

Istruzioni per l'uso

ENTEROVIRUS ELITe MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e la Real-Time PCR



REF RTS076PLD

UDI 08033891485399

CE
0123

IVD

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Rev.	Notifiche dei cambiamenti	Data (dd/mm/yyyy)												
07	Inserimento del paragrafo 11.3: Incertezza della Curva Standard Aggiornamento paragrafo 11.5: cross-reattività Aggiornamento paragrafo 11.8: inibizione	26/11/2024												
06	<p>Marcatura CE secondo il nuovo Regolamento Europeo 2017/746 (IVDR).</p> <p>NOTA</p> <p>i lotti di prodotto sotto elencati, con marcatura CE secondo la Direttiva IVDD, rimarranno presenti sul mercato fino alla data di scadenza, in accordo all' Articolo 110 dell' IVDR. Se in possesso di questi lotti, si prega di contattare il personale di ELITech-Group per richiedere la relativa precedente versione delle IFUs.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Numero di catalogo</th><th>Numero di lotto</th><th>Data di scadenza</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RTS076PLD</td><td>U0624-154</td><td>31/12/2025</td></tr> <tr> <td>RTS076PLD</td><td>U1123-101</td><td>31/05/2025</td></tr> <tr> <td>RTS076PLD</td><td>U0823-002</td><td>28/02/2025</td></tr> </tbody> </table> <p>Modifiche alla formulazione e al packaging della la miscela di reazione del kit di amplificazione per migliorare la usabilità del prodotto: due componenti anziché (RT enzyme e PCR Mix). Espansione dell'uso del prodotto in associazione con lo strumento ELITe BeGenius® e le matrici plasma e CSF Aggiornamento delle CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI. Nuovi studi di valutazione delle prestazioni sono stati effettuati. Sono state aggiornate le seguenti prestazioni: Stabilità dei campioni clinici; Limite di rilevabilità; Intervallo di misurazione lineare; Cross reattività; Inibizione da organismi e sostanze; Ripetibilità e Riproducibilità.</p> <p>NOTA</p> <p>I nuovi studi hanno confermato i risultati di Specificità Diagnostica e Sensibilità Diagnostica.</p> <p>Nuovo formato grafico e nuova impostazione dei contenuti dell'IFU</p>	Numero di catalogo	Numero di lotto	Data di scadenza	RTS076PLD	U0624-154	31/12/2025	RTS076PLD	U1123-101	31/05/2025	RTS076PLD	U0823-002	28/02/2025	18/10/2024
Numero di catalogo	Numero di lotto	Data di scadenza												
RTS076PLD	U0624-154	31/12/2025												
RTS076PLD	U1123-101	31/05/2025												
RTS076PLD	U0823-002	28/02/2025												
05	È stato modificato il numero di reazioni da poter effettuare in associazione al sistema "ELITe InGenius".	10/05/2022												
04	È stato modificato il numero di reazioni da poter effettuare in associazione al sistema "ELITe InGenius".	26/02/2020												
03	Correzioni formali	07/09/2018												
02	<p>Espansione dell'uso del prodotto in associazione con lo strumento ELITe InGenius® e le matrici plasma e CSF Nuovo confezionamento: è stata eliminata la scatola esterna di cartone</p>	09/05/2016												
00 — 01	Nuovo sviluppo di prodotto e cambiamenti successivi	—												

INDICE

1 USO PREVISTO	4
2 PRINCIPIO DEL SAGGIO.....	4
3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	5
4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	5
5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO	5
6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	5
7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI	7
8 CAMPIONI E CONTROLLI	8
9 PROCEDURA ELITe InGenius.....	10
10 PROCEDURA ELITe BeGenius	17
11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	22
12 BIBLIOGRAFIA	33
13 LIMITI DELLA PROCEDURA	33
14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	34
15 LEGENDA DEI SIMBOLI	37
16 AVVISO PER L'UTILIZZATORE	37
17 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA.....	38
Appendix A QUICK START GUIDE.....	39

1 USO PREVISTO

Il prodotto **ENTEROVIRUS ELITe MGB® Kit** è un dispositivo medico diagnostico *in vitro* destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come test di real-time PCR quantitativa degli acidi nucleici per la rilevazione e la quantificazione dell'RNA dell'Enterovirus umano (A, B, C, D), 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 trascrizione inversa, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, a partire da campioni di plasma raccolto in EDTA e liquido cefalorachidiano.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio di infezioni da Enterovirus umano (EV) in pazienti con sospetta infezione da Enterovirus o sotto monitoraggio per infezione da enterovirus.

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

2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è una trascrizione inversa e Real-Time PCR (metodica one step) quantitativa per la rilevazione dell'RNA di Enterovirus isolato dai campioni, retro-trascritto e amplificato utilizzando una miscela completa di reazione 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 quantità di RNA di Enterovirus è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

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

3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **ENTEROVIRUS ELiTe MGB Kit** fornisce i seguenti componenti:

- **EV PCR Mix**, una miscela ottimizzata e stabilizzata per PCR che contiene i primers e le sonde specifici per:
- la regione **5' UTR** di Enterovirus, rilevata nel canale **ENTEROVIRUS**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher®, e marcata con il fluoroforo FAM
- una regione di RNA genomico del fago MS2 del Controllo Interno (**IC**), rilevato nel canale **IC**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 525 (AP525).

EV PCR Mix contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfato e la DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start). Ciascuna provetta contiene **600 µL** di soluzione, sufficiente per **24 tests**, se si processano almeno 5 campioni per sessione.

- **RT EnzymeMix**, una miscela ottimizzata e stabilizzata di enzimi per trascrizione inversa. Ciascuna provetta contiene **20 µL** di soluzione, sufficiente per **48 tests**, se si processano almeno 5 campioni per sessione.

Il prodotto **ENTEROVIRUS ELiTe MGB Kit** consente di effettuare **96 test** in associazione con **ELiTe InGenius** e **ELiTe BeGenius**, utilizzando rispettivamente 20 µL di **EV PCR Mix** e 0.3 µL di **RT EnzymeMix** per reazione.

Il prodotto **ENTEROVIRUS ELiTe MGB Kit** può essere anche utilizzato in associazione con strumenti equivalenti

4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Tabella 1

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
EV PCR Mix cod. RTS076PLD	Miscela di reagenti per la trascrizione inversa e Real-Time PCR in provetta con tappo BIANCO	4 x 600 µL	-
RT EnzymeMix cod. RTS003-RT	Trascrittasi inversa in provetta con tappo con inserto NERO	2 x 20 µL	-

5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o materiale analogo.
- Agitatore Vortex.
- Centrifuga da banco (~5,000 giri/minuto).
- Microcentrifuga da banco (~13,000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a spostamento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Provette sterili da 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005).
- Acqua per biologia molecolare.

6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione dell'RNA 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 trascrizione inversa, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati delle analisi eseguite sui campioni da analizzare, sono richiesti i seguenti prodotti.

