Quantità media UI/mL	Quantità media Log ₁₀ UI / mL
31.623	4,500	39888	27403	4,425
10.000	4,000	14901	10237	3,987
3.162	3,500	5862	4027	3,588

I tre punti del pannello sono state impiegati in 15 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con **ELITE GALAXY** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a 0,8 UI per copia di PVB19 rilevato in campioni di plasma. I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con plasma e ELITE GALAXY				
Fc = 0,87 UI/copia				
Conc. attesa UI/mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI/mL	Quantità media copie / mL	Quantità media UI/mL	Quantità media Log ₁₀ UI/mL
31.623	4,500	30768	26768	4,423
10.000	4,000	15154	13184	4,119
3.162	3,500	3378	2939	3,458

Quando questo saggio è utilizzato in associazione con i sistemi di estrazione **«NucliSENS® easyMAG®»** o **«QIASymphony® SP/AS»**, il fattore di conversione medio (Fc) da utilizzare per trasformare il risultato quantitativo da copie / mL a Unità Internazionali / mL è stato definito pari a 1 UI per copia di DNA bersaglio rilevata.

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

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

L'esame delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco e della sonda fluorescente sull'allineamento delle sequenze disponibili in banca dati della regione VP1 di PVB19, comprendenti i genotipi 1, 2, 3a e 3b, ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative.

La sensibilità diagnostica del saggio, come efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi / sottotipi, è stata verificata utilizzando alcuni costrutti plasmidici corrispondenti ai genotipi 1, 2 e 3a o 3b.

La sensibilità diagnostica del saggio è stata verificata utilizzando tre DNA plasmidici contenenti un inserto con la sequenza della regione amplificata dei genotipi 1, 2 e 3 (comune ai sottotipi 3a e 3b). I DNA plasmidici sono stati diluiti da 10⁵ copie per reazione a 10² copie per reazione. Questi campioni sono stati impiegati in 3 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELiTechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Prove con DNA plasmidici corrispondenti a genotipo 1, genotipo 2, genotipo 3				
Conc. attesa copie / reazione	Conc. attesa Log10 copie / reaz.	Quantità media genotipo 1 Log10 copie / reaz.	Quantità media genotipo 2 Log10 copie / reaz.	Quantità media genotipo 3 Log10 copie / reaz.
100.000	5,000	5,013	4,882	4,849
10.000	4,000	4,009	3,910	3,862
1.000	3,000	3,024	2,911	2,848
100	2,000	2,037	2,026	1,921

I risultati rientrano nell'intervallo dato dal valore atteso $\pm 0,2 \text{ Log}_{10}$.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando 30 campioni di plasma raccolto in EDTA, negativi per il DNA di PVB19 e positivamente per il DNA di PVB19 aggiungendo il campione B1912-05 del QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Regno Unito) e 30 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi per il DNA di PVB19 e positivamente per il DNA di PVB19 aggiungendo il campione B1912-05 del QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con **ELiTe STAR** ed amplificazione con i prodotti ELiTechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivamente per il DNA di PVB19	30	30	0
Plasma raccolto in EDTA positivamente per il DNA di PVB19	30	30	0

Tutti i campioni positivamente per il DNA di PVB19 sono stati rilevati correttamente come positivi. La sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando 30 campioni di plasma raccolto in EDTA, negativi per il DNA di PVB19 e positivamente per il DNA di PVB19 aggiungendo il campione B1912-05 del QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Regno Unito) e 30 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi per il DNA di PVB19 e positivamente per il DNA di PVB19 aggiungendo il campione B1912-05 del QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELiTe GALAXY** e amplificazione, con i prodotti ELiTechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivamente per il DNA di PVB19	30	30	0
Plasma raccolto in EDTA positivamente per il DNA di PVB19	30	30	0

Tutti i campioni positivamente per il DNA di PVB19 sono stati rilevati correttamente come positivi. La sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

Specificità analitica: assenza di crossreattività con marcatori potenzialmente interferenti

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

L'esame dell'allineamento delle sequenze degli oligonucleotidi di innesco e della sonda fluorescente con le sequenze disponibili in banca dati di organismi diversi da PVB19, tra cui quelle dei genomi completi di Parvovirus 4, Bocavirus e Dependovirus, i virus umani più simili a PVB19, ha dimostrato la loro specificità e l'assenza di omologie significative.