Tabella 2

Strumenti e Software	Prodotti e Reagenti
<p>ELiTe InGenius (ELiTechGroup S.p.A., EG SpA cod. INT030)</p> <p>ELiTe InGenius Software versione 1.3.0.19 (o successiva)</p> <p>EV ELiTe_STD, Assay Protocol (Protocollo di Saggio) con i parametri per l'analisi dei Calibratori</p> <p>EV ELiTe_PC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo</p> <p>EV ELiTe_NC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo</p> <p>EV ELiTe_PL_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di plasma</p> <p>EV ELiTe_CSF_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di fluido cefalorachidiano.</p>	<p>ELiTe InGenius SP 200 (EG SpA, cod. INT032SP200)</p> <p>ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, cod. INT032CS)</p> <p>ELiTe InGenius PCR Cassette (EG SpA, cod. INT035PCR)</p> <p>ELiTe InGenius Waste Box (EG SpA, cod. F2102-000)</p> <p>300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., cod. TF-350-L-R-S) solo per ELiTe InGenius</p> <p>1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Switzerland, cod. 30180118) solo per ELiTe BeGenius</p> <p>CPE - Internal Control (EG SpA, cod. CTRCPE)</p> <p>ENTEROVIRUS ELiTe Standard (EG SpA, cod. STD076PLD)</p> <p>ENTEROVIRUS - ELiTe Positive Control (EG SpA, cod. CTR076PLD)</p>
<p>ELiTe BeGenius (EG SpA cod. INT040)</p> <p>ELiTe BeGenius Software versione 2.2.1. (o successiva)</p> <p>EV ELiTe_Be_STD, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei Calibratori</p> <p>EV ELiTe_Be_PC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo</p> <p>EV ELiTe_Be_NC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo</p> <p>EV ELiTe_Be_PL_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di plasma</p> <p>EV ELiTe_Be_CSF_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di fluido cefalorachidiano.</p>	

7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

7.1 Avvertenze e precauzioni generali

Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con 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.

7.2 Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

7.3 Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Tabella 3

Componente	Temperatura di conservazione	Utilizzo dalla prima apertura	Cicli di congelamento/scongelamento
EV PCR Mix	-20 °C o inferiore (protetta dalla luce)	entro un mese	fino a cinque
RT EnzymeMix	-20 °C o inferiore	entro un mese	fino a dieci volte, per un massimo di dieci minuti, a +2 / +8 °C

8 CAMPIONI E CONTROLLI

8.1 Campioni

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

Tabella 4

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto e conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Plasma	EDTA	≤ 24 ore	≤ 3 giorni	≤ 1 mese	≤ 1 mese
CSF	-	NR	≤ 24 ore	≤ 1 mese	≤ 1 mese

*NR: non raccomandato

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.

Tabella 5 Assay Protocols per ENTEROVIRUS ELiTe MGB Kit

Campione	Strumento	Trasferimento del campione	Nome Assay Protocol	Report	Caratteristiche
plasma	ELiTe InGenius	non richiesto	EV ELiTe_PL_200_100	copie / 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: 10 µL
	ELiTe BeGenius	non richiesto	EV ELiTe_Be_PL_200_100		
CSF	ELiTe InGenius	richiesto, in Extraction Tube	EV ELiTe_CSF_200_100	copie / 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: 10 µL
	ELiTe BeGenius	richiesto, in provetta Sarstedt da 2 mL	EV ELiTe_Be_CSF_200_100		

Quando richiesto, 200 µL di campione devono essere trasferiti 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".

Quando si usa il tubo primario, il volume del campione varia in base al tipo di tubo caricato. Fare riferimento ai manuali di **ELiTe InGenius** ed **ELiTe BeGenius** per ulteriori informazioni su come impostare ed effettuare la procedura di estrazione.

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 disponibili relativi all'inibizione indotta da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo [11.7 Sostanze potenzialmente interferenti: Cross-reattività pagina 27](#) al capitolo [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22](#).

Non usare plasma raccolto in eparina, che è un noto inibitore di retrotrascrizione e PCR.

8.2 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 **ENTEROVIRUS ELiTe Standard** (non fornito in questo kit), in associazione con gli Assay Protocols **EV ELiTe_STD** o **EV ELiTe_Be_STD**

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

- come Controllo Positivo di PCR, utilizzare il prodotto **ENTEROVIRUS- ELiTe Positive Control** (non fornito in questo kit), in associazione con gli Assay Protocols **EV ELiTe_PC** o **EV ELiTe_Be_PC**
- come Controllo Negativo di PCR, utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita in questo kit) in associazione con gli Assay Protocols **EV ELiTe_NC** o **EV 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 ritestati nei seguenti casi:

- quando si utilizza un nuovo lotto di reagenti di PCR,
- quando i risultati delle analisi di controllo qualità (vedi [8.3 Controlli di qualità pagina 10](#)) non rientrano nelle specifiche,
- quando **ELiTe InGenius** o **ELiTe BeGenius** deve essere sottoposto ad un intervento di manutenzione principale.

8.3 Controlli di qualità

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

9 PROCEDURA ELiTe InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **ENTEROVIRUS ELiTe MGB Kit** con **ELiTe InGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 6

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

9.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELiTe InGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**",
- nella sezione "Calibration" della schermata Home, verificare che i calibratori (**Q - PCR Standard**) siano processati, approvati e validi (Status) per il lotto di **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 (**Positive Control, Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **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 [8 CAMPIONI E CONTROLLI pagina 8](#)).

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

9.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

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

- Corsa dei campioni (Extract + PCR)
- Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
- Corsa di Calibrazione (PCR Only),
- Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi nell'Assay Protocol disponibile sullo strumento e 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:

- Scongelerare le provette necessarie di **EV PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (5 o più test per sessione). Mescolare delicatamente le provette per 10 secondi, ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

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

- Prelevare le provette contenenti **RT EnzymeMix** necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **48 reazioni** in condizioni ottimali (5 o più test per sessione). Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi, per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

Non esporre il prodotto **RT EnzymeMix** a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

- Preparare una provetta da 2 mL con tappo a vite (Sarstedt, cod. 72.694.005, non fornito con il kit) per la miscela completa di reazione e contrassegnarla con un pennarello a inchiostro permanente.
- Calcolare i volumi di **EV PCR Mix** e **RT EnzymeMix** necessari per preparare la **miscela completa di reazione** in funzione del numero di campioni (N) da analizzare, come descritto nella tabella sottostante

Tabella 7

Numero di campioni (N)	EV PCR Mix	RT EnzymeMix
$1 \leq N \leq 5$	$(N + 1) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 1) \times 0,3 \mu\text{L}$
$6 \leq N \leq 11$	$(N + 2) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 2) \times 0,3 \mu\text{L}$
$N = 12$	290 μL	4,4 μL

- Preparare la **miscela completa di reazione** aggiungendo nella provetta da 2 mL i volumi calcolati dei due componenti. Mescolare mediante **agitatore a bassa velocità** la provetta per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte. Centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio o blocco freddo.

NOTA

La **miscela completa di reazione** deve essere utilizzata entro 7 ore se conservata nel blocco refrigerato (per 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione). La **miscela completa di reazione** non può essere conservata per essere riutilizzata.

NOTA

La **miscela completa di reazione** è fotosensibile per cui non esporla alla luce diretta.

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

Tabella 8

	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 miscela completa di reazione nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi	Caricare la miscela completa di reazione 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.

Tabella 8 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
15	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
16	Premere "Start".	Premere "Start".

Tabella 9

	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. (Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 4 reazioni). 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 miscela completa di reazione 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 miscela completa di reazione 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

La **miscela completa di reazione** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 7 ore (per 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione). Mescolare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva. La **miscela completa di reazione non può** essere conservata per essere riutilizzata.

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

I **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 **Controllo Positivo** 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.

9.3 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 **ENTEROVIRUS ELiTe MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

1. Validazione della Curva di Calibrazione,
2. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
3. Validazione dei risultati dei campioni,
4. Refertazione dei risultati dei campioni.

9.3.1 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 **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.

9.3.2 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 "**ELiTe_PC**" e "**ELiTe_NC**". I valori di Ct ottenuti sono convertiti in concentrazione e 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, l'amplificazione dei Controlli non validi e di tutti i campioni deve essere ripetuta.

9.3.3 Validazione dei risultati dei campioni

Il **software ELiTe InGenius** interpreta i risultati di amplificazione del target (Canale **EV**) e del controllo Interno (Canale **IC**) con i parametri inclusi negli Assay Protocol **EV ELiTe_PL_200_100** e **EV ELiTe_CSF_200_100**. I valori dei Ct ottenuti sono convertiti in valori di concentrazione. I risultati vengono mostrati nella schermata "Results Display".

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

Tabella 10

1) Curva di Calibrazione	Stato
EV Q-PCR Standard	APPROVATO
2) Controllo Positivo	Stato
EV Positive Control	APPROVATO

Tabella 10 (segue)

3) Controllo Negativo	Stato
EV 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 il DNA dei patogeni è stato rilevato o non rilevato.

Tabella 11

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

Campioni che riportano il risultato "Non Valido-Ripeti test su campione": in questo caso, l'RNA del Controllo Interno non è stato rilevato in maniera efficace per problemi nella fase di campionamento, estrazione, retrotrascrizione o amplificazione (e. g. errato campionamento, degradazione o perdita di RNA 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 [14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 34](#)).

I campioni segnalati come "EV:RNA non rilevato o inferiore a "LoD" copie/mL", sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare l'RNA di ENTEROVIRUS. In tal caso non si può escludere che l' RNA di ENTEROVIRUS sia presente ad una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedi [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22](#)).

I campioni positivi per l'RNA di ENTEROVIRUS ad una concentrazione inferiore al limite di rilevazione, quando sono rilevati dal saggio, sono identificati nel report come "EV:RNA Rilevato, quantità inferiore a LLOQ"(vedi [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22](#)).

I campioni positivi per l'RNA di Enterovirus ad una concentrazione all'interno del Range di misurazione lineare sono identificati nel report come "EV: RNA rilevato, quantità pari a "XXX" copie / mL" (vedi [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22](#)).

I campioni positivi per l'RNA di Enterovirus ad una concentrazione oltre il limite superiore di quantificazione (ULOQ) del saggio sono identificati nel report come "EV:RNA rilevato, quantità oltre "ULOQ" copie / mL" e non sono validi ai fini della quantificazione (vedi [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22](#)). 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".

9.3.4 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.

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

10 PROCEDURA ELITe BeGenius

La procedura per l'utilizzo del prodotto **ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit** con **ELITe BeGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 12

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

10.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITe BeGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**",
- nella sezione "Calibration" della schermata Home, verificare che i Calibratori (**Q - PCR Standard**) siano processati, approvati e validi (Status) per il lotto di **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 (**Positive Control, Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **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 **8 CAMPIONI E CONTROLLI** pagina 8).

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

10.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **ENTEROVIRUS ELITE MGB Kit** può essere utilizzato con **ELITE BeGenius** per eseguire:

- Corsa dei campioni (Extract + PCR)
- Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
- Corsa di Calibrazione (PCR Only),
- Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

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

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:

- Scongelare le provette necessarie di **EV PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (5 o più test per sessione). Mescolare delicatamente le provette per 10 secondi, ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

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

- Prelevare le provette contenenti **RT EnzymeMix** necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **48 reazioni** in condizioni ottimali (5 o più test per sessione). Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi, per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

Non esporre il prodotto **RT EnzymeMix** a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

- Preparare una provetta da 2 mL con tappo a vite (Sarstedt, cod. 72.694.005, non fornito con il kit) per la miscela completa di reazione e contrassegnarla con un pennarello a inchiostro permanente.
- Calcolare i volumi di **EV PCR Mix** e **RT EnzymeMix** necessari per preparare la **miscela completa di reazione** in funzione del numero di campioni (N) da analizzare, come descritto nella tabella sottostante

Tabella 13

Numero di campioni (N)	PCR Mix	RT EnzymeMix
$1 \leq N \leq 5$	$(N + 1) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 1) \times 0,3 \mu\text{L}$
$6 \leq N \leq 11$	$(N + 2) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 2) \times 0,3 \mu\text{L}$
$N = 12$	290 μL	4,4 μL
$13 \leq N \leq 18$	$(N + 3) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 3) \times 0,3 \mu\text{L}$
$19 \leq N \leq 23$	$(N + 4) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 4) \times 0,3 \mu\text{L}$
$N = 24$	580 μL	8,7 μL

- Preparare la **miscela completa di reazione** aggiungendo nella provetta da 2 mL i volumi calcolati dei due componenti. Mescolare mediante **agitatore a bassa velocità** la provetta per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte. Centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio o blocco freddo.

NOTA

La **miscela completa di reazione** deve essere utilizzata entro 7 ore se conservata nel blocco refrigerato (per 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione). La **miscela completa di reazione** non può essere conservata per essere riutilizzata.

NOTA

La **miscela completa di reazione** è fotosensibile per cui non esporla alla luce diretta.

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

Tabella 14

	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 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 acidi nucleici 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). 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 Sample ID, SID).	Inserire l' "Elution Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). 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

Tabella 14 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile
15	Caricare il CPE e la miscela completa di reazione nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la miscela completa di reazione 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".

Tabella 15

	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. (Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 4 reazioni). 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 posizzionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i Racks dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizzionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "Run mode": " PCR Only ".	Selezionare il "Run mode": " PCR Only ".
5	Caricare le provette di Q-PCR Standard nell' "Elution Rack".	Caricare le provette di Controllo Positivo e 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.".

Tabella 15 (segue)

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
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 miscela completa di reazione nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la miscela completa di reazione nel "Reagent/Elution Rack".
12	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) 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, 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

La **miscela completa di reazione** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 7 ore (per 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione). Mescolare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva. La **miscela completa di reazione non può** essere conservata per essere riutilizzata.