La specificità analitica del saggio, come assenza di crossreattività con altri marcatori potenzialmente interferenti, è stata verificata utilizzando alcuni campioni clinici negativi per il DNA di PVB19 e positivi per il DNA di altri patogeni.

La specificità analitica è stata verificata utilizzando come materiale di riferimento 22 campioni di sangue intero (periferico) raccolto in EDTA, negativi per il DNA di PVB19 ma positivi per il DNA di altri patogeni quali HHV6, EBV, CMV, VZV, HSV1 e PVB19 (testati con prodotti CE IVD di amplificazione). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con i prodotti ELiTechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di PVB19 e positivo per il DNA di altri patogeni	22	0	22

Nessuna crossreattività è stata rilevata con i campioni positivi per il DNA di altri patogeni.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni clinici negativi di sangue intero raccolto in EDTA, negativi per il DNA di PVB19.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando 30 campioni di plasma raccolto in EDTA, negativi per il DNA di PVB19 e 30 campioni di sangue intero raccolto in EDTA, negativi per il DNA di PVB19 (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con **ELiTe STAR** e amplificazione, con i prodotti ELiTechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di PVB19	30	0	30
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di PVB19	30	0	30

La specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando 34 campioni di plasma raccolto in EDTA, negativi per il DNA di PVB19 e 34 campioni di sangue intero raccolto in EDTA, negativi per il DNA di PVB19 (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con **ELiTe GALAXY** e amplificazione, con i prodotti ELiTechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di PVB19	33	1	32
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di PVB19	34	0	34

Un campione positivo di sangue intero è risultato discrepante (31 gEq / mL). Questo campione ha un titolo al di sotto del limite di rilevazione del metodo di riferimento.

La specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 98,5%.

Nota: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit", FTP RTS070PLD.

BIBLIOGRAFIA

F. McOmish et al. (1993) *J. Clin. Microbiol.* 31: 323 - 328
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30
K. Linnet et al. (2004) *Clin. Chem.* 50: 732 - 740.

LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti campioni clinici: sangue intero (periferico e midollare) raccolto in EDTA, plasma raccolto in EDTA e liquido amniotico.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il DNA target non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA target abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (si veda Caratteristiche delle Prestazioni); 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 target.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati insieme a 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, falsi positivi e falsi negativi. Tale rischio residuo non può essere eliminato né ulteriormente ridotto. In taluni casi, potrebbe indurre decisioni sbagliate con effetti potenzialmente pericolosi per il paziente. Comunque, questo rischio residuo associato all'uso previsto del prodotto è stato valutato in rapporto ai benefici potenziali per il paziente ed è stato considerato accettabile.

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

ELITE InGenius and ELITE BeGenius

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

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 Controllo Negativo.	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 e dell'area reagenti o dell'unità refrigerata.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix e del campione. Controllare i volumi della PCR Mix e del campione.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare il PCR Mix per più di 7 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non utilizzare la PCR Mix per più di tre sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Preparare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione del Controllo Interno.	Utilizzare una nuova aliquota di Controllo Interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione 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".
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

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

Errore nel calcolo del Ct	
Possibili cause	Soluzioni
Concentrazione troppo elevata del target nel campione o campione con anomala forma del plot.	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 rack relativo al campione e approvare manualmente il risultato come negativo o lasciarlo 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) oppure - ripetere l'estrazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "Extract + PCR" (Estrazione + PCR).