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

I **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 **Controllo Positivo** 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.

10.3 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 **ENTEROVIRUS ELITE MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

1. Validazione della Curva di Calibrazione
2. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
3. Validazione dei risultati dei campioni
4. Refertazione dei risultati dei campioni

NOTA

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

11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

11.1 Limite di Rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) del saggio è stato definito con gli strumenti **ELITE BeGenius** e **ELITE InGenius** testando campioni di Plasma raccolto in EDTA e liquido cefalorachidiano (CSF).

Plasma raccolto in EDTA:

Il limite di rilevazione (LoD) del saggio è stato definito in associazione ad **ELITE InGenius** su campioni di Plasma positivizzati con materiale di riferimento certificato di *Enterovirus 71* (ZeptoMetrix, US).

L'analisi di regressione Probit dei dati è stata eseguita sui risultati e il LoD è stato stimato come la concentrazione del campione che ha una probabilità del 95% di risultare positivo.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 16

Limite di Rilevazione (copie / mL) per campioni di Plasma e ELITE InGenius		
LoD	Intervallo di confidenza 95%	
	Limite inferiore	Limite superiore
141	101	278

Il valore di LoD calcolato è stato verificato testando con gli strumenti ELITE BeGenius e ELITE InGenius un pool negativo di Plasma raccolto in EDTA positizzato con materiale di riferimento certificato di *Enterovirus* alla concentrazione dichiarata.

I risultati ottenuti hanno confermato i valori di LoD dichiarati per ENTEROVIRUS ELITE MGB Kit nella matrice Plasma, sia su ELITE BeGenius che su ELITE InGenius.

Liquido cefalorachidiano (CSF):

Il limite di rilevazione (LoD) del saggio è stato definito in associazione ad ELITE InGenius su campioni di CSF positizzati con materiale di riferimento certificato di *Enterovirus 71* (ZeptoMetrix, US).

L'analisi di regressione Probit dei dati è stata eseguita sui risultati e il LoD è stato stimato come la concentrazione del campione che ha una probabilità del 95% di risultare positivo.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 17

Limite di Rilevazione Detection (copie / mL) per campioni di CSF e ELITE InGenius		
LoD	Intervallo di confidenza 95%	
	Limite Inferiore	Limite Superiore
490	304	1185

Il valore di LoD calcolato è stato verificato testando con gli strumenti ELITE BeGenius e ELITE InGenius un pool negativo di CSF positizzato con materiale di riferimento certificato di *Enterovirus* alla concentrazione dichiarata.

I risultati ottenuti hanno confermato i valori di LoD dichiarati per ENTEROVIRUS ELITE MGB Kit nella matrice CSF, sia su ELITE BeGenius che su ELITE InGenius.

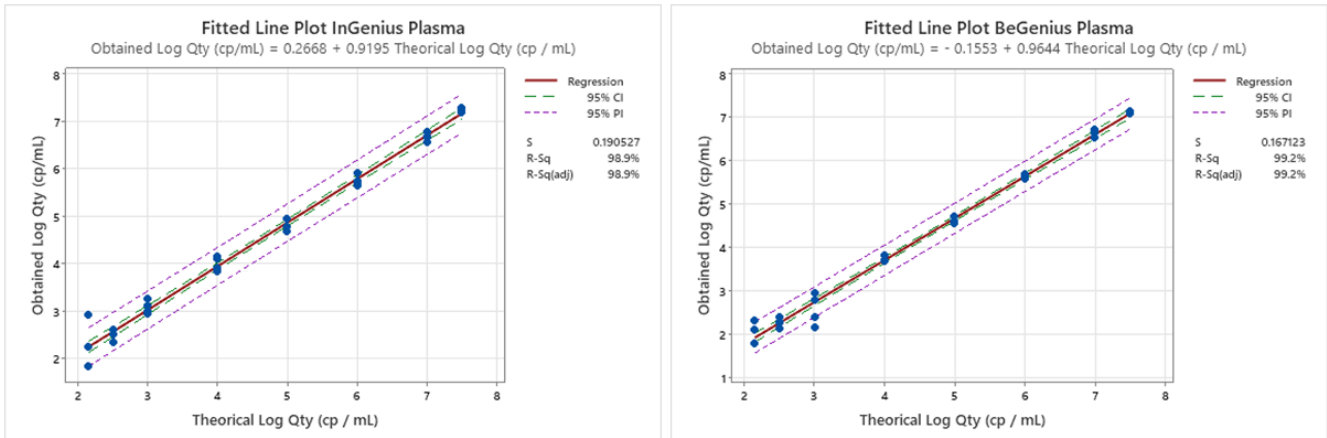
11.2 Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare di ENTEROVIRUS ELITE MGB Kit è stato definito con gli strumenti ELITE InGenius ed ELITE BeGenius testando campioni di Plasma e di CSF.

Plasma raccolto in EDTA:

L'intervallo di misurazione lineare di ENTEROVIRUS ELITE MGB Kit è stato definito in associazione agli strumenti ELITE InGenius ed ELITE BeGenius su campioni di Plasma testando diluizioni del materiale di riferimento certificato di *Enterovirus 71* (ZeptoMetrix, US); la regressione lineare è stata calcolata con i risultati ed è stato definito l'intervallo di misurazione lineare.

I risultati sono riportati nelle seguenti figure.



I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

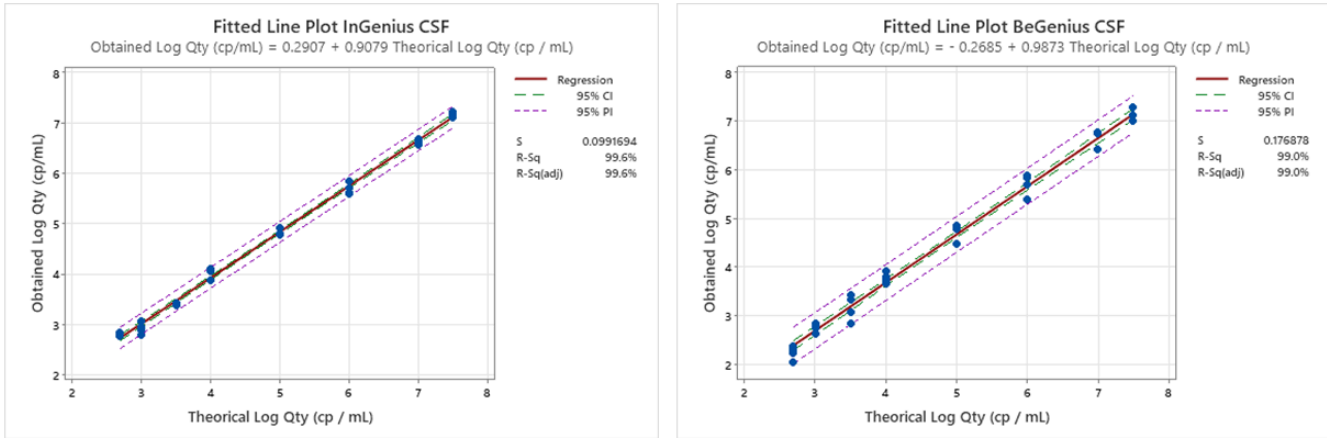
Tabella 18

Intervallo di misurazione lineare per campioni di Plasma EDTA e ELITe InGenius e ELITe BeGenius	
Limite Inferiore	Limite Superiore
141 copies / mL	31,622,777 copies / mL

CSF:

L'intervallo di misurazione lineare di ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit è stato definito in associazione agli strumenti ELITe InGenius ed ELITe BeGenius su campioni di CSF testando diluizioni del materiale di riferimento certificato di *Enterovirus 71* (ZeptoMetrix, US); la regressione lineare è stata calcolata con i risultati ed è stato definito l'intervallo di misurazione lineare.

I risultati sono riportati nelle seguenti figure



I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 19

Intervallo di misurazione lineare per campioni di CSF e ELITe InGenius e ELITe BeGenius	
Limite Inferiore	Limite Superiore
490 copies / mL	31.622.777 copies / mL

11.3 Incertezza della Curva Standard

Il valore di incertezza della curva standard è stato calcolato combinando gli errori casuali (SD) di tutte le quantificazioni dei livelli e moltiplicando per il fattore di copertura $k = 2$ (Incertezza Combinata Espansa) ed è pari a 0,1507 copie Log / reazione.

Tabella 20

Livelli di curva standard	Teorico	Misurato	SD	Incertezza Combinata Estesa
	Log c/rxn	Log c/rxn		
EV Q - PCR Standard 10^5	5,0000	5,0214	0,0334	0,1507
EV Q - PCR Standard 10^4	4,0000	3,9727	0,0381	
EV Q - PCR Standard 10^3	3,0000	2,9905	0,0264	
EV Q - PCR Standard 10^2	2,0000	2,0154	0,0491	

11.4 Inclusività: Efficienza di rilevazione su differenti genotipi

L'inclusività del saggio, come efficienza di rilevazione su diversi genotipi di Enterovirus è stata valutata mediante analisi *in silico*.

L'analisi ha mostrato una sufficiente conservazione di sequenza e l'assenza di mutazioni significative. Quindi si prevede un'efficiente rilevazione per i seguenti genotipi: Enterovirus A (Coxsackievirus A2-A8, A10, A12, A14, A16 e Enterovirus EV71, EV76, EV89-EV92), Enterovirus B (Coxsackievirus B1-B6, A9, Enterovirus EV69, EV73, EV74, EV75, EV77, EV79-EV88, EV97, EV98, EV100, EV101, EV107, Echovirus E1-E21, E24-E27, E29-E33), Enterovirus C (Coxsackievirus A1, A11, A13, A15, A17-A22, A24, Poliovirus PV1-PV3, Enterovirus EV96, EV99, EV102, EV109), Enterovirus D (Enterovirus EV68, EV70, EV94).

11.5 Organismi potenzialmente interferenti: Cross-reattività

La potenziale cross-reattività di microrganismi indesiderati che possono essere trovati nei campioni clinici è stata valutata per il saggio mediante analisi *in silico*.

L'analisi effettuata sulle sequenze nucleotidiche di Rhinovirus e Parechovirus ha mostrato una parziale specificità. Per Parechovirus (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8) non è stata rilevata nessuna omologia significativa. Al contrario il saggio mostra una possibile cross-reattività con alcuni genotipi di Rhinovirus (fatta eccezione di Rhinovirus B14).

L'analisi non ha mostrato alcuna omologia significativa con altri organismi indesiderati. Pertanto, non è attesa alcuna cross-reattività.

L'assenza di cross-reattività con potenziali organismi interferenti, che possono essere trovati in campioni clinici, è stata verificata anche attraverso l'analisi di un pannello di organismi indesiderati (ATCC, ZeptoMetrix and DSMZ) ad alto titolo.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 21

Campione	Pos. / Rep.	Esito
HIV1	0 / 6	Nessuna cross-reattività
EBV	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HAV	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HBV	0 / 6	Nessuna cross-reattività

Tabella 21 (segue)

Campione	Pos. / Rep.	Esito
HHV6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HSV1	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HSV2	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HEV	0 / 6	Nessuna cross-reattività
RSV	0 / 6	Nessuna cross-reattività
VZV	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Flu A	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Flu B	0 / 6	Nessuna cross-reattività
CMV	0 / 6	Nessuna cross-reattività
ADV	0 / 6	Nessuna cross-reattività
PVB19	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HCV	0 / 6	Nessuna cross-reattività
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0 / 6	Nessuna cross-reattività
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 / 6	Nessuna cross-reattività
<i>Candida albicans</i>	0 / 6	Nessuna cross-reattività
BKV	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Rhinovirus B14	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Parechovirus 1	0 / 6	Nessuna cross-reattività

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti testati non hanno mostrato alcuna cross-reattività per l'amplificazione del target utilizzando il saggio ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit.

11.6 Organismi potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione da parte di microrganismi indesiderati che possono essere trovati nei campioni clinici è stata verificata per il saggio attraverso l'analisi di un pannello di microrganismi indesiderati (ATCC, ZeptoMetrix and DSMZ) addizionato con materiali di riferimento di Enterovirus.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 22

Campione	EV Pos. / Rep.	Esito
HIV1	6 / 6	Nessuna interferenza
EBV	6 / 6	Nessuna interferenza
HAV	6 / 6	Nessuna interferenza
HBV	6 / 6	Nessuna interferenza
HHV6	6 / 6	Nessuna interferenza
HSV1	6 / 6	Nessuna interferenza
HSV2	6 / 6	Nessuna interferenza

Tabella 22 (segue)

Campione	EV Pos. / Rep.	Esito
HEV	6 / 6	Nessuna interferenza
RSV	6 / 6	Nessuna interferenza
VZV	6 / 6	Nessuna interferenza
Flu A	6 / 6	Nessuna interferenza
Flu B	6 / 6	Nessuna interferenza
CMV	6 / 6	Nessuna interferenza
ADV	6 / 6	Nessuna interferenza
PVB19	6 / 6	Nessuna interferenza
HCV	6 / 6	Nessuna interferenza
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6 / 6	Nessuna interferenza
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 / 6 *	Nessuna interferenza
<i>Candida albicans</i>	6 / 6	Nessuna interferenza
BKV	6 / 6	Nessuna interferenza
Rhinovirus B14	6 / 6	Nessuna interferenza
Parechovirus 1	6 / 6	Nessuna interferenza

Nota: a causa di un errore dell'operatore, un campione risultato non valido non è stato considerato nell'analisi. Il campione non è stato rianalizzato poiché il numero minimo di replicati richiesto per il test era 5.

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti testati non hanno mostrato alcuna inibizione dell'amplificazione del target utilizzando il saggio ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit.