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

Open Platform:

DNA bersaglio non rilevato nella reazione del Controllo Positivo o dei Q - PCR Standard oppure Coefficiente di correlazione della Curva standard non valido	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastro.	Dispensare con cura i reagenti nella micropiastro seguendo il piano di lavoro. Controllare i volumi di miscela di reazione dispensati. Controllare i volumi di controllo positivo o standard dispensati.
Degradazione della sonda	Utilizzare una nuova aliquota di miscela di reazione.
Degradazione del Controllo positive o dello standard	Utilizzare una nuova aliquota di controllo positivo o standard.
Errore nell'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione delle reazioni del controllo positivo o standard impostata sullo strumento. Controllare il ciclo termico impostato sullo strumento

DNA bersaglio rilevato nella reazione del Controllo Negativo	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastro	Evitare di spargere il contenuto delle provette dei campioni. Cambiare sempre puntale tra un campione e l'altro. Dispensare con cura campioni, controllo negativo e controllo positivo o standard nella micropiastro seguendo il piano di lavoro.
Errore durante l'impostazione dello strumento	Controllare la posizione di campioni, controllo negativo e controllo positivo o standard impostata sullo strumento.
Micropiastro sigillata male	Sigillare con attenzione la micropiastro
Contaminazione dell'acqua ultrapura per biologia molecolare	Utilizzare una nuova aliquota di acqua.
Contaminazione della miscela di reazione	Utilizzare una nuova aliquota di miscela di reazione.
Contaminazione dell'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.	Pulire superfici e strumenti con detergenti acquosi, lavare camici, sostituire provette e puntali in uso.

Presenza di fluorescenza di fondo irregolare o elevata nelle reazioni	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione del campione	Mescolare con cura, pipettando per tre volte, campioni, controllo negativo e controllo positivo o standard nella miscela di reazione. Evitare di creare bolle.
Errore nell'impostazione della "baseline"	Impostare l'intervallo di calcolo della "baseline" in un ambito di cicli in cui la fluorescenza di fondo sia già stabilizzata (controllare le registrazioni "Results", "Component") e la fluorescenza del segnale non abbia ancora cominciato a crescere, per esempio dal ciclo 6 al ciclo 15. Impostare il calcolo automatico della "baseline" selezionando l'opzione "Auto Baseline".

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

LEGENDA DEI SIMBOLI

REF

Numero di catalogo.



Limite superiore di temperatura.

LOT

Codice del lotto.



Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).

IVD

Dispositivo medico diagnostico in vitro.



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

UDI

Numero Unico Identificativo del dispositivo



Contenuto sufficiente per "N" test.



Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.

CONT

Contenuto.



Tenere lontano dalla luce solare.



Fabbricante.

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

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

I reagenti di rilevazione ELiTe MGB® sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, e brevetti EP numero 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161.. Sono state poi presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

Le tecnologie ELiTe InGenius® e ELiTe BeGenius® sono coperte da brevetti e oggetto di domande di brevetto.

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

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELiTe MGB®, il logo ELiTe MGB®, ELiTe InGenius® e ELiTe BeGenius® sono marchi registrati di ELiTechGroup all'interno dell'Unione Europea.

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

«QIA Symphony®» è un marchio registrato della QIAGEN GmbH.

Ficoll® è un marchio commerciale di GE Healthcare Bio-Sciences AB.

Parvovirus B19 ELiTe MGB® kit used in association with Genius series® platforms

Ref: RTS070PLD

 **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 **Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit** is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as a qualitative and quantitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the **detection and quantification of the DNA of Parvovirus B19 human virus (PVB19)**, genotypes 1, 2, 3a and 3b, in DNA samples 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 (peripheral and from bone marrow) collected in EDTA and amniotic fluid.

The assay is also validated in association with the **7300 Real-Time PCR System** and **7500 Real-Time PCR Instrument**, using human specimens of whole blood (peripheral and from bone marrow) collected in EDTA and plasma collected in EDTA.

This product is intended for use as an aid in the diagnosis and monitoring of Parvovirus B19 infections. The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observation and laboratory outcomes.