11.7 Sostanze potenzialmente interferenti: Cross-reattività

Plasma raccolto in EDTA:

La cross-reattività da parte di sostanze potenzialmente interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero trovarsi nei campioni clinici di Plasma è stata valutata per il saggio mediante analisi di un pannello di sostanze a concentrazioni rilevanti.

I risultati sono riportati nella tabella seguente

Tabella 23

Campione	EV Pos. / Rep.	Esito
Icteric Plasma	0/6	Nessuna cross-reattività
Lipemic Plasma	0/6	Nessuna cross-reattività
Haemolytic Blood H	0/6	Nessuna cross-reattività
Haemolytic Blood M	0/6	Nessuna cross-reattività
HaemolyticBlood L	0/6	Nessuna cross-reattività
Heparinized Plasma	0/6	Nessuna cross-reattività
EDTA Plasma	0/6	Nessuna cross-reattività

Tabella 23 (segue)

Campione	EV Pos. / Rep.	Esito
Ampicillin	0/6	Nessuna cross-reattività
Cefedoxime	0/6	Nessuna cross-reattività
Azytromycin	0/5*	Nessuna cross-reattività
Ganciclovir	0/5*	Nessuna cross-reattività
Ribavirin	0/6	Nessuna cross-reattività
Abacavir Sulfate	0/6	Nessuna cross-reattività
Cidofovir	0/6	Nessuna cross-reattività
Cyclosporine A	0/6	Nessuna cross-reattività
Bactrim	0/6	Nessuna cross-reattività
Ciprofloxacin	0/6	Nessuna cross-reattività

Nota: a causa di un errore dell'operatore, un campione risultato non valido non è stato considerato nell'analisi. Il campione non è stato rianalizzato poiché il numero minimo di replicati richiesto per il test era 5

Tutte le sostanze potenzialmente interferenti testate non hanno mostrato alcuna cross-reattività per l'amplificazione del target utilizzando il saggio ENTEROVIRUS ELITE MGB Kit.

CSF:

La cross-reattività da parte di sostanze potenzialmente interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero trovarsi nei campioni clinici di CSF è stata valutata per il saggio mediante analisi di un pannello di sostanze a concentrazioni rilevanti.

I risultati sono riportati nella tabella seguente

Tabella 24

Campione	EV Pos. / Rep.	Esito
5% Sangue Intero	0/6	Nessuna crossreattività

Il test ha dimostrato che il sangue intero non cross-reagisce nell'amplificazione del target utilizzando il saggio ENTEROVIRUS ELITE MGB Kit.

11.8 Sostanze potenzialmente interferenti: Inibizione

Plasma raccolto in EDTA:

La potenziale inibizione da parte di sostanze potenzialmente interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero trovarsi nei campioni clinici di plasma è stata valutata per il saggio mediante analisi di un pannello di sostanze a concentrazione rilevanti.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 25

Sostanza	EV Pos. / Rep.	Esito
Icteric Plasma	6/6	Nessuna interferenza
Lipemic Plasma	6/6	Nessuna interferenza
Haemolytic Blood H	6/6	Nessuna interferenza
Haemolytic Blood M	6/6	Nessuna interferenza
HaemolyticBlood L	6/6	Nessuna interferenza
Heparinized Plasma	3/6	Campione invalido
EDTA Plasma	6/6	Nessuna interferenza
Ampicillin	6/6	Nessuna interferenza
Cefedoxime	6/6	Nessuna interferenza
Azytromycin	6/6	Nessuna interferenza
Ganciclovir	6/6	Nessuna interferenza
Ribavirin	6/6	Nessuna interferenza
Abacavir Sulfate	6/6	Nessuna interferenza
Cidofovir	6/6	Nessuna interferenza
Cyclosporine A	6/6	Nessuna interferenza
Bactrim	6/6	Nessuna interferenza
Ciprofloxacin	6/6	Nessuna interferenza

Tutte le sostanze potenzialmente interferenti testate, ad eccezione dell'eparina, non hanno mostrato alcuna inibizione dell'amplificazione del target utilizzando il saggio ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit.

È stato confermato che l'eparina è in grado di inibire il saggio. Tuttavia, questi campioni sono risultati "non validi" anziché falsi "negativi" a causa del fallimento del controllo interno (IC Ct > 35).

CSF:

La potenziale inibizione da parte di sostanze potenzialmente interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero trovarsi nei campioni clinici di CSF è stata valutata per il saggio mediante analisi di un pannello di sostanze a concentrazione rilevanti.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 26

Sample	EV Pos. / Rep.	Quantification Bias	Outcome
5% Sangue Intero	6/6	0,0653	Nessuna interferenza

Il test ha dimostrato che il sangue intero non inibisce l'amplificazione e la quantificazione del target utilizzando il saggio ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit.

11.9 Ripetibilità

La ripetibilità del saggio è stata valutata su ELITe BeGenius ed ELITe InGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di Plasma, di cui un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento certificato per EV (Zeptometrix, US).

Un esempio dei risultati di ripetibilità Intra-Sessione (su un giorno) è riportato nelle seguenti tabelle.

Tabella 27

Ripetibilità Intra-Sessione su ELITe InGenius (giorno 1)								
Campione	N	ENTEROVIRUS			Concordanza	Controllo Interno		
		Ct Media	SD	%CV		Ct Media	SD	%CV
ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit								
Negativo	8	-	-	-	100%	29,16	0,23	0,78
3 X LOD	8	35,44	0,20	0,57	100%			
10 X LOD	8	33,88	0,29	0,86	100%			
10 X LOD	8	33,79	0,28	0,83	100%			

Tabella 28

Ripetibilità Intra-Sessione su ELITe BeGenius (giorno 1)								
Campione	N	ENTEROVIRUS			Concordanza	Controllo Interno		
		Ct Media	SD	%CV		Ct Media	SD	%CV
ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit U0722-018 (LP1) - Day 1								
Negativo	8	-	-	-	100%	30,31	0,71	2,36
3 X LOD	8	37,75	1,44	3,82	100%			
10 X LOD	8	35,46	0,44	1,25	100%			

Un esempio dei risultati di ripetibilità Inter-Sessione (su due giorni) è riportato nelle seguenti tabelle.

Tabella 29

Ripetibilità Inter-Sessione su ELITe InGenius (giorno 1 + giorno 2)								
Campione	N	ENTEROVIRUS			Concordanza	Controllo Interno		
		Ct Media	SD	%CV		Ct Media	SD	%CV
ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit								
Negativo	16	-	-	-	100%	29,21	0,21	0,73
3 X LOD	16	35,25	0,47	1,34	100%			
10 X LOD	16	33,92	0,43	1,26	100%			

Tabella 30

Ripetibilità Inter-Sessione su ELiTe BeGenius (giorno 1 + giorno 2)								
Campione	N	ENTEROVIRUS			Concordanza	Controllo Interno		
		Ct Media	SD	%CV		Ct Media	SD	%CV
ENTEROVIRUS ELiTe MGB Kit U0722-018 (LP1) - Day 1 - 2								
Negativo	16	-	-	-	100%	30,45	0,96	3,17
3 X LOD	16	37,46	1,31	3,49	100%			
10 X LOD	16	35,72	0,73	2,04	100%			

Nel test di ripetibilità, ENTEROVIRUS ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima di valori di Ct come CV% minore del 5%.

11.10 Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata valutata su ELITE BeGenius ed ELITE InGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di Plasma, di cui un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento certificato per EV (Zeptomatrix, US).

Un esempio di riproducibilità Inter-Strumento (su tre strumenti) è mostrato nelle seguenti tabelle.

Tabella 31

Riproducibilità Inter-Strumento su ELITE InGenius								
Campione	N	ENTEROVIRUS			Concordanza	Controllo Interno		
		Ct Media	SD	%CV		Ct Media	SD	%CV
Negativo	24	-	-	-	100%	29,37	0,36	1,22
3X LoD	24	35,62	0,55	1,55	100%			
10X LoD	24	33,77	0,36	1,05	100%			

Tabella 32

Riproducibilità Inter-Strumento su ELITE BeGenius								
Campione	N	ENTEROVIRUS			Concordanza	Controllo Interno		
		Ct Media	SD	%CV		Ct Media	SD	%CV
Negativo	24	-	-	-	100%	30,48	0,49	1,62
3X LoD	24	37,45	1,05	2,81	100%			
10X LoD	24	35,24	0,63	1,78	100%			

Un esempio dei risultati di Riproducibilità Inter-Lotto (su tre lotti) è riportato nelle seguenti tabelle.

Tabella 33

Riproducibilità Inter-Lotto su ELITE InGenius								
Campione	N	ENTEROVIRUS			Concordanza	Controllo Interno		
		Ct Media	SD	%CV		Ct Media	SD	%CV
Negativo	48	-	-	-	100%	29,30	0,32	1,10
3X LoD	48	35,55	0,35	0,99	100%			
10X LoD	48	33,94	0,33	0,98	100%			

Tabella 34

Riproducibilità Inter-Lotto su ELITE BeGenius								
Campione	N	ENTEROVIRUS			Concordanza	Controllo Interno		
		Ct Media	SD	%CV		Ct Media	SD	%CV
Negativo	48	-	-	-	100%	30,44	0,91	2,99
3X LoD	48	37,54	1,30	3,47	100%			
10X LoD	48	35,47	0,84	2,37	100%			

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

11.11 Specificità Diagnostica: Conferma dei campioni negativi

La Specificità Diagnostica del saggio, come conferma dei campioni negativi, è stata valutata in associazione ad ELITE InGenius testando campioni clinici di Plasma EDTA e CSF, certificati negativi per il target.

Poiché ELITE BeGenius possiede performance analitiche equivalenti a ELITE InGenius, le performance diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono anch'esse considerate equivalenti. Quindi la Specificità Diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITE InGenius è anche riferibile ad ELITE BeGenius.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 35

Campioni negativi per EV RNA	N	Positivi	Negativi	% Specificità Diagnostica
Plasma EDTA	50	0	50	100%
CSF	50	0	50	100%

La Specificità Diagnostica di ENTEROVIRUS ELITE MGB Kit in associazione alla matrice Plasma EDTA e CSF in questa prova è risultata uguale al 100%.

Il cut-off del Ct del Controllo Interno è impostato a 35 per entrambe le matrici

11.12 Sensibilità Diagnostica: Conferma dei campioni positivi

La Sensibilità Diagnostica del saggio, come conferma dei campioni positivi, è stata valutata in associazione ad ELITE InGenius testando campioni clinici di Plasma EDTA e CSF positivamente con materiali di riferimento.

Poiché ELITE BeGenius possiede performance analitiche equivalenti a ELITE InGenius, le performance diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono anch'esse considerate equivalenti. Quindi la Sensibilità Diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITE InGenius è anche riferibile ad ELITE BeGenius.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 36

Campioni positivizzati per EV RNA	N	Positivi	Negativi	% Sensibilità Diagnostica
Plasma EDTA	64	64	0	100%
CSF	64	64	0	100%

La Sensibilità Diagnostica di ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit in associazione alle matrici plasma EDTA e CSF in questa prova è risultata uguale al 100%.

NOTA

I dati ed 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 "ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit", FTP 076PLD.

12 BIBLIOGRAFIA

W. A. Verstrepen et al. (2001) J Clin Microbiology 39: 4093 - 4096.

K. Linnet et al. (2004) Clin. Chem. 50: 732 - 740.

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

C. N. Kotton et al. (2018) Transplantation 02: 900 - 931.

13 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti campioni clinici: plasma raccolto in EDTA e liquido cefalorachidiano.

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

Non utilizzare con questo prodotto l'RNA estratto da campioni eparinati: l'eparina inibisce la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e causa risultati non validi. 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, trascrizione inversa, PCR e rilevazione di acidi nucleici, per evitare risultati errati.

È necessario disporre di aree separate per la preparazione della miscela completa di reazione e per l'estrazione/amplificazione/rilevazione dei prodotti della reazione di amplificazione per prevenire risultati falsi positivi.

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 l'RNA target non è stato rilevato nell' RNA estratto dal campione, ma non si può escludere che l'RNA target abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (si veda). [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 22](#) In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

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

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

14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Tabella 37

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 miscela completa di reazione, Q-PCR Standard e del Controllo Positivo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione, Q-PCR Standard e del Controllo Positivo.
Errore di preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzati durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Degradazione della miscela completa di reazione o dei suoi componenti.	Non utilizzare la miscela completa di reazione 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. Non lasciare la RT EnzymeMix a temperatura più alte di -20 °C più di 10 minuti. Preparare nuovamente la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
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 S.p.A.

Tabella 38

Reazione del Controllo Negativo non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione e del Controllo Negativo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione 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 miscela completa di reazione o dei suoi componenti.	Preparare nuovamente la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
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 S.p.A..

Tabella 39

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione, del Controllo Interno e del campione. Controllare i volumi della miscela completa di reazione, del Controllo Interno e del campione.
Errore di preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzati durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Degradazione della miscela completa di reazione o dei componenti.	Non utilizzare la miscela completa di reazione 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. Non lasciare l'RT EnzymeMix a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti. Preparare nuovamente la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
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 S.p.A..

Tabella 40

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.

Tabella 41

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).

Tabella 42

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 preanalitiche.	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. Preparare nuovamente la miscela completa di reazione e/o utilizzare una nuova aliquota di CTR CPE

15 LEGENDA DEI SIMBOLI



Numero di catalogo



Limite superiore di temperatura



Codice del lotto.



Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).



Dispositivo medico diagnostico *in vitro*.



Conforme ai requisiti del Regolamento Europeo 2017/746/EC relativo ai dispositivi medici diagnostici *in vitro*. Certificazione rilasciata da TÜV SÜD Product Service GmbH, Germany.