Amplified sequence

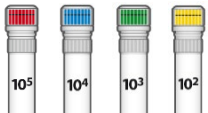
Target	Gene	Fluorophore
PVB19	VP1 gene	FAM
Internal Control	Human beta Globin gene	AP525 (VIC)

Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Amniotic Fluid**

Kit content and related products

Parvovirus B19 ELiTe MGB KIT RTS070PLD	Parvovirus B19 ELiTe Standard STD070PLD	Parvovirus B19 - ELiTe Positive Control CTR070PLD
 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 , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 2 set of 4 tubes of 200 µL 8 freeze-thaw cycles each set (4 separate sessions on board)	Ready-to-use PC 2 tubes of 160 µL 8 reactions per kit 7 freeze-thaw cycles (4 separate sessions on board)
Maximum shelf-life:	24 months	
Storage temperature	≤ -20°C	

Other products required not provided in the kit

- | | |
|---|---|
| › ELiTe InGenius instrument: INT030 | › ELiTe InGenius Waste Box : F2102-000 |
| › ELiTe BeGenius instrument: INT040 | › 300 µL Filter Tips Axygen : TF-350-L-R-S |
| › ELiTe InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200 | › 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118 |
| › ELiTe InGenius PCR Cassette: INT035PCR | |
| › ELiTe InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS | |
| › CPE - Internal Control: CTCPE | |

ELiTe InGenius and ELiTe BeGenius Protocol

- | | | | |
|-------------------------------|--------|-------------------------------|------------------|
| › Sample volume | 200 µL | › Unit of quantitative result | copies/mL- IU/mL |
| › CPE Internal Control volume | 10 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › Total eluate volume | 100 µL | › Frequency of calibration | 60 days |
| › PCR eluate input volume | 20 µL | | |
| › PVB19 Q-PCR Mix volume | 20 µL | | |

ELiTe InGenius and ELiTe BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	125 IU / mL	100% 30/30*	100% 30/30*
Amniotic Fluid	40 IU / mL	100% 30/30*	100% 30/30*
*confirmed samples/ tested samples			
Matrix	Linearity (IU / mL)	Conversion Factor	
Whole Blood	125 – 25,000,000	0.5 IU / copies	
Amniotic Fluid	40 – 25,000,000	1.0 IU / copies	

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	Transport/Storage conditions			
	+16 / +26 °C (room temperature)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Whole Blood collected in EDTA	≤ 24 hours	≤ 3 days	≤ 30 days	≤ 30 days
Amniotic fluid	≤ 4 hours	≤ 4 hours	≤ 30 days	≤ 30 days

ELiTe InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface of ELiTe InGenius software to setup the run. All the steps: extraction, reverse transcription, 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 Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify calibrators: PVB19 Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: PVB19 Positive Control and PVB19 Negative Control in the "Control menu" <i>Note: All must have been run, approved and not expired</i>	3. Thaw the PVB19 Q- 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: PVB19 ELiTe_WB_200_100 or PVB19 ELiTe_AF_200_100	5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Primary tube or Extraction Tube	6. Load the PCR Mix and Internal Control in the Inventory Block
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tips, 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	1. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL"	2. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
3. Select the "Assay protocol" of interest: PVB19 ELITE_PC and PVB19 ELITE_NC or PVB19 ELITE_STD	5. Select the method "PCR only" and set the sample position "Elution tube"	6. Load the PCR Mix in the inventory block
7. Load: PCR cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

ELITE BeGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface of ELITE BeGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational mode 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: PVB19 Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: PVB19 Positive Control and PVB19 Negative Control in the "Control menu" <i>Note: All must have been run, approved and not expired</i>	3. Thaw the PVB19 Q 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", Elution: "100 µL"
4. Select the "Assay protocol" of interest (PVB19 ELITE_Be_WB_200_100 or PVB19 ELITE_Be_AF_200_100) 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 Reagent Rack/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
7. Load "PCR Basket" with "PCR Cassette" and the "Extraction Basket" 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 the click on the run mode «PCR Only»	2. Load the extracted nucleic acid or controls or standards barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"
4. Select the "Assay protocol" of interest (PVB19 ELITE_Be_PC and PVB19 ELITE_Be_NC or PVB19 ELITE_Be_STD)	5. Load the PCR-Mix in Reagent/ Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load "PCR Basket" with "PCR Cassette"
7. Close the door. Start the run	8. View, approve and store the results	

Parvovirus B19 ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTS070PLD



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 **Parvovirus B19 ELITE MGB® Kit** is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as a qualitative and quantitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the **detection and quantification of the DNA of Parvovirus B19 human virus (PVB19)**, genotypes 1, 2, 3a and 3b, in DNA samples 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 (peripheral and from bone marrow) collected in EDTA and amniotic fluid.