Numero Unico Identificativo del dispositivo



Contenuto sufficiente per "N" test.



Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso



Contenuto.



Tenere lontano dalla luce solare.



Fabbricante.

16 AVVISO PER L'UTILIZZATORE

Qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiedono l'utilizzatore e/o il paziente.

Al momento dell'attuale revisione dell'IFU, non si sono verificati incidenti gravi o richiami del dispositivo, aventi un impatto sulle prestazioni e sulla sicurezza del dispositivo.

Una "Sintesi della Sicurezza e delle Prestazioni" (Summary of Safety and Performance) sarà resa disponibile al pubblico attraverso la Banca Dati Europea sui Dispositivi Medici (Eudamed) quando questo sistema informatico sarà operativo. Prima della pubblicazione dell'avviso di piena funzionalità di Eudamed, il "Summary of Safety and Performance" sarà reso disponibile al pubblico su richiesta via e-mail all'indirizzo emd.support@elitechgroup.com, senza indebito ritardo.

17 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

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

I reagenti di rilevazione ELiTe MGB® sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. numero 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.

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



CAUTION

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

INTENDED USE

The product **ENTEROVIRUS ELITe MGB® Kit** is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as quantitative nucleic acids reverse transcription and Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the RNA of Human Enterovirus (A, B, C, D), extracted from clinical specimens.

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

The product is intended for use as an aid in the diagnosis and monitoring of Human Enterovirus (EV) infections in patients suspected of having an EV infection or undergoing monitoring of EV infection.

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



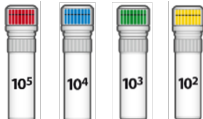

Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target	EV 5' UTR region	FAM	EV
Internal Control	MS2 phage protein A gene	AP525	IC

Validated matrices

- Plasma collected in EDTA
- Cerebrospinal Fluid (CSF)

Kit content and related products

ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit (RTS020PLD)		ENTEROVIRUS ELITe Standard (STD020PLD)	ENTEROVIRUS - ELITe Positive Control (CTR020PLD)
 X 4	 x 2	 X 2	 X 2
EV PCR Mix 4 tubes of 600 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles	RT EnzymeMix 2 tubes of 20 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles	Ready-to-use 4 levels: 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 2 set of 4 tubes of 160 µL 4 freeze-thaw cycles	Ready-to-use Positive Control 2 tubes of 160 µL 8 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles
Maximum shelf-life: 18 months Storage Temperature: -20 °C		Maximum shelf-life: 24 months Storage Temperature: -20 °C	Maximum shelf-life: 24 months Storage Temperature: -20 °C

Other products required not provided in the kit

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

ELITe InGenius and ELITe BeGenius protocol

Table 43

› Extraction Input Volume	200 µL	› PCR Mix volume	20 µL
› CPE volume	10 µL	› Frequency of controls	15 days
› Extraction Elution Volume	100 µL	› Frequency of calibration	60 days
› Sample PCR input volume	10 µL	› Unit of quantitative result	copies/mL

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Sensitivity	Specificity
Plasma EDTA	141 copies / mL	100% 64 tested samples	100% 50 tested samples
CSF	490 copies / mL	100% 64 tested samples	100% 50 tested samples

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.

Specimen	Collection requirements	Transport/Storage conditions			
		+16 / +26 °C (room temperature)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Plasma	EDTA	≤ 24 hours	≤ 3 days	≤ 1 month	≤ 1 month
CSF	-	NR	≤ 24 hours	≤ 1 month	≤ 1 month

NR: not recommended

ELITe InGenius Procedures

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

Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius. Log in with username and password. Select the mode " CLOSED ".	2. Verify calibrators: Q-PCR Standard in the "Calibration" menu. Verify controls: Positive Control and Negative Control in the "Controls" menu. Note: Both must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the PCR Mix and the CTRCPE tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec. Keep the RT EnzymeMix in ice or cool block.
4. Prepare the complete reaction mixture		
Samples Number (N)	PCR Mix	RT EnzymeMix
$1 \leq N \leq 5$	$(N + 1) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 1) \times 0.3 \mu\text{L}$
$6 \leq N \leq 11$	$(N + 2) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 2) \times 0.3 \mu\text{L}$
$N = 12$	290 μL	4.4 μL
5. Vortex gently Spin down 5 sec Keep the complete reaction mixture in ice. Do not expose to direct light.		

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: EV ELITe_PL_200_100 and EV ELITe_CSF_200_100	5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position "Extraction Tube".	6. Load the complete reaction mixture in the Inventory Block.
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube 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. to 4. Follow the Procedure 1 described above (select the Assay Protocols: EV ELITe_PC and EV ELITe_NC or EV ELITe_STD)	5. Select the method "PCR Only" and the sample position "Elution Tube"	6. Load the complete reaction mixture 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 (GUI) of ELITe BeGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational modes are available: complete run (Extract + PCR) or PCR Only.

Before analysis

1. Switch on ELITe BeGenius. Log in with username and password. Select the mode " CLOSED ".	2. Verify calibrators: Q-PCR Standard in the "Calibration" menu. Verify controls: Positive Control and Negative Control in the "Controls" menu. Note: Both must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the PCR Mix and the CTRCPE tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec. Keep the RT EnzymeMix in ice or cool block.
4. Prepare the complete reaction mixture:		
Samples Number (N)	PCR Mix	RT EnzymeMix
$1 \leq N \leq 5$	$(N + 1) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 1) \times 0.3 \mu\text{L}$
$6 \leq N \leq 11$	$(N + 2) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 2) \times 0.3 \mu\text{L}$
$N = 12$	$290 \mu\text{L}$	$4.4 \mu\text{L}$
$13 \leq N \leq 18$	$(N + 3) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 3) \times 0.3 \mu\text{L}$
$19 \leq N \leq 23$	$(N + 4) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 4) \times 0.3 \mu\text{L}$
$N = 24$	$580 \mu\text{L}$	$8.7 \mu\text{L}$
5. Vortex gently Spin down 5 sec Keep the complete reaction mixture in ice. Do not expose to direct light.		

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

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extract + PCR»	2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the Cooler Unit. The barcode scan is already active	3. Verify the extraction volumes: Input: "200 μL ", Eluate: "100 μL "
4. Select the "Assay protocol" of interest (EV ELITe_Be_PL_200_100 or EV ELITe_Be_CSF_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 complete reaction mixture and the Internal Control in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
7. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette" and the "Extraction Rack" with the "ELITe InGenius SP 200" extraction cartridges and the required extraction consumables	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

NOTE

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

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

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «PCR Only»	2. Load the extracted nucleic acid or controls barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	3. Verify the extraction volumes: Input: "200 μL ", Eluate: "100 μL "
4. Select the "Assay protocol" of interest (EV ELITe_Be_PC and EV ELITe_Be_NC or EV ELITe_Be_STD)	5. Load the complete reaction mixture in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette"
7. Close the door. Start the run	8. View, approve and store the results	

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