The assay is also validated in association with the **7300 Real-Time PCR System** and **7500 Real-Time PCR Instrument**, using human specimens of whole blood (peripheral and from bone marrow) collected in EDTA and plasma collected in EDTA.

This product is intended for use as an aid in the diagnosis and monitoring of Parvovirus B19 infections. The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observation and laboratory outcomes.

Amplified sequence

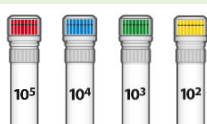
Target	Gene	Fluorophore
PVB19	VP1 gene	FAM
Internal Control	Human beta Globin gene	AP525 (VIC)

Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

Kit content and related products

Parvovirus B19 ELITE MGB KIT RTS070PLD	Parvovirus B19 ELITE Standard STD070PLD	Parvovirus B19 - ELITE Positive Control CTR070PLD
 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 , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 2 set of 4 tubes of 200 µL 8 freeze-thaw cycles each set	Ready-to-use PC 2 tubes of 160 µL 8 reactions per kit 7 freeze-thaw cycles
Maximum shelf-life:	24 months	
Storage temperature	≤ -20°C	

Other product required not provided in the kit

- › **7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument**
- › **ELITE STAR: INT010**
- › **InviMag Universal Kit / IG** (INVITEK, ref. 2450120100).
- › **ELITE GALAXY: INT020**
- › **ELITE GALAXY 300 extraction kit: INT021EX**

- › **CPE Internal Control: CTCPE**
- › **easyMAG** - Generic protocol 2.0.1
- › **QIASymphony** - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit
- › **Molecular biology grade water**

Performances

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITE STAR - ABI	Whole Blood	299 cp / mL	100% (30/30)*	100% (30/30)*
	Plasma	–	100% (30/30)*	100% (30/30)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole Blood	177 cp / mL	100% (30/30)*	98.5% (32/33)*
	Plasma	91 cp / mL	100% (30/30)*	98.5% (34/34)*
System	Linearity	Conversion factor IU / copy		
ELITE STAR - ABI	280 → 28 x 10 ⁶ (WB, PL)	0.98 (WB), 0.69 (PL)		
ELITE GALAXY - ABI	350 → 35 x 10 ⁶ (WB, PL)	0.82 (WB), 0.87 (PL)		
easyMAG - ABI	100 → 10 x 10 ⁶ (PL)	1 (PL)		
QIAasymphony - ABI	120 → 12 x 10 ⁶ (PL)	1 (PL)		

Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITE Star	Whole Blood, Plasma	200 µL	700 µL	100 µL	200µL
ELITE Galaxy	Whole Blood, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	CSF	500 µL	-	100 µL	5 µL
EasyMAG	Whole Blood	100	-	50	
QIAasymphony	Whole Blood,	200 µL	400 µL	95 µL	10 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

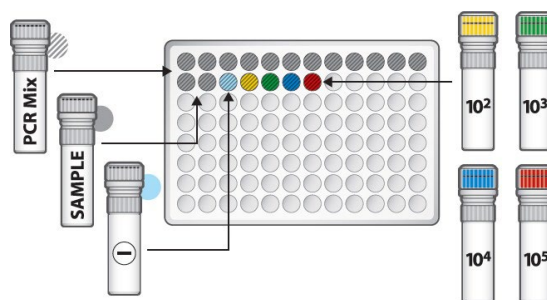
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "PVB19" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

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

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

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw PVB19 Q-PCR-Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet **20 µL** of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, **20 µL** of extracted DNA in sample wells, **20 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **20 µL** of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells, if quantitative, **20 µL** of the Positive Control, if qualitative. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	PVB19 FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

PVB19 Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The PVB19 Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction. The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ copies/reaction.